

03081
2
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

ESTUDIO DE LA RELACION ESTRUCTURA-FUNCION Y
CAPACIDAD INMUNOGENICA DE NEUROTOXINAS Y PEPTIDOS
ANALOGOS SINTETICOS DEL VENENO DEL ALACRAN
Centruroides noxius HOFFMANN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
M. en C. EMMA SORAIDA CALDERON ARANDA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

Resumen	1
Summary	2
Presentación de la tesis	3
I. Introducción	4
II. Planteamiento del trabajo	7
III. Anexo 1	
Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venom	10
IV. Anexo 2	
Síntesis y caracterización Inmunológica de péptidos correspondientes a la Toxina 2 del alacrán <i>Centruroides noxius</i> Hoffman.	44
V. Perspectivas Futuras	78
VII. Referencias	83
VIII. Apendice	88
1. Scorpion toxins: A model for peptide synthesis on new drugs.	89
2. Protección contra el alacranismo.	107

RESUMEN

Los venenos de alacranes presentan toxinas cuyo blanco de acción son canales iónicos. En el presente trabajo abordamos el estudio de la relación estructura-función y capacidad inmunogénica de estas toxinas. Utilizando macerado de telson, veneno total, fracción II de Sephadex G-50 (que contiene todos los componentes tóxicos del veneno de alacrán) y la toxina 2 purificada a homogeneidad (todas de *C. noxius*), como antígenos para inducir respuesta inmune humoral; definimos que los componentes inmunodominantes y relevantes para la inducción de respuesta protectora en murinos son las toxinas para canales de sodio. Utilizando péptidos sintéticos, definimos que las regiones 1-14 y 1-27 de la toxina 2 de *C. noxius*, utilizada como modelo de toxina tipo β , son inmunogénicas y al menos parte de estas regiones se encuentran expuestas en la superficie de la toxina nativa. Los resultados de los ensayos de neutralización pasiva con sueros anti-péptidos sintéticos, sugieren que también las regiones 1-14 y 1-27 portan epítopes neutralizantes. Por ensayos de proliferación de células de ganglios linfáticos de ratones BALB/c, inducidos con toxina 2 *in vivo* y estimulados *in vitro* con péptidos sintéticos, definimos que las regiones 1-14 y 17-25 portan epítopes T. Además diseñamos y sintetizamos un péptido quimérico análogo uno a las toxinas de tipo β . Este resultado tóxico a concentraciones mucho más altas que las toxinas nativas. El péptido quimérico β presentó actividad bloqueadora sobre canales de sodio, semejante a la mostrada con las toxinas β por lo cual concluimos que obtuvimos una toxina quimérica tipo β totalmente sintética además el péptido mostró ser inmunogénico y generador de anticuerpos neutralizantes del efecto de las toxinas nativas.

SUMMARY

Scorpion venoms contain toxins target to ion channels. In this thesis we have focused on the study of the structure-function relationship and on the immunogenic properties of these toxins. We have used the following antigens from *Centruroides noxius*: telson macerates, total venom, fraction II from Sephadex G-50 (which contains all the toxic components of the venom) and highly purified toxin 2, in order to study the humoral immune response in mice and rats. The immunodominants and most relevant components capable of inducing neutralizing response were found to be the toxins that affect Na⁺ channels of excitable membranes. Using synthetic peptides we have shown that regions corresponding to the N-terminal amino acid sequence: 1-14 and 1-27, of toxin 2 from *C. noxius* (chose as model of toxin type β) are immunogenic, and at least part of these regions are exposed to the surface of the native toxin. Passive neutralization experiments conducted with sera anti-synthetic peptides also suggest that the regions 1-14 and 1-27 correspond to neutralizing epitopes of the toxin 2. Proliferation assays with cells from lymphatic ganglia of BALB/c mice, previously induced *in vivo* and lately stimulated *in vitro* with synthetic peptides, show that regions 1-14 and 17-25 also function as T cell epitopes. Furthermore, we have designed and synthesized a chimeric peptide analogue to toxins type β . The peptide was mildly toxic, at much higher concentration than the corresponding native toxins. The chimeric peptide assayed in neuroblastoma cells revealed to affect the activation mechanism of Na⁺ channels, just like the native toxins. The chimeric peptide showed to be immunogenic and capable of eliciting neutralizing antibodies against native toxins.

PRESENTACION DE LA TESIS

El trabajo contenido en esta tesis se realizó en el contexto del estudio de la relación estructura función de las toxinas del veneno de alacranes específicas para canales de sodio.

En la presente tesis se describe brevemente el marco teórico de mayor relevancia para la realización del trabajo experimental, así como los antecedentes utilizados para su elaboración. Los resultados de este trabajo se presentan en conjunto con los objetivos planteados, refiriéndose a los artículos que conforman los anexos de ésta tesis. Para concluir se presenta un apartado que corresponde a las perspectivas futuras del trabajo. También se presenta un apéndice del trabajo que incluye dos capítulos en los cuales se colaboró en la elaboración y que contienen datos parciales de la presente tesis.

I. INTRODUCCION

Los venenos de los alacranes contienen neurotoxinas de bajo peso molecular con actividad sobre canales iónicos (Miranda *et al.* 1962; Zlotkin *et al.* 1978; Possani *et al.* 1980). Las toxinas de alacrán se han clasificado por su blanco de acción en dos tipos: neurotoxinas para canales de sodio (Caterall, 1976), con 60-66 residuos de aminoácidos (Rochat *et al.* 1979; Fontecilla-Camps *et al.* 1988) y toxinas para canales de potasio (Carbone *et al.* 1982; Miller *et al.* 1985) de 30-39 residuos de aminoácidos (Possani *et al.* 1982; Giménez-Gallego *et al.* 1988; Johnson y Slugg, 1992). Las toxinas para canales de sodio son pequeñas proteínas básicas estructuradas en forma muy compacta por la presencia de cuatro puentes disulfuro. Actúan sobre canales iónicos dependientes de voltaje a nivel del mecanismo de inactivación (toxinas tipo α) o del mecanismo de activación del canal (toxinas tipo β). Actualmente se conocen cerca de 100 toxinas diferentes, de las cuales algunas ya han sido secuenciadas. La primera estructura tridimensional obtenida fue la de la V3 de *Centruroides sculpturatus sculpturatus* que corresponde a una toxina de tipo β para canales de sodio (Fontecilla-Camps *et al.* 1980). Posteriormente se definió la estructura tridimensional de una toxina α , la toxina II de *Androctonus australis Hector* (AaH). (Fontecilla-Camps *et al.* 1988). Este mismo grupo ha propuesto la existencia de una superficie hidrofóbica conservada que pudiera jugar un papel importante en la unión de las toxinas de alacrán a su sitio receptor (Fontecilla-Camps *et al.* 1981).

A partir de estos datos y basados en el mecanismo de bloqueo, las toxinas se han agrupado y se han alineado de acuerdo a la homología de su estructura (Possani *et al.* 1985).

En nuestro laboratorio, desde hace 18 años se ha trabajado en el aislamiento y caracterización de diversas toxinas de alacranes de importancia médica. Nuestro grupo ha purificado y caracterizado 40 toxinas para canales de sodio y 3 para canales de potasio: 11 toxinas de *C. noxius* (Possani *et al.* 1981a; Possani *et al.* 1981b; Dent, 1982; Possani *et al.* 1982; Zamudio *et al.* 1992), 5 de *C. limpidus tecomanus* (Possani *et al.* 1980; Martin *et al.* 1988; Ramírez *et al.* 1988), 1 de *C. elegans* (Possani *et al.* 1978; Ramírez *et al.* 1981), 6 de *Tityus serrulatus* (Possani *et al.* 1977, 1981c, 1982, 1985; Possani *et al.* 1991) 10 de *T. bahiensis* (Possani *et al.* 1992), 5 de *C. limpidus limpidus* y 2 más de *C. infamatus infamatus* (Alagón, 1988, Possani *et al.* 1991).

Las toxinas de alacranes también se han estudiado desde el punto de vista de su relación estructura-función por el grupo de Rochat (Rochat *et al.* 1979) y más recientemente por nuestro grupo. Sus características estructurales en función de su antigenicidad han sido abordadas principalmente por el grupo de Rochat y col. en Francia, utilizando como modelo

la toxina II de AaH, y como herramienta fragmentos Fab de anticuerpos específicos de la toxina nativa (El Ayeb *et al.* 1983). También se han usado anticuerpos policlonales anti-toxina nativa, péptidos sintéticos y modificaciones químicas de residuos específicos de la toxina nativa. (Bahraoui *et al.* 1987; Bahraoui *et al.* 1986; Bahraoui *et al.* 1988; El Ayeb *et al.* 1986; Granier *et al.* 1989). A partir de los resultados derivados de estos experimentos, los autores de estos trabajos han sugerido que la mayor parte de la toxina es antigénica, excepto las regiones altamente conservadas, especialmente en el extremo amino terminal, y que el sitio tóxico no se traslapa con las regiones antigénicas (El Ayeb *et al.* 1986; Kharrat *et al.* 1989 y 1990).

En nuestro grupo el estudio de la relación estructura función ha sido abordado a través del uso de anticuerpos monoclonales (Zamudio *et al.* 1992) y péptidos sintéticos traslapados correspondientes a: 1) la totalidad de la estructura primaria de la toxina NTX cuyo blanco de acción son los canales de potasio dependientes de voltaje (Gurrola *et al.* 1989 ; Vaca 1989) y 2) prácticamente toda la secuencia de aminoácidos de otras toxinas como la toxina 2 de *C. noxius* cuyo blanco de acción son los canales de sodio sensibles a voltaje (Olamendi, 1991). A partir del uso de éstos péptidos se ha propuesto que la actividad biológica de la toxina NTX está en el extremo amino terminal y, por resultados también de experimentos con péptidos sintéticos, de la toxina CnII-10 (también una toxina β para canales de sodio que ahora se denomina Cn4 -Becerril *et al.* sometido), se ha sugerido que el extremo amino terminal de las toxinas de canales de sodio sensibles a voltaje es la región que porta la actividad tóxica.

Por otro lado, sabemos que uno de los factores que definen a un determinante antigénico (epitope), más que la secuencia de aminoácidos involucrados, es la manera en que estos residuos se arreglan tridimensionalmente (Sela, 1969). Así la topología juega un papel en la estructuración de un determinante antigénico. Otro de los factores propuesto como importante para la antigenicidad es la flexibilidad del epitope y su exposición a la superficie. Ambas características han sido correlacionadas, aunque se propone que solo uno de estos factores juega un papel esencial para la antigenicidad en tanto que el otro, sin ser esencial, correlaciona fuertemente con ésta (Tainer *et al.* 1985; Tainer *et al.* 1984). Argumentos teóricos apuntan a favor de que la flexibilidad segmental disminuye la constante de unión antígeno anticuerpo, de tal forma que las constantes de unión más altas (10^{12}) se han observado con anticuerpos dirigidos hacia proteínas nativas, mientras que los anticuerpos contra moléculas con alto grado de libertad (péptidos y oligosacáridos), tienen constantes de unión significativamente más bajas (10^6) (Kranz *et al.* 1982; Mudgett-Hunter *et al.* 1985).

Reportes del análisis de la antigenicidad y flexibilidad de las neurotoxinas de escorpión, indican que es la accesibilidad estática la esencial para la antigenicidad y que la flexibilidad segmental no contribuye de manera importante a ésta. (Novotny y Haber, 1986; Bahraoui *et al.* 1986). Los anticuerpos contra una proteína nativa presentan una mayor afinidad contra la conformación nativa que hacia otras conformaciones de fragmentos o moléculas desnaturalizadas. Igualmente, anticuerpos generados contra una proteína desnaturalizada tiene mayor afinidad para el antígeno homólogo que hacia la conformación nativa. Lo anterior puede explicarse si el péptido no contiene todos los residuos de contacto de un determinante antigénico, lo que da lugar a un enlace de unión baja. En el caso de que todos los segmentos de la estructura primaria completa se encuentren presentes, puede ocurrir que la afinidad disminuya debido a que la topografía de los residuos en el péptido no den lugar a un determinante complementario al paratope del anticuerpo. También es posible que la afinidad se reduzca debido a que solo una pequeña fracción de fragmentos peptídicos adquiere la conformación adecuada a un tiempo dado y, finalmente se propone que la unión de un anticuerpo a un péptido que no contiene una conformación nativa, ocurre con una complementaridad submáxima, y es después de la formación del complejo que se inducen cambios intramoleculares en el péptido, que adquiere una conformación más parecida a la nativa (Berzofsky y Schechter, 1981). Debido a estas observaciones, fue sorprendente encontrar que los anticuerpos generados contra péptidos sintéticos muestran una importante reactividad cruzada con proteínas nativas (Green *et al.* 1982; Lerner, 1984).

Este sorprendente hallazgo, aunado a la tecnología de síntesis química de péptidos en fase sólida, ha sido de gran utilidad en 4 áreas de investigación básica: 1) para definir la secuencia de aminoácidos expuestos en la superficie de una proteína nativa 2) la preparación de anticuerpos específicos de un sitio particular en una molécula, 3) para definir regiones de una proteína relevantes para la inducción de anticuerpos neutralizantes de su actividad biológica, y 4) en el intento de dirigir la respuesta inmune al sitio activo de una proteína que en condiciones fisiológicas es poco inmunogénica o no inmunogénica.

II. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

A partir de los resultados experimentales obtenidos por nuestro grupo y considerando el marco teórico anterior, decidimos seguir explorando la relación estructura función de las toxinas de alacrán y determinar las regiones, de una toxina modelo, relevantes para la neutralización de la actividad tóxica de éstos péptidos, además de evaluar la presencia de regiones inductoras de linfocitos T. Para esto utilizamos un péptido sintético de 57 residuos de aminoácidos, que corresponde a la secuencia prácticamente total de las toxinas tipo β . También utilizamos péptidos correspondientes a secuencias parciales de la toxina 2 de *C. noxius*, previamente preparados (Olamendi, 1991). Por lo anterior, el presente trabajo, está enmarcado en la definición de los componentes del veneno de alacrán, o regiones específicas de éstos, relevantes para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Estos resultados tendrán potencial aplicación en la obtención de antisueros más eficientes y específicos y, a largo plazo, podrían utilizarse para la inducción de inmunidad activa en población humana de alto riesgo. Los elementos para proponer un estudio de éstas características son los siguientes:

- a) En México el alacranismo representa un problema real de salud cuyo único tratamiento específico consiste en la administración de suero específico. Anualmente se reportan alrededor de 200 000 accidentes de envenenamiento por picadura de alacrán, de los cuales 700-800 tienen un desenlace fatal (Monroy-Velazco, 1961; Alagón y López-Acuña, 1979; Dehesa-Dávila, 1989).
- b) Los métodos tradicionales para la obtención de antisueros consisten en la hiperinmunización de caballos con macerado de telson o veneno total de varias especies de alacranes. El uso de una mezcla compleja de antígenos para inmunizar, potencialmente distrae la respuesta inmune de los componentes relevante para neutralización. Debido a esto es necesario utilizar concentraciones altas de antisuero, lo que aumenta el riesgo de reacciones secundarias a la formación de complejos inmunes, como la enfermedad del suero.
- c) Debido a que la sintomatología de envenenamiento por toxinas de alacrán es un evento agudo que se presenta a escasos minutos de la inyección del veneno, es necesario la aplicación de seroterapia adecuada en los primeros minutos después de iniciada la sintomatología grave. Justamente esta rapidez en el desarrollo de la sintomatología ha sido un argumento que apoya el escepticismo sobre de la eficiencia de un sistema de vacunación contra veneno de alacrán, ya que, a menos que los niveles de anticuerpos neutralizantes se encuentren altos por un período de tiempo prolongado (ejem. durante la estancia en una región de alto riesgo en épocas de alta incidencia), la inmunidad activa no tendría tiempo para actualizarse y proteger contra este proceso tan agudo.

d) A pesar de ésto, si fuera posible inducir respuesta neutralizante prolongada por medio de análogos sintéticos, no tóxicos, de las toxinas de alacrán, ésto permitiría proteger a individuos de alto riesgo en regiones con alta incidencia de accidentes por picadura de alacrán, contribuyendo al control de este problema de salud pública.

Con estos antecedentes y los elementos teóricos revisados arriba, se plantearon los siguientes objetivos para desarrollar durante el trabajo doctoral y las estrategias utilizadas para abordar su solución:

1.- Definir los componentes mínimos necesarios para la inducción de una respuesta neutralizante del efecto tóxico del veneno de alacranes.

La relevancia de este objetivo fue el poder contestar las siguientes interrogantes:

- i) ¿ Existe en el veneno de alacrán uno (o varios) componente(s) inmunodominante(s) para la inducción de anticuerpos protectores ?
- ii) ¿Cuál es la naturaleza de este componente inmunodominante?
- iii) ¿ Cómo se compara la capacidad neutralizante de los antisueros inducidos con componentes de diferente grado de complejidad, todos estos obtenidos del veneno de alacrán ?
- iv) Dada la toxicidad del veneno de alacrán, ¿ podemos utilizar un método para destoxificar el veneno o sus componentes, que adicionalmente pueda ser utilizado como vehículo de inmunización ?
- v) ¿ Cómo influye la destoxificación de los componentes del veneno, en su capacidad inmunogénica ?

Las estrategias para abordar este objetivo, así como los resultados experimentales obtenidos se presentan en el **anexo 1** que corresponde al artículo:

Anexo 1

E.S. Calderón-Aranda; D. Hozbor; L.D. Possani.

"Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venoms".

Toxicon, En prensa.

2.-Evaluar las posibles regiones relevantes para la actividad biológica, y la presencia de epítopes protectores en toxinas tipo β , con actividad sobre canales de sodio de mamíferos, sensibles a voltaje.

Para abordar este objetivo nos planteamos los siguientes problemas:

- i) Diseñar y sintetizar un péptido quimérico de toxinas de tipo β a partir de las homologías y diferencias estructurales de las toxinas tipo α y β .
- ii) Evaluar la actividad tóxica del péptido sintético quimérico.
- iii) Definir el mecanismo de toxicidad del péptido quimérico β .
- iv) Evaluar si las regiones altamente estructuradas en las toxinas de tipo β (no modificadas en el péptido quimérico) están implicadas en la conformación del sitio activo.
- v) Evaluar si la longitud y las regiones conservadas de la estructura primaria de las toxinas, están involucradas en la capacidad inmunogénica inductora de anticuerpos neutralizantes del efecto de las toxinas.
- vi) Evaluar la presencia de epítopes neutralizantes en la toxina 2 de *C. noxius*, (utilizada como modelo de toxinas tipo β).
- vii) Evaluar la presencia de epítopes T, en las regiones que portan epítopes neutralizantes para el efecto de la toxina nativa.

Los resultados correspondientes a los experimentos realizados con la finalidad de abordar estos objetivos, se presentan en el anexo 2, integrados en una comunicación que se encuentra en preparación de la cual presentamos la versión en español (por tratarse de datos todavía no publicados).

También en éste mismo anexo presentamos los datos derivados del uso de péptidos sintéticos traslapados de la secuencia 1-40 y 61-65 de la toxina 2 de *C. noxius*, utilizados con la finalidad de evaluar las posibles regiones involucradas en la inducción de anticuerpos neutralizantes.

Anexo 2

Calderón-Aranda, E.S., Olamendi, T.P., Possani L.D. (En preparación)

Síntesis y caracterización inmunológica de péptidos correspondientes a la toxina 2 del escorpión *Centruroides noxius* Hoffmann.

ANEXO 1

**NEUTRALIZING CAPACITY OF MURINE SERA INDUCED
BY DIFFERENT ANTIGENS OF SCORPION VENOMS.**

TOXICON

Editor-in-Chief: Professor Alan Harvey
Department of Physiology and Pharmacology
University of Strathclyde
804 George Street
Glasgow
G1 1XW
Tel: 041 608 4166
Fax: 041 553 6376

September 7, 1992

Dr L.D. Possani
Instituto de Biotecnología - UNAM
Apartado Postal 510-3
Cuernavaca
MOR 62271
MEXICO

Dear Lourival

Manuscript number 92 92
E.S. Calderon-Aranda, D. Hosbor and L. D. Possani
**NEUTRALISING CAPACITY OF MURINE SERA INDUCED BY DIFFERENT
ANTIGENS OF SCORPION VENOMS**

I am pleased to tell you that your paper has been accepted for *Toxicon*. I have sent it to the publishers, and you should get proofs in a few weeks.

Yours sincerely


Alan Harvey



PERGAMON PRESS: OXFORD · NEW YORK · SEOUL · TOKYO

Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens
of scorpion venom.

by

Emma Soraida Calderon-Aranda, Daniela Hozbor and Lourival Domingos
Possani*

from

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad
S/No, Apartado Postal 510-3, CUERNAVACA - 62271, MEXICO

Running title: Scorpion venom anti-sera

Keywords: Scorpion anti-venoms, Centruroides noxius, neutralizing
antigens, serotherapy.

*Author to whom correspondence should be addressed:

Dr. Lourival D. Possani
Instituto de Biotecnología - UNAM
Apartado Postal 510-3
Cuernavaca, MOR. 62271 MEXICO

Telephone: (-) (52) (73) 172799
FAX: (-) (52) (73) 172388

SUMMARY

E. S. CALDERON-ARANDA, D. HOZBOR and L. D. POSSANI. Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venom. Toxicon 00, 0-0, 1992.

Approximately 700 people die in Mexico each year from scorpion stings. The only useful therapy available is anti-serum obtained from horses immunized with macerates of venomous gland from scorpions of the genus Centruroides. We report the results of experiments conducted with mice and rats in order to evaluate the relevant components of the venom from Centruroides noxius in the induction of a protective response against scorpion envenomation, either in vivo or in vitro. Gland macerates of whole telsons (stinger), soluble venom extracted by electrical stimulation, toxic fractions from gel filtration on Sephadex G-50 and highly purified toxin 2 from this scorpion venom were all used to produce hyper-immune mice and rats, which were challenged in vivo with the equivalent of the lethal dose 50% (LD₅₀) of soluble venom, or their sera were prepared for in vitro neutralization experiments using non immunized-animals.

The maximum neutralizing capacity (100%) was obtained when soluble venom was used as antigen, while purified toxin 2 produces 80% survival in vivo. The neutralizing capacity of murine anti-sera evaluated in vitro was: sera anti-fraction II > anti-toxin 2 > anti-total venom > anti-gland macerates of whole telsons. Two additional aspects were further investigated in the present work.

One is the demonstration by immunoblotting that proteins corresponding to the electrophoretic mobility of toxins known to block sodium channels are highly immunodominant in this venom. Second, there is an strong cross-reactivity of anti-sera produced with Centruroides noxius when assayed against venoms from other dangerous species of Centruroides scorpions from Mexico, but not against the Israeli scorpion Leiurus quinquestriatus. Finally, the immunodominance of toxic fractions in the immune-response was observed either with immunization using Freund's adjuvant or by means of adsorption to nitrocellulose membranes. This latter vehicle was shown to be an excellent detoxifying agent, without changing the immunogenicity of the toxins, as might occur with chemical treatment of these neurotoxic peptides.

INTRODUCTION

In Mexico, approximately 200,000 people annually are stung by scorpions, with a death rate of 700-800 persons, despite the fact that horse anti-serum is available and is used in most cases (MONROY-VELAZCO, 1961; DEHESA-DAVILA, 1989). Scorpionism is a real public health problem not only in Mexico (MAZZOTTI and BRAVO-BECHERELLE, 1963), but also in other areas of the world (BUCHERL, 1971; BALOZET, 1971; SHULOV, 1955). Scorpions dangerous to humans belong to the family Buthidae, in which the most representative genera are: Androctonus, Buthus, Centruroides, Leiurus and Tityus. Unfortunately, the literature on scorpionism and serotherapy are rather limited (DEHESA-DAVILA, 1989; HASSAN, 1984; EL AYE B and DELORI, 1984). The only specific medical treatment for envenomation by dangerous scorpions is the use of anti-sera, which are usually prepared in horses by inoculation of whole venom or telson macerates (RUIZ-CASTAÑEDA, 1933; GRASSET et al., 1946; MONROY-VELAZCO, 1961; BALOZET, 1971). However, the efficacy of the sera is low and the availability of anti-serum in remote areas of the country is scarce (DEHESA-DAVILA, 1989; BALOZET, 1971). Additional problems accompanying serotherapy are: the use of highly complex mixtures of antigens for production of horse anti-venom, which distracts the immunological response; the low titre of the sera, which requires injection of large amounts of horse immunoglobulins to patients. This in turn may lead to poor immunological protection against the venom, and may possibly cause serum sickness in the

victim.

Several questions were raised in the present research: 1) Are all components present in the venom of the scorpions relevant for the production of protective anti-serum in vivo and in vitro? 2) Which is the best anti-serum that should be used for an adequate protection of experimentally envenomed animals? 3) Since the primary structure of scorpion toxins are similar (ROCHAT et al., 1979; POSSANI, 1984), and common or shared epitopes are expected to be present among the distinct toxins, how much cross-reactivity exists when different venoms are tested with serum produced against C. noxius venom? Finally, 4) which is the best co-adjuvant vehicle for immunization?. We have chosen the scorpion Centruroides noxius Hoffmann as a model, and used five distinct antigenic preparations to immunize mice and rats. Furthermore, for the immunization protocol we have used similar amounts of antigens, based on lethality levels (relative concentration of toxins in different venom fractions), rather than on the weight of antigen or its protein content.

MATERIAL AND METHODS

Source of venoms.

Venoms from the scorpions Centruroides noxius, Centruroides limpidus limpidus, Centruroides limpidus tecomanus, Centruroides infamatus infamatus and Centruroides elegans were obtained in the laboratory by electric stimulation, centrifugation and storage as previously described (DENT et al., 1980). Venom from the scorpion Leiurus quinquestriatus quinquestriatus was purchased from Latoxan (Rosans, France). Telson macerates from Centruroides noxius were prepared by grinding and homogenization in water of the last postabdominal segment (which contains a pair of venom glands), followed by centrifugation (5000 x g) and recovery of the supernatant. This was freeze-dried and kept at -20 °C until used.

Antigens.

From the venom of C. noxius several antigens were used: whole gland macerates, soluble venom extracted by electric stimulation, sub-fractions I and II from the Sephadex G-50 column, and highly purified toxins II-9.2.2 (toxin 2), II-11.3, II-11.6 and II-13.6 (Possani, 1984; Zamudio et al., 1992).

Immunization.

Because several antigens were used, and to simplify our nomenclature, we will call "soluble venom" that extracted by electrical stimulation, while "telson macerates" refers to the

venom obtained by grinding the whole venom apparatus of the scorpions. Female CD1 mice (8-10 weeks old) and female Wistar rats (200 g) were used. Groups of 10-15 animals were used for each antigen. All groups were immunized subcutaneously four times at intervals of 15 days each. For telsons macerates, 538 μg were applied per animal (equivalent to 50 μg of soluble venom) after emulsification with Freund's complete adjuvant in the first immunization and with incomplete adjuvant in the last three injections. Soluble venom was injected in 50 μg doses to each animal. Two different vehicles were used: rats and one group of mice were injected with emulsified Freund's adjuvant, while venom adsorbed on nitrocellulose membrane was used for other groups of mice. The Sephadex G-50 fraction I was injected in one group of mice in 25 μg doses, emulsified with Freund's adjuvant, while fraction II was inoculated in Freund's adjuvant in 32.5 μg doses per animal (equivalent to the content of this fraction in 50 μg of soluble venom). Two immunization vehicles were also used for fraction II: emulsification with Freund's adjuvant for all rat groups and one of the mouse groups, and toxin adsorbed on nitrocellulose membrane for another mouse group. Toxin 2 was inoculated in 2.5 μg doses (equivalent to the content of this toxin in 50 μg of soluble venom), emulsified with Freund's adjuvant for the rat group and one mouse group, and adsorbed on the nitrocellulose membrane for another mouse group. Nitrocellulose membranes, capacity 80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, from Bio-Rad Lab. (Richmond, CA, U.S.A.) were cut in pieces of 0.45 cm^2 , adsorbed with the

appropriate antigens, dried, placed inside of needles (gauge 15) and injected into the animals with a metal piston which fits inside the needle. All animals were bled nine days after the third immunization. Sera were clarified by centrifugation (15 min at 10,000 x g), distributed in aliquots and frozen until used.

ELISA titration

Polyvinyl plates (Costar, cat. No. 2596, Cambridge, MA, USA) were coated with 250 nanograms per well of C. noxius, C. limpidus limpidus, C. limpidus tecomanus, C. infamatus infamatus, C. elegans or Leiurus quinquestriatus soluble venom, or 160 nanograms per well of C. noxius fraction II in 0.02 M sodium bicarbonate buffer pH 9.6. The wells were saturated with 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1 % gelatin in phosphate buffer with saline (PBS), at pH 7.4. Antiserum double serial dilutions in saturating solution (1% BSA, 0.1% gelatin, PBS buffer) were tested on the plates after incubation for 2 h at 37 °C. Commercial goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG), coupled to horseradish peroxidase (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA) and rabbit anti-rat IgG, coupled to horseradish peroxidase from DAKO Co. (Carpinteria, CA, USA) were used as second ligands, and o-phenyldiamine and hydrogen peroxide were used as substrate. The reaction was stopped with 4 N sulphuric acid and the absorbance measured in an ELISA reader, model 1550 EIA (BioRad Lab., Richmond, CA, USA).

Electrophoresis and Western Blot

Soluble venoms from the scorpions studied, as well as the sub-

fractions and purified toxins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) containing 20 % acrylamide, in acetic acid-urea buffer (SMITH, 1984) with constant voltage at 120 V. Gels were either stained with Coomassie blue G-250 or transferred on nitrocellulose membrane, both to the cathode (+) and to the anode (-), using Tris-glycine buffer pH 9.0 at constant voltage (70 volts) for 8 h, at 4 °C (modified from TOWIN et al., 1979). Nitrocellulose membranes with the transferred proteins were saturated with 1% BSA, plus 0.1 % gelatin for 2 h at room temperature.

Immunoblot

Nitrocellulose membranes, containing the antigens transferred from the preparative gel electrophoresis, were cut in 5 mm wide strips and incubated with anti-sera (1:300 dilution), overnight, at 37 °C, under agitation. Preparative gels in 20% acrylamide, were run with 1 mg of sample, using a 12.5 cm large slab gel plate. The sera used for these experiments came from mice immunized against soluble venom and sub-fraction II of C. noxius by using both Freund's adjuvant and nitrocellulose-adsorbed antigens. A control with nonimmune serum was run in parallel. Immunoblot analysis of the different fractions from C. noxius and from soluble venom of the other scorpions studied was also performed with antiserum (1:300 dilution) obtained from mice immunized with C. noxius soluble venom in Freund's adjuvant. The incubation time was 12 h at room temperature under agitation. Binding of specific antibodies was

detected with horse-radish peroxidase labeled goat IgG anti-mouse IgG (BioRad Lab., Richmond CA, USA). Substrates were 3,3'-diaminebenzidine and hydrogen peroxide, in 0.05 M phosphate buffer pH 7.4. The reaction was stopped by washing with the same buffer, without substrates.

Neutralization assays

In vivo assays.

For these experiments, groups of mice and rats immunized with different antigens were challenged by injecting intraperitoneally the amount equivalent to 1 LD₅₀ of soluble venom from C. noxius (0.1 µg/g weight of rats and 0.26 µg/g weight of mice), nine days after the fourth immunization. A group of ten normal animals was used as control. Survival was read 24 h after challenge.

Passive neutralization assays.

All rats, immunized with different sets of antigens in Freund's adjuvants, were bled after the third immunization. Their sera were recovered, pooled within the same experimental group of animals and kept at -20 °C until used. The neutralizing capacities of the immune sera were estimated by the graphical method of IPSEN (1938) and techniques further described by DELORI et al. (1976) and reviewed by CHRISTENSEN (1979). The experiments were performed using four animals (18-20g) for each point, and the mixtures of sera and C. noxius soluble venom were incubated for 1 h at 37 °C with agitation prior to intraperitoneally injections. Survival was read 24 h after challenge, and the neutralizing capacity of 1 ml antiserum was graphically estimated.

RESULTS

Fig.1a and 1b show the ELISA titration curves obtained with the sera of immunized rats. Mice sera gave essentially the same curves (data not shown). In Fig.1a the wells of the plates were covered with soluble venom from C. noxius, and in Fig.1b with fraction II from Sephadex G-50 from the same venom. The anti-sera titrated came from each of the following groups of immunized rats (using Freund's adjuvant as vehicle): telson macerates, soluble venom, fraction II and toxin 2. These results indicate that the titre obtained from animals immunized with soluble venom and fraction II are overlapping, while telson macerates is slightly higher and toxin 2 slightly lower (Fig.1a). Similar results are shown in Fig.1b.

In order to test the humoral response of mice against different antigens inoculated with distinct vehicles, 4 combinations of antigens were used to immunize groups of 10 animals each: C. noxius soluble venom with Freund's adjuvant or bound to nitrocellulose, and fraction II from the same venom, also with either Freund's adjuvant or bound to nitrocellulose. Fig.1c shows the ELISA titration curves obtained when assayed against soluble venom, and Fig.1d when assayed against fraction II. In both figures it can be seen that immunization with the help of Freund's adjuvant gives a better titre than that of nitrocellulose membrane bound antigens. However, the experiments performed with the second vehicle show that adsorption of toxic components to nitrocellulose membranes eliminates the toxicity of the antigens, or at least decreases it

so much that no intoxication symptoms can be observed in the injected animals. Overlapping titres were obtained when animals were immunized with either soluble venom or fraction II as antigens, and comparable results were observed when the ELISA was measured against soluble venom (Fig.1c) or fraction II (Fig.1d). The experiments shown in the Western blots of Fig.2 were designed to evaluate the antigenic immunodominance of two distinct antigens inoculated with two different adjuvants in mice. The antisera were prepared in the same manner as for Fig.1c and 1d above. Fig.2a shows the protein staining with Coomassie blue of soluble venom and fraction II from C. noxius separated by gel electrophoresis. Fig. 2b shows the results of immunoblot from soluble venom of C. noxius separated by gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose, either by Western blotting to the cathode (+) or to the anode (-), and stained with five different sera (dilution 1:300). The non immune serum gave negative staining, as expected for a control (lane 1). Lane 2 (soluble venom) shows at least 9 bands of immunorecognition, situated in the middle and inferior part of the blot, while for lane 4 (fraction II) at least 7 bands are visible in the middle of the gel. Staining with antisera generated by means of membrane-bound antigen shows at least 5 bands for soluble venom (lane 3) with two in the middle and three in the upper gel, and six bands for fraction II (lane 5) all situated at the middle of the gel. The constant immunoblot bands, for all the antisera assayed, were located in the middle part of the gel, where many scorpion toxins migrate in this gel electrophoresis system. Anti-sera

against fraction I revealed positive bands only at the higher molecular weight forms of the venom (data not shown).

In order to confirm the immunodominance found, the experiments of Fig. 2c were conducted, using purified toxins from C. noxius. This venom contains two well defined classes of toxins (POSSANI, 1984): short-chain peptides (39 amino acid residues long with molecular weight about 4,000), which are blockers of K⁺-channels, and long-chain peptides (61-66 residues and molecular weight about 7,500), which act on Na⁺-channels. Fig 2c was obtained by running into the gel purified toxins: toxin 2 (lane 1), II-13.3 (lane 3) and II-13.6 (lane 4), all Na⁺-channel blocking toxins. In lane 2, toxin II-11-6, a K⁺-channel toxin with lower molecular weight, was applied. The antiserum used for the blot was obtained from mice immunized against soluble venom in Freund's adjuvant. The positions of the positive immunoblots for toxins that block Na⁺-channels correspond to the same intense and constant positions of the results obtained in Fig. 2b, suggesting that these are immunodominant antigens of the venom from C. noxius. The position of the immuno-reactive band, in lane 2, is also consistent with our interpretation of the data obtained.

In order to test the in vivo neutralizing capacity of different antigens, groups of 10 animals each (both mice and rats) were immunized (see Material and Methods) with C. noxius telson macerates, soluble venom, fraction I from Sephadex G-50, fraction II from Sephadex G-50, and highly purified toxin 2, the major Na⁺-channel blocking peptide in this venom (POSSANI, et al., 1981).

Separation of venom from C. noxius in Sephadex G-50 yields 3 main fractions, from which fraction II corresponds to approximately 63% of the material recovered from the column and is the only fraction toxic to mice (POSSANI et al., 1981). Fraction III contains low molecular weight peptides, nucleotides, lipids and other ninhydrin-positive components. Since the latter fraction is nontoxic to mice, it was not used for immunization. Fraction I was used, because it contains high molecular weight components, and could be taken as an internal control for nontoxic proteins of the venom. After immunization (see Material and Methods), 10 animals of each group, were challenged with an amount of soluble venom equivalent to 1 LD₅₀ per animal. Fig 3 shows that 10 mice used as control gave 50% survival, as expected. The same result was obtained with fraction I, indicating that this fraction does not produce neutralizing antibodies against the toxins. However, animals immunized with telson macerates, soluble venom and fraction II, all with Freund's adjuvant as vehicle, survived, i.e., complete protection was obtained. The animals immunized with soluble venom and fraction II adsorbed to nitrocellulose membranes were partially protected with a survival level of 90% and 80%, respectively. Immunization with purified toxin 2 on nitrocellulose membrane, also gave 80% survival. Table 1 shows the results of passive neutralization capacity of anti-sera obtained from rats immunized against telson macerates, soluble venom, fraction II and toxin 2. The best protection was obtained with serum anti-fraction II (432 µg of venom per ml of anti-serum). This neutralizing capacity was 1.6

times more effective than that of anti-soluble venom and 2.7 times more effective than that of anti-telson macerates sera. Anti-toxin 2 sera was similar to that obtained with venom anti-serum. For comparative purpose the neutralizing capacities expressed as LD₅₀ values (for CD1 mice) are also included in Table 1.

Finally, the C. noxius fraction II anti-serum of immunized mice with Freund's adjuvant, was used to test for the presence of similar or cross-reacting epitopes in the venom of five different species of scorpions from the genus Centruroides, and one from the genus Leiurus. Fig.4 shows ELISA titration curves from this experiment. There is marked cross-reactivity of the hyperimmune serum of C. noxius with that of four other species of the same genus, while there was no or very low reactivity with venom from Leiurus quinquestriatus. These results were further corroborated by immunoblot as shown in Fig.5, using the soluble venom anti-serum and venoms used in Fig.4. The strongest positive bands of the gel correspond to the migration positions of the Na⁺-channel toxins. Two or three components of higher molecular forms also gave positive immuno-reaction with the serum against soluble venom of C. noxius. Only C. limpidus limpidus venom gave a positive band in the position correspondent to the electrophoretic migration of toxins directed against K⁺-channels. The venom of Leiurus quinquestriatus gave negative results, as expected from the titration curve (Fig.4).

DISCUSSION

We have chosen the scorpion Centruroides noxius Hoffmann from the state of Nayarit as a model, because it has the most potent LD₅₀ in mice, about 5 µg/20 g mouse weight (DENT et al., 1980) and it is one of the best studied scorpions of Mexico (POSSANI, 1984; POSSANI et al., 1981; ZAMUDIO et al., 1992). Several antigenic preparations were used for immunization of rats and mice. The anti-sera obtained with the different antigens show comparable immunogenic capacity (Fig. 1a and 1b), despite the fact that different amounts of protein were injected for immunization (2.5 µg of toxin 2, 32.5 µg of fraction II, 50 µg of soluble venom and 538 µg of macerates, per each animal). It is worth mentioning that emulsification with Freund's adjuvant makes the venom and their fractions less readily available to the animals, allowing immunization with higher amounts of toxic components than their LD₅₀ values in solution. Even though, the amounts of antigen used in this report are 100 and 1000 fold less than that reported by DELORI et al. (1976) in their studies with the toxic fraction and purified toxins from the North-African scorpion Androctonus australis. Soluble venom and fraction II of C. noxius were capable of eliciting specific antibody responses, both in mice and in rats, immunized either in presence of Freund's adjuvant, or through absorption on nitrocellulose membranes. The medium dilution doses obtained from the titration of anti-sera with these adjuvants is different (Fig. 1c and 1d). For Freund's adjuvant it is 1/6300 (anti-Log -3.8), while for membrane bound antigens it

is 1/400 (anti-Log -2.6). The experiments performed with the second vehicle show that adsorption of toxic components to nitrocellulose membranes decreases or eliminates the toxicity of the antigens. Thus, adsorption to nitrocellulose detoxifies the venom without changing the quality of the immunological responses. In the case of Freund's adjuvant, previously mentioned, symptoms of intoxication are commonly observed. Scorpion and snake toxins have been detoxified by chemical modifications and shown to change considerably their immunological capacities (DELORI *et al.*, 1976; HEBERSETZER-ROCHAT and SAMPIERI, 1976). The results of immunoblot obtained in our experiments of Fig.2 indicate that in both cases the protein bands correspond to the electrophoretic mobility expected for known scorpion toxins. In this manner, one of our original questions concerning the best vehicle for immunization is partially answered. Freund's adjuvant gives a better titre, but membrane adsorbed material is detoxified and is still a good immunogenic antigen.

The results of Fig.3 answer another question, because animals immunized with telson macerates, soluble venom and fraction II (all emulsified in Freund's adjuvant) are excellent antigens, protecting 100% of the experimental animals when challenged directly in vivo. The protection obtained is less evident using membrane-adsorbed antigens: 90% and 80% survival for soluble venom and fraction II, respectively. Similar results were obtained with animals immunized with toxin 2 adsorbed on nitrocellulose. The latter experiment suggests the existence of shared epitopes among the Na⁺ channel

blocker toxins in the venom of C. noxius. In fact, the amino acid sequences of various toxins isolated from C. noxius show extended similarities (ZAMUDIO et al., 1992). The unprotected mice (20% death) could be intoxicated by other components, such as noxiustoxin (POSSANI et al., 1982; CARBONE et al., 1982), which are definitively distinct peptides. Also it is interesting to note that animals immunized with fraction I were not protected when challenged with soluble venom (Fig. 3). Thus, another original question is answered, i.e., not all the components of the venom are important for production of neutralizing antibodies. The results of passive neutralization capacity shown in Table 1 indicate that the best antigen preparation to be used for immunization is fraction II from Sephadex G-50 column, followed by highly purified toxin 2 and soluble venom. Telson macerates are less effective. These data taken together with the in vivo neutralization experiments (Fig.3) would support the proposition that the best mixture of antigens for obtaining highly specific sera with adequate titre is either a mixture of partially purified fractions containing toxins of a given scorpion venom, like fraction II from Sephadex G-50 column, or even better, the combination of a few highly purified toxins from different scorpion venoms, as discussed below. Similar conclusions were proposed by other authors working with venom from Androctonus mauretanicus mauretanicus scorpion (EL AYEB and DELORI, 1984).

The cross-reactivity among venoms from different species or genus of scorpion was also addressed. Our results, shown in Fig.4 and 5,

demonstrate that venoms from scorpions belonging to the genus Centruroides can be protected by anti-serum generated against fraction II of C. noxius, more probably because of cross-reactivity of similar toxins, which share common epitopes, while venoms from scorpions belonging to a different genus must be studied separately and specifically for each case, as shown here for Leiurus quinquestriatus venom.

ACKNOWLEDGMENTS

The Ph.D. scholarship obtained by Emma Calderon from DGAPA - UNAM is greatly acknowledged. This work was partially supported by grants from Howard Hughes Medical Institute No. 75191-527104, DGAPA-UNAM No. IN202689 and IN300991, and CONACyT-México No.0018-N9105. Helpful discussions with Dr. Alejandro Alagón and technical assistance of Elizabeth Mata and Claudia Díaz are acknowledged.

REFERENCES

- BALAZET, L. (1971) Scorpionism in the old world. In: Venomous Animals and Their Venoms, vol. 3, pp. 349-371 (Bucherl, W., and Buckely, E.E., Eds.). New York: Academic Press.
- BUCHERL, W. (1971) Classification, Biology, and venom extraction of scorpions. In: Venomous Animals and Their Venoms, vol. III, pp. 317-347 (Bucherl, W., and Buckely, E.E., Eds.). New York: Academic Press.
- CARBONE, E., WANKE, E., PRESTIPINO, G., POSSANI, L.D., and MAELICKE, A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxins, Nature 296,90-91.
- CHIRSTENSEN, P. A. (1979) Production and standardization of antivenin, Handbook of Experimental Pharmacology, 52, 825-846.
- DEHESA-DAVILA, M. (1989) Epidemiological characteristic of scorpion sting in Leon, Guanajuato, Mexico. Toxicon 27, 281-286.
- DELORI, P., MIRANDA, F. and ROCHAT, H. (1976) Some news and comments about a rational and efficient antivenomous serotherapy, in: Animal, Plants and Microbial Toxins. vol. 2, pp. 407-420 (Ohsaka, A., Hayashi, K. and Sawai, Y. Eds), New York: Plenum Press.

- DENT, M., A., R., POSSANI, L. D., RAMIREZ, G. A., and FLETCHER, P., L. (1980) Purification and characterization of two mammalian toxins from venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Toxicon 18, 343-350.
- EL AYEZ, M. and DELORI P. (1984) Immunology and Immunochemistry of scorpion neurotoxins In: Handbook of Natural Toxins. vol. 2, pp. 607-638. (Tu, A.T. Ed.). New York: Marcel Dekker Inc.
- GRASSET, E. SCHAAFSMA, A. and HODGON, J.A. (1946) Studies of the venom of South African scorpions (Parabuthus, Hadogenes, Opisthophthalmus) and the preparation of a specific anti-scorpion serum. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 39, 397-421.
- HASSAN, F. (1984) Production of scorpion antivenin. In: Handbook of Natural Toxins. vol. 2, pp. 577-605 (Tu, A.T. Ed.). New York: Marcel Dekker Inc.
- HABERSETZER-ROCHAT, C., and SAMPIERI, F. (1976) Structure-function relationships of scorpion neurotoxins. Biochemistry 15, 2254-2261.
- IPSEN, J. (1938) Progress report on the possibility of standardizing anti-snake venom sera. Bull. Hlth. Org. L.o. N. 7, 785-801.

MAZZOTTI, L. and BRAVO-BECHERELLE, M.A. (1963) Scorpionism in the Mexican Republic. In: Venom and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Area, pp. 119-131 (Keegan, H.L., and MacFarlane W.V., Eds.). London: Pergamon Press.

MONROY-VELASCO, J. (1961) Alacranes venenosos de México. El suero anti-alacrán, su titulación y dosificación. Revista Mexicana de Ciencias Médicas-Biológicas, 6, 41-46.

POSSANI, L., D. (1984) Structure of Scorpion Toxins. In: Handbook of Natural Toxins. vol. 2 pp. 513-550 (Tu, A.T. Ed.). New York: Marcel Dekker.

POSSANI, L., D., DENT., M.A.R., MARTIN, B. M., MAELICKE, A., and SVENDSEN I. (1981) The amino terminal sequence of several toxins from venom of the Mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 46, 207-214.

POSSANI, L. D., MARTIN, B. M., and SVENDSEN, I. (1982) The primary structure of Noxiustoxin: A K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 47, 285-289.

ROCHAT, H., BERNARD, P., and COURAUD, F. (1979) Scorpion Toxins: Chemistry and mode of action. In: Adv. Cytopharmacology.. vol. 3, pp. 325-334 (Ceccarelli, B., and Clementi, F. Eds.). New York:

Raven Press.

RUIZ-CASTAÑEDA, M. (1933) Preparación del suero anti-alacrán y su titulación. Boletín del Instituto de Higiene (México), 6, 199-208.

SHULOV, A. (1955) On the poison scorpions in Israel. Harefuh 49, 1-3.

SMITH, B., J. (1984) Acetic acid-urea polyacrylamide. In: Methods in Molecular Biology, vol. 1, pp. 63-73 (Walker, J.M., Ed.). Clifton, N.J.: The Humana Press Inc.

TOWIN, H., STAEHELIN, T. and GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. Proc Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354.

ZAMUDIO, F., SAAVEDRA, R., MARTIN, B.M., GURROLA-BRIONES, B.G., HERION, P., and POSSANI, L.D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Eur. J. Biochem. 204, 281-292.

LEGEND FOR FIGURES

Figure 1: Titration of anti-sera.

In A, soluble venom (0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$) and in B, fraction II from Sephadex G-50 (0.16 $\mu\text{g}/\text{well}$) were adsorbed to the ELISA plates and revealed with rat anti-sera against gland macerates (open squares), soluble venom (open triangles), fraction II (closed circles), and highly purified toxin 2 (open circles). In C, soluble venom (0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$) and in D, fraction II from Sephadex G-50 (0.16 $\mu\text{g}/\text{well}$) were adsorbed to the ELISA plates and revealed with mice anti-sera against soluble venom (open squares) and fraction II (open triangles) from animals immunized by means of Freund's adjuvant as a vehicle. Similarly, mice anti-sera against soluble venom (closed circles) and fraction II (open circles) from animals immunized with nitrocellulose membrane as vehicle. All values (A-D) are mean of triplicate determinations. The values of negative control (pre-immune sera) were subtracted in these figures; they were in the order of 0.1 unit at 492 nm.

Figure 2: Gel electrophoresis separation and immunoblotting with specific sera.

A. Preparative PAGE separation of C. noxius soluble venom (lane 1, 40 μg protein) and fraction II from Sephadex G-50 (lane 2, 40 μg protein), both stained with Coomassie blue R-250.

B. Soluble venom from C. noxius was separated as in A followed by western-blotting to the anode (+) and to the cathode (-). Lane 1

shows control with serum of non immune mice, lane 2 is mice anti-sera against soluble venom with Freund's adjuvant, lane 3 is anti-sera of mice immunized against soluble venom adsorbed to nitrocellulose membranes, lane 4 corresponds to mice anti-sera against fraction II in Freund's adjuvants and lane 5 fraction II in nitrocellulose membrane.

C. Highly purified toxins from C. noxius were run in PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and revealed with anti-sera from mice immunized against soluble venom emulsified in Freund's adjuvant. Lane 1 (30 μ g) of toxin 2, lane 2 (40 μ g) of toxin II-11.6, lane 3 (15 μ g) of toxin II.13.3 and lane 4 (30 μ g) of toxin II.13.6. This picture shows an immunoblot from western to the cathode only, because the same result was obtained with protein transferred to the anode.

Experiments B and C were performed with serum dilution of 1:300.

Figure 3: In vivo challenge of immune animals.

In vivo challenge of immunized animals with soluble venom equivalent to a LD₅₀dose. Number 1 is a control experiment showing 50% survival (LD₅₀) for both mice and rats. Survival of rats immunized against telson macerates is represented in 2. In 3 and 4 are survival of mice immunized against soluble venom adsorbed to nitrocellulose and Freund's adjuvant, respectively. In 5 and 6 are survival of mice immunized against fraction II from Sephadex G-50 in nitrocellulose and Freund's adjuvant, respectively. Number 7 is survival of mice immunized with non toxic fraction I from Sephadex

G-50 and 8 is survival of mice immunized against highly purified toxin 2 in nitrocellulose membranes. For each experiment groups of 10 animals were used.

Figure 4: ELISA titration of serum cross-reactivity .

Serial dilutions of mouse anti-serum against Sephadex G-50 fraction II of C. noxius were assayed for cross-reactivity using venom (0.25 μ g/well) from different species of scorpions: C. noxius (open triangles upward oriented); C. elegans (closed circles); C. limpidus limpidus (open squares); C. infamatus (open circles); C. limpidus tecomanus (open triangles downward oriented) and Leiurus quinquestriatus (closed triangles upward oriented). Values are means of triplicates.

Figure 5: Cross-reactivity by immunoblot.

PAGE separation of soluble venom (80 μ g for each lane) from Cn (C. noxius), Cl1 (C. limpidus limpidus), Cii (C. infamatus), Lqq (Leiurus quinquestriatus), Ce (C. elegans) and Clt (C. limpidus tecomanus) were transferred to nitrocellulose membrane and immunodetected with mice anti-serum against soluble venom of C. noxius at a dilution of 1:300. Arrow indicates position of noxiustoxin-like peptides.

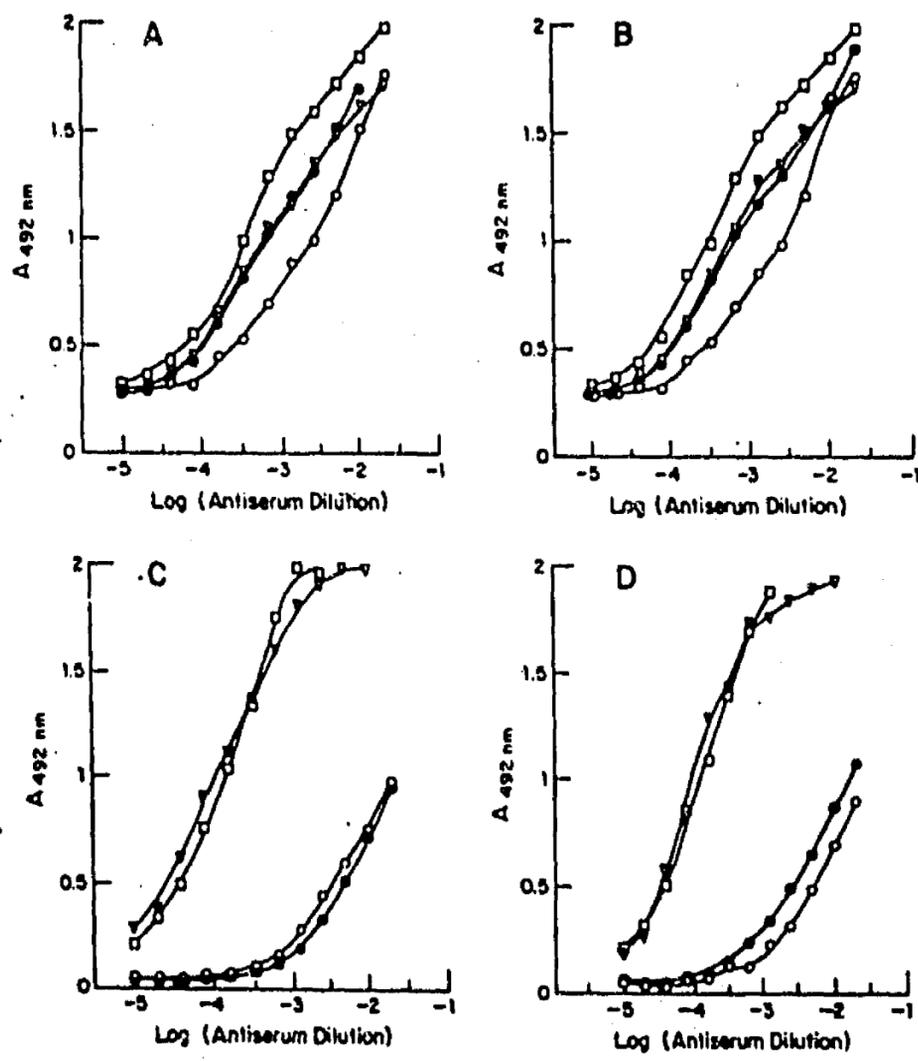


Figure 1

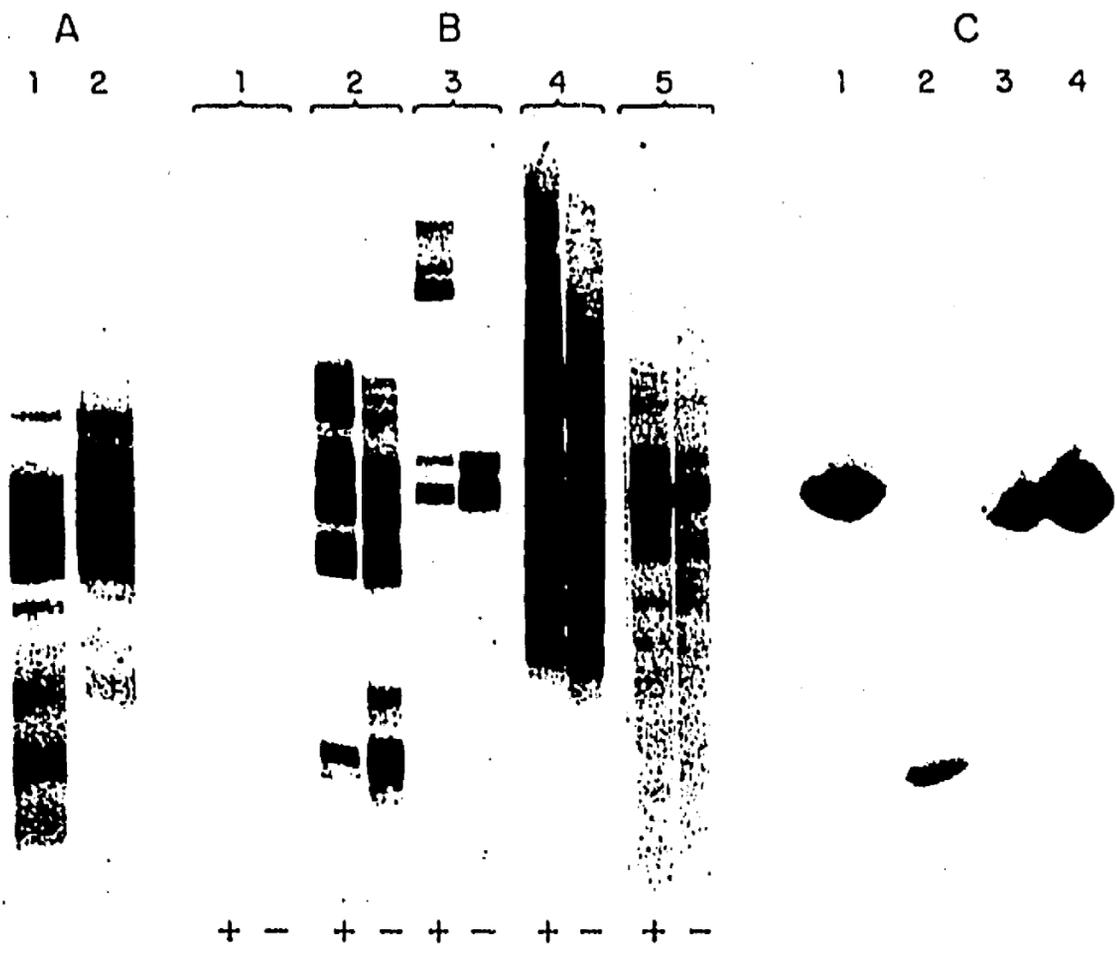


Figure 2

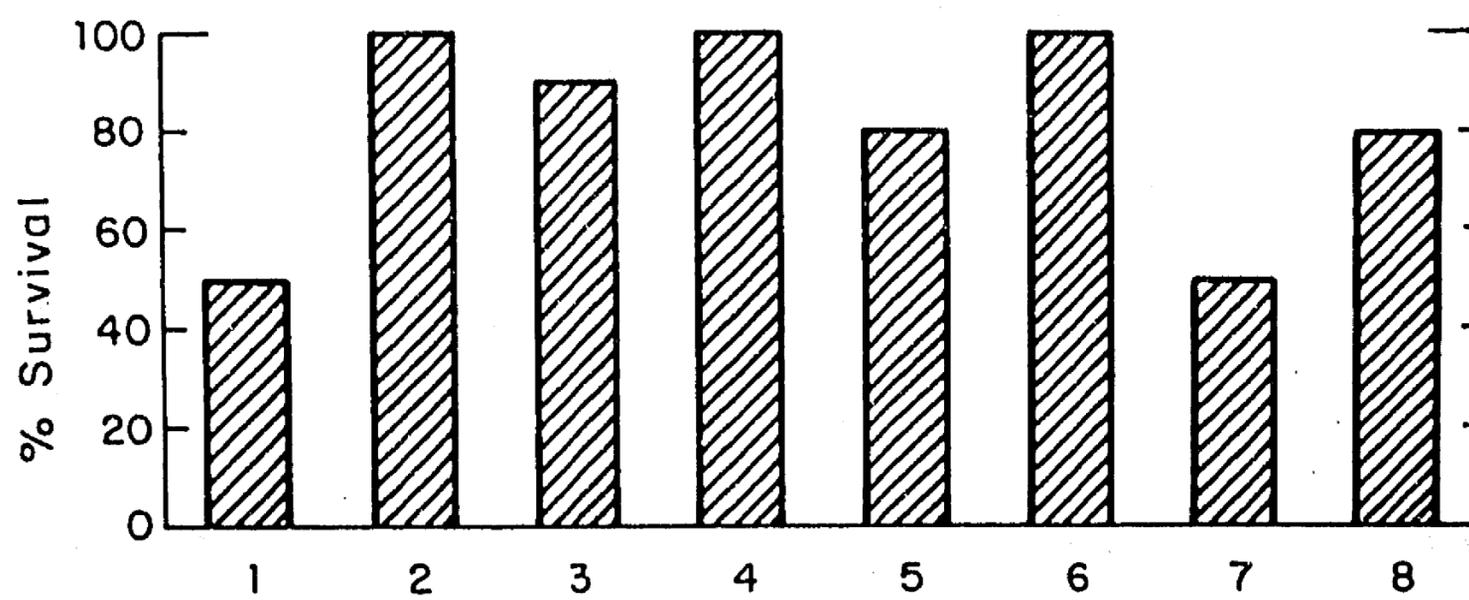


Figure 3

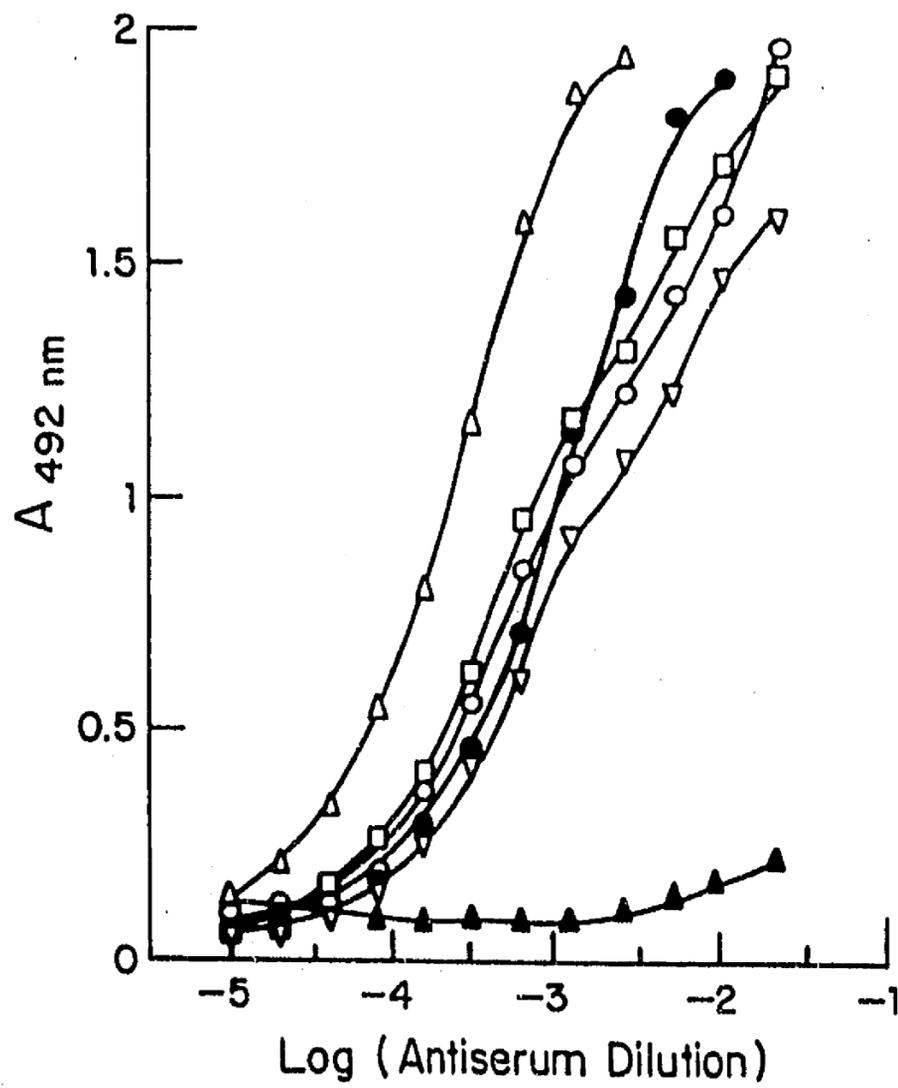


Figure 4

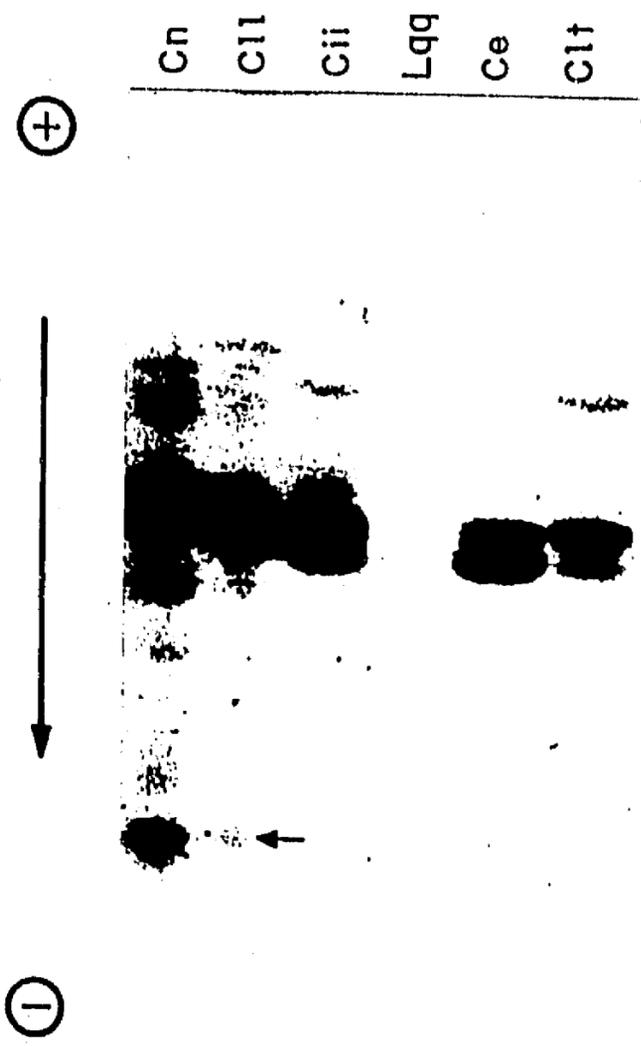


Figure 5

TABLE 1. Neutralizing capacity of different antisera against total venom from C. noxius

Antisera	Venom neutralized/ml serum (micrograms)	Number of LD ₅₀ protected/ml serum
Telson macerates	160	30
Whole venom	262	50
Fraction II	432	83
Toxin 2	298	57

ANEXO 2

SINTESIS Y CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE PEPTIDOS

CORRESPONDIENTES A LA TOXINA 2 DEL ESCORPION

***Centruroides noxius* HOFFMANN.**

**Síntesis y caracterización Inmunológica de péptidos correspondientes
a la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann.**

POR

**Emma S. Calderón-Aranda, Timoteo Olamendi P.
y Lourival D. Possani,**

**Departamento de Bioquímica, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México.**

INTRODUCCION

El veneno de los alacranes es una mezcla de más de 20 proteínas diferentes, la mayoría de ellas de bajo peso molecular. Algunas de estas moléculas son polipéptidos con actividad tóxica sobre canales iónicos de diferentes especies animales (Zlotkin *et al.* 1978; Catterall, 1976; Possani, 1984). Se dividen en toxinas de cadena corta -30 a 39 aminoácidos- (Carbone *et al.* 1982; Possani *et al.* 1982) que tienen actividad bloqueadora sobre canales de potasio, y toxinas de cadena larga -60-70 aminoácidos-, con actividad sobre canales de sodio (Catterall, 1977; Couraud *et al.* 1982) a nivel del mecanismo de inactivación -toxinas tipo α - (Nonner, 1979) y sobre la activación del canal -toxinas tipo β - (Meves *et al.* 1986; Strichartz *et al.* 1987). Esta división presenta una alta correlación con el agrupamiento que también se ha realizado a partir de la homología en su estructura primaria (Possani *et al.* 1985).

Actualmente, no se ha definido con exactitud los sitios activos de las toxinas, ni como la homología y diferencias en la estructura primaria contribuye a los diferentes mecanismos de acción de las toxinas. Sin embargo, resultados experimentales sugieren que el sitio activo de las toxinas β para canales de sodio está localizado en el extremo amino terminal (Gurrola, 1986; El Ayeb *et al.* 1986b).

Las toxinas para canales de sodio a pesar de su bajo peso molecular (7 000 Da), son buenos inmunógenos y generadores de anticuerpos neutralizantes (El Ayeb y Delori, 1984; Calderón *et al.* en prensa), aún cuando no se han definido las regiones relevantes para la inducción de la respuesta inmune humoral protectora. Algunos estudios acerca de la capacidad antigénica de estas toxinas ha sido realizados por el grupo de Rochat (Rochat *et al.* 1979; El Ayeb *et al.* 1983; Ayeb *et al.* 1986a; 1986b; Bahraoui *et al.* 1986; Bahraoui *et al.* 1987; Granler 1989) utilizando la toxina II de *Androctonus australis* Hector como modelo de estudio (toxina de tipo α).

En el presente trabajo nos proponemos evaluar las posibles regiones Inmunogénicas de una toxina tipo β , con actividad bloqueadora sobre canales de sodio. Para ésto utilizamos como herramienta péptidos sintéticos traslapados de la secuencia de esta toxina y una toxina

quimérica sintética de tipo β , ésto con el objeto de evaluar algunas regiones de la toxina como portadoras de actividad tóxica y de epítopes neutralizantes y epítopes para linfocitos T murinos.

Como toxina β modelo utilizamos la toxina 2 de *C. noxius*. Esta corresponde al componente tóxico más abundante en el veneno de esta especie de alacranes, presenta una de las más bajas DL₅₀ (Dent *et al.* 1980) y ha sido secuenciada y caracterizada inmunológicamente (Zamudio *et al.* 1992).

MATERIAL Y METODOS

Fuente y purificación de la toxina 2

El veneno de alacranes *Centruroides noxius* colectados en el estado de Nayarit (México) se obtuvo por estimulación eléctrica de los telson. Se recuperó la fracción soluble en agua y se centrifugó a 10 000 x g. Se liofilizó y se guardó a -20 C, hasta su uso. La purificación y caracterización de la toxina se llevó a cabo siguiendo el procedimiento previamente descrito (Zamudio *et al.* 1992).

Síntesis Química de los péptidos y purificación

Los péptidos correspondientes a la secuencia de la toxina 2 se sintetizaron en fase sólida por el método de Merrifield (1963), mediante el uso de BOC-aminoácidos (Península Lab). La mayoría de los péptidos se sintetizaron manualmente, excepto el péptido largo (péptido quimérico) que contiene 57 residuos de aminoácidos, el cual se sintetizó en un sintetizador automático (Applied Biosystem) siguiendo el procedimiento implementado por la compañía. Al final de la síntesis los péptidos de la toxina 2 se purificaron por cromatografía líquida de alta presión (CLAP) en tanto que el péptido quimérico se purificó primero por filtración en gel en una columna de Sephadex G-50 (0.9 x 180 cm). La fracción correspondiente al péptido quimérico fue posteriormente separada por CLAP. La composición de los péptidos fue verificada después de cada etapa de purificación por análisis de aminoácidos de muestras hidrolizadas y derivatizadas preparadas de acuerdo al método de Bidlingmeyer *et al.* (1984) en un analizador de aminoácidos Durrum D-500 (Possani *et al.* 1977).

Ensayos de fijación de voltaje.

Los ensayos de voltaje sostenido se realizaron en células de la línea de neuroblastoma N18 (Kirsch *et al.* 1989) a 25 C. Los registros de corriente de Na⁺ se obtuvieron antes y ocho minutos después de agregar 9.2 µM del péptido quimérico. El potencial de mantenimiento fue

de -90 mV y los registros se filtraron a 5 KHz (-3 dB).

Ensayos de toxicidad.

Para evaluar la capacidad tóxica de los péptidos sintéticos, se utilizaron ratones CD1 de 20 g de peso corporal. Se probaron concentraciones crecientes de péptido sintético en buffer fosfato de sodio 0.015 M pH 7.2 y NaCl 0.15 M inyectadas intraperitonealmente en un volumen total de 200 microlitros. Se definió como letal los péptidos que causaron la muerte de los animales dentro de las 20 h posteriores a la inoculación y como tóxico los que indujeron el desarrollo de uno o más signos de intoxicación como sialorrea, excitabilidad, disnea, convulsiones, diarrea, taquicardia, pero que se recuperaron en el transcurso de las 20 h posteriores a la inoculación, y no tóxicos cuando no se desarrollaron datos de intoxicación.

Acoplamiento de péptidos a proteínas acarreadoras.

Los péptidos cortos se acoplaron a albúmina sérica bovina (BSA) o a tiroglobulina, como proteína acarreadora, por el método de Goodfriend *et al.* (1964) y consistió en lo siguiente: 2 mg de péptido se acoplaron a la proteína acarreadora mediante 13 mg de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreuro soluble en agua. La reacción se siguió por 2 hr con agitación a temperatura ambiente. La reacción se terminó por diálisis contra agua por 24 h.

Inmunización

Para la inmunización con los péptidos sintéticos cortos de la toxina 2 se utilizaron ratones hembras CD1 de 4 semanas de edad. Se formaron grupos de 5 animales para cada uno de los antígenos, y se inmunizaron subcutáneamente con 100 µg de péptido acoplado con tiroglobulina, emulsificado en adyuvante de Freund, por ratón, por inoculación. Para el péptido 1-27 también se inmunizó un grupo de ratones con el péptido sin acoplar. Para fines de

notación el péptido 1-27 acoplado se identificará con la letra T después del número (1-27T), para diferenciarlo del péptido solo. Se utilizaron las mismas dosis y condiciones que para los péptidos cortos acoplados a un acarreador. Para la inmunización con el péptido quimérico y la toxina 2 se utilizaron grupos de 10 ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad. El péptido quimérico se aplicó subcutáneamente, en dosis de 50 µg, emulsificado en adyuvante de Freund, por ratón, por dosis. Al grupo inmunizado con la toxina 2 se aplicaron dosis de 2.5 µg de toxina 2 adsorbida sobre tiras de membrana de nitrocelulosa de 0.2 cm² de membrana de nitrocelulosa con capacidad de 80-100 µg/cm² de BIO-RAD Lab. (Richmond, CA, USA) (El Ayeb y Delori, 1984; Calderón-Aranda *et al.* en prensa).

También fueron inmunizados conejos albinos Nueva Zelanda con el péptido 1-14M (Modificado) acoplado a tiroglobulina, el péptido quimérico y la toxina 2. El péptido 1-14M corresponde a la secuencia N-terminal 1 a 14 en la cual faltó el aminoácido de la posición número 2 (glutámico). La dosis aplicada por inmunización para el péptido 1-14M-tiroglobulina y para el péptido quimérico libre fue de 150 µg emulsificada con adyuvante de Freund. Para cada inmunización las dosis inoculadas se distribuyeron en 10 sitios sobre el dorso de los conejos. La vía de aplicación fue subcutánea. La toxina 2 se utilizó en dosis de 7.5 µg adsorbidos a tiras de membranas de nitrocelulosa como en los ratones, pero distribuidos en tres sitios sobre el dorso del conejo.

Para todos los grupos se utilizó un esquema de 4 inmunizaciones con intervalos de 2 semanas entre cada inoculación. Para los grupos en que se utilizó adyuvante de Freund, la primera inmunización se realizó con el antígeno emulsificado con adyuvante completo y para las tres subsecuentes se utilizó adyuvante incompleto.

Todos los grupos fueron sangrados 9 días posteriores a la tercera inmunización. Se obtuvo el suero y se guardó a -20 °C hasta su titulación en ELISA o su uso para los ensayos de neutralización pasiva.

Inmunización para ensayos de proliferación.

Se inmunizaron tres ratones BALB/c (H-2^d) de 8 semanas, con 0.5 µg de toxina 2 (volumen

total de 50 μ l) distribuido en los cojinetes plantares de las extremidades posteriores. Se aplicaron tres inmunizaciones con intervalos de 8 días entre cada una, la primera con adyuvante de Freund y las dos últimas con adyuvante incompleto.

Titulación en ELISA

Se cubrieron placas de polivinil (Costar, cat. No. 2596, Cambridge, MA, USA) con 5 μ g/pozo de los péptidos de la toxina 2 libres, 0.15 μ g/pozo de péptido quimérico o de toxina 2 en amortiguador de bicarbonato de sodio 20 mM pH 9.4. Se saturaron las placas con solución de: BSA 1% en 0.015 M de fosfato de sodio pH 7.8 y 0.15 M de NaCl (PBS) a 37 °C, por 1 h. Los sueros obtenidos de los diferentes grupos de ratones inmunizados o de los conejos se probaron en diluciones dobles seriadas a partir de 1:50 por incubación a 37 °C, durante 2 h. Como segundo ligando se utilizó IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA) o IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA). Como sustrato se utilizó o-fenilendiamina y H₂O₂. La reacción fue terminada con la adición de H₂SO₄ 4N y la absorbancia se midió en un ELISA reader modelo 1550 EIA (BioRad Lab. Richmond, CA, USA).

Ensayos de neutralización

Ensayos *In vivo*

Los grupos de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos de la toxina 2, el péptido quimérico y la toxina 2 fueron desafiados, nueve días después de la cuarta inmunización, inyectándoles intraperitonealmente una cantidad de toxina 2 equivalente a 1 DL₅₀ (.025 μ g/g para CD1 y .28 μ g/g para BALB/c) . Un grupo de diez animales no inmunes se utilizaron como control. La sobrevivencia se leyó 24 h después del desafío.

Ensayos de neutralización pasiva

Los conejos inmunizados con los diferentes antígenos fueron sangrados después de la cuarta

inmunización y el suero fue recuperado y utilizado para los ensayos de neutralización pasiva. El suero total y diferentes diluciones, en PBS, de los sueros fueron mezclados con una cantidad de toxina 2 equivalente a 1 DL₅₀. Se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación y se inoculó intraperitonealmente en ratones CD1 no inmunes. Se usaron 8 animales para cada grupo de sueros y sus diluciones. Como control se utilizó suero no inmune mezclado con 1 DL₅₀ de toxina 2. El volumen total de la mezcla inyectada se ajustó a 200 µl para todos los ensayos. La supervida se leyó a las 24 hr después del reto.

Ensayos de proliferación.

Un día después de la tercera inmunización, los ratones inmunizados con la toxina 2 se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales. Se preparó una suspensión celular a partir de los tres ratones, en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml / estreptomicina 100 µg/ml, 2-mercaptoetanol 5×10^{-6} , 5 % de suero fetal de bovino (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.) y HEPES 10 mM. Las células (10^5 células/pozo) se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de la toxina, el péptido quimérico β, los péptidos de la toxina 2, medio solo o Concanavalina A (1, 2.5 y 5 µg/ml). El volumen final de cultivo fue de 200 µl. Después de 72 h de cultivo a 37 °C en ambiente húmedo y 8% de CO₂, las células se pulsaron por 6 h con 0.5 µCi de (³H)timidina (2.0 Ci/ mmol, Amersham Int. Buckinghamshire Engalnd). Las células se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio con un cosechador (Combi Cell Harvester Skatron Ins. Inc. Sterling, VA.). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y al menos 3 experimentos independientes fueron realizados. Los resultados se reportan como índice de estimulación (IE). Este fue calculado de la siguiente forma: $IE = \frac{x \text{ cpm experimental}}{x \text{ cpm control}}$.

RESULTADOS

1. Síntesis de Péptidos.

Para definir las regiones de la toxina portadoras de epítopes inductores de anticuerpos neutralizantes de la actividad de la toxina 2, se sintetizaron varios péptidos correspondientes a la secuencia traslapada de la toxina (péptidos cortos). En la **tabla 1** se presenta la secuencia de la toxina 2 de *C. noxius* y la de los péptidos sintetizados que corresponden a la secuencia de esta toxina. Las regiones correspondientes a los péptidos sintetizados se eligieron considerando los siguientes criterios: 1) por resultados previos, se había sugerido que el extremo N-terminal estaba involucrado en la actividad tóxica de las toxinas tipo β , de manera que se enfatizó la síntesis de fragmentos correspondientes a ésta región, 2) que el tamaño mínimo de los péptidos fuera de 6 residuos y 3) no se incluyó la secuencia correspondiente a los residuos 43-60 debido a que estos son altamente hidrofóbicos, y son imposibles de manejar en soluciones acuosas fisiológicas.

En la **Tabla 2** se muestra la secuencia del péptido quimérico β y la de las toxinas de tipo α y β que se consideraron para su diseño con base en el alineamiento métrico previamente reportado (Possani *et al.*, 1985). El diseño del péptido quimérico se basó en los siguientes criterios: 1) Se mantuvieron intactas las posiciones de las cisteínas debido a que son importantes para el mantenimiento de la estructura tridimensional de la molécula, a través de la formación de puentes disulfuro. 2) Se respetaron las secuencias de aminoácidos en las regiones de la estructura primaria que se conoce, por difracción de rayos X, están involucradas en la formación de estructuras secundarias como son las α hélice y β plegada (Fontecilla-Camps *et al.* 1980). 3) Por experimentos realizados con péptidos sintéticos de la región N-terminal (Gurrola, 1986) que sugerían la intervención de esta parte de la molécula en fenómenos de letalidad en ratones, se decidió mantener sin cambio los aminoácidos de la región N-terminal de las toxinas β . El péptido quimérico empieza con lisina-glutámico-glicina-tirosina, como todas las toxina β , seguido por aminoácidos básico. 4) La región C-

TABLA 1

Lista de péptidos sintéticos traslapados de la secuencia de la toxina 2 de *C. noxius*.

	1	10	20	30	40	50	60
Cn2	KEGYLUDKNTGCKYECLKLGDNDYCLRECKQQGYKGAGGYCYAFACWCTHLYEQAIUWPLPNKACS						
1-10	KEGYLUDKNT						
1-14M	K GYLUDKNTGCKY						
1-14	KEGYLUDKNTGCKY						
1-27	KEGYLUDKNTGCKYECLKLGDNDYCLR						
22-36	NDYCLRECKQQGYKG						
30-40	KQQGYKGAGGY						
61-65	PNKSRC						

Rx	β plegada				α helice			β plegada			β plegada				
Toxinas tipo α	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Be10	VRDGYIADDK	DCAYFC			GRNAYCDEECKK			GAESGKCWYAGQYGNACWCYKLPDWPIKQKVSQKCN							
LIV	GVRDAYIADDK	NCVYTC			GSNSYCNTECTKD			GAESGYCQWLKGYGNACWCYKLPDKVPIRI	PGKCR						
LqqV	LKDGIVDDK	NCTFFC			GRNAYCNDECKKK			GGESGYCQWASPYGNACWCYKLPDRVSIKEK	GR	CN					
Aall	VKDGIVDDV	NCTYFC			GRNAYCNEECKL			KGESGYCQWASPYGNACWCYKLPDHRVTKG	PGR	CH					
Aal	KRDGYIVYPN	NCVYHC	V		PPCDGLCKKN			GGSSGSSCF	LVPSGLACWCKDLPDNPVPIKDTSRK	CT					
Toxinas tipo β															
Ts gama	KEGYLMDH	EGCKLSCFIR	PSGYCGRECGIK	KGSSGYC	AW	P		ACYCYGLPNWVKVWDRATNKC							
Cssl	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKSSGGYCYAF							ACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN							
CsV3	KEGYLVKSDGCKYGLKLGNEGCDTECKAKNQGGSYGYCYAF							ACWCEGLPESTPTYPLPNKSC							
CsV	KKDGYPVD	SGNCKYEC	L	KDDYCNDLCLER	KADKGYCYWGK			VSCYCGLPDNSPTKTTSG	K	CNPA					
Cn1	KDGYLVDK	GCKKNKYKLGNDYCNRECRMKHRGGSYGYCYGF						GCYCEGLSDSTPTWPLTNKTC							
Clt1	KEGYLVNHSTGCKYECFLGDN DYCLRECRQQYKGGAGGYCYAF							GCWCTHLYEQAVVWPLPNKTC							
Cn2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQGYKGGAGGYCYAF							ACWCTHLYEQAVVWPLPNKRCS							
PEPTIDO β QUIMERICO	KEGYLMKSDGC	C			NDYCLRECKQQGYKGGAGGYC	AG	P	AGCYC	KLGDG	VAG				TK	C
		GRGEG													
Comun		C	C	—	C	C		C	—	C	C				C
				loop J					loop B						

TABLA 2

Secuencia del péptido quimérico β y comparación de la estructura primaria de varias toxinas α y β por el método de análisis métrico, utilizadas para su diseño.

Las secuencias fueron alineadas y comparadas por el método de análisis métrico (Possani et al. 1985): Be10 es la toxina 10 de *Buthus eupeus*; LIV y LqqV son las toxinas IV y V de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*; Aall y Aal son toxinas de *Androctonus australis* Hector; Ts gama es la toxina gama de *Tityus serrulatus*; Cssl es una toxina de *Centruroides suffusus*; CsV3 y CsV son toxinas de *Centruroides sculpturatus* Ewing; Clt1 es una toxina de *Centruroides limpidus tecomanus*; Cn1 y Cn2 son toxinas derivadas de *Centruroides noxius* (Zamudio et al., 1992). En el extremo superior izquierdo de cada bloque está indicado el tipo de las toxinas según su mecanismo de acción. En la parte superior se muestra la estructura definida por difracción de rayos X (Fontecilla-Camps et al. 1980), señalándose las regiones que corresponden a α hélice y estructuras β plegada. La última secuencia de la tabla corresponde al péptido β quimérico diseñado a partir del alineamiento métrico de todas las toxinas nativas. En la parte inferior de la tabla se presentan los aminoácidos conservados y se señalan las regiones que corresponden a los loops para toxinas de tipo α y las de las toxinas β . (Tomado de Possani et al. 1985).

terminal fue modificada de forma importante: contiene menos aminoácidos que las formas nativas y los reemplazos son de secuencias tipo α . Esto podría indicar si el C-terminal está directamente involucrado en el sitio activo y a qué tipo de toxina corresponde. 5) Se confirió alta movilidad a la molécula mediante la introducción de gran número de glicinas (14 de 57 aminoácidos) para permitir el espaciado necesario del esqueleto de carbono y enlaces amidas (peptídicos) sin introducción de impedimentos estéricos por grupos laterales. 6) Las dos regiones de más alta variabilidad, correspondientes a las asas "J" y "B" (loops) fueron modificadas de manera que la región del asa "B" tuviera el menor número de residuos (típico de las toxinas β) e introducir deleciones en la región de la asa "J" (característica de las toxinas α). La finalidad fue explorar la posibilidad de obtener una molécula quimérica entre α y β , si es que las asas son regiones determinantes de la función de las toxinas de tipo α o β .

En la **tabla 3** se presenta una lista de los péptidos sintéticos utilizados en los ensayos de proliferación celular, para evaluar la presencia de epítopes T en la toxina 2 de *C. noxius*. Para estos experimentos se utilizaron, además de los péptidos traslapados a la secuencia 1-27 de la toxina 2, utilizados para los ensayos de inmunogenicidad, tres péptidos (4-14, 10-27 y 17-25) que cubren secuencias parciales dentro de los péptidos 1-14 y 1-27.

2. Caracterización química de los péptidos.

Los péptidos cortos se purificaron en CLAP en una columna C18 y posteriormente se realizó análisis de aminoácidos para determinar la fracción correspondiente a cada péptido. En la **figura 1** se presentan los cromatogramas de algunos de éstos péptidos. En todos los casos la fracción mayoritaria correspondió, en el análisis de aminoácidos a la secuencia esperada (datos no mostrados) y representó más del 60 % de la muestra total. El péptido quimérico se sometió primero a un paso de purificación en Sephadex G-50 medio en condiciones reductoras (ver **figura 2a**). Las fracciones obtenidas se sometieron a análisis de aminoácidos y la secuencia esperada correspondió a la Fracción II. Esta se sometió a un segundo paso

TABLA 3

Lista de péptidos sintéticos traslapados a la secuencia de la Toxina 2 de *C. noxius*, utilizados para evaluar la capacidad de inducir respuesta proliferativa, *in vitro*, en ensayos de proliferación de células de ganglio linfático de ratón BALB/c estimulados *in vivo* con la Toxina 2.

	1	10	20	30	40	50	60
Cn2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDN	NDYCLRECKQQGYKGAGGYCYAFACWCTHLYEQAIWPLPNKRCS					
PS β	KEGYLMKSDGC	C	NDYCLRECKQQGYKGAGGYC	AGGCYC	KLGDG	VAG	TK C
		GRGEG		PA			
1-10	KEGYLVDKNT						
1-14M	K GYLVDKNTGCKY						
1-14	KEGYLVDKNTGCKY						
4-14	YLDKNTGCKY						
10-27		TGCKYECLKLGDN	YCLR				
1-27	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDN	YCLR					
17-25			LKLGNDYC				

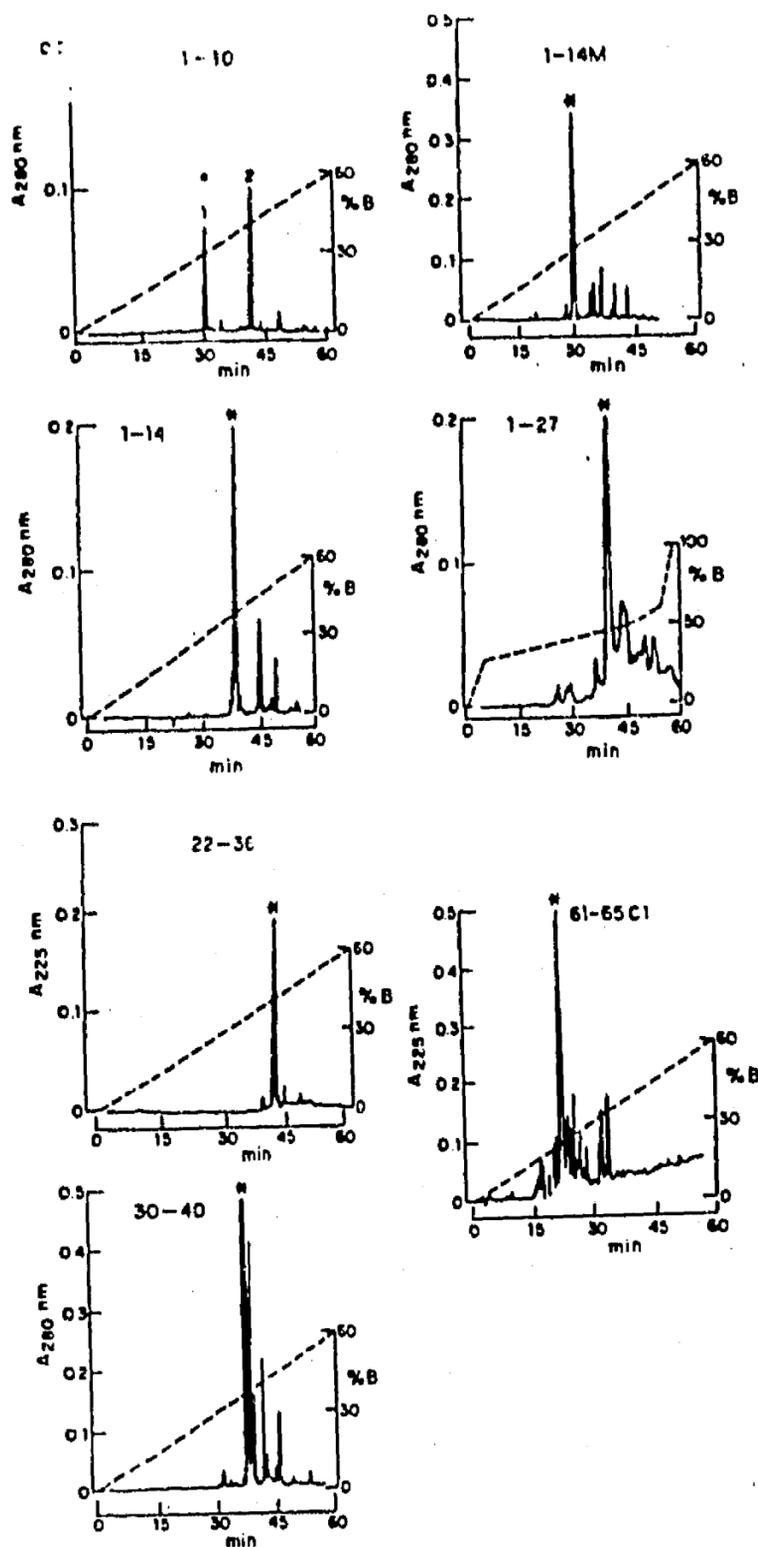
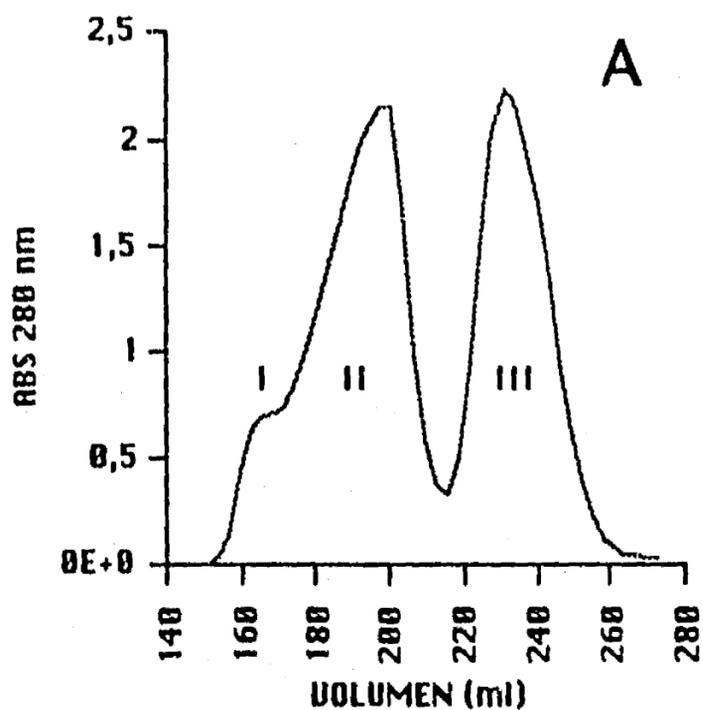


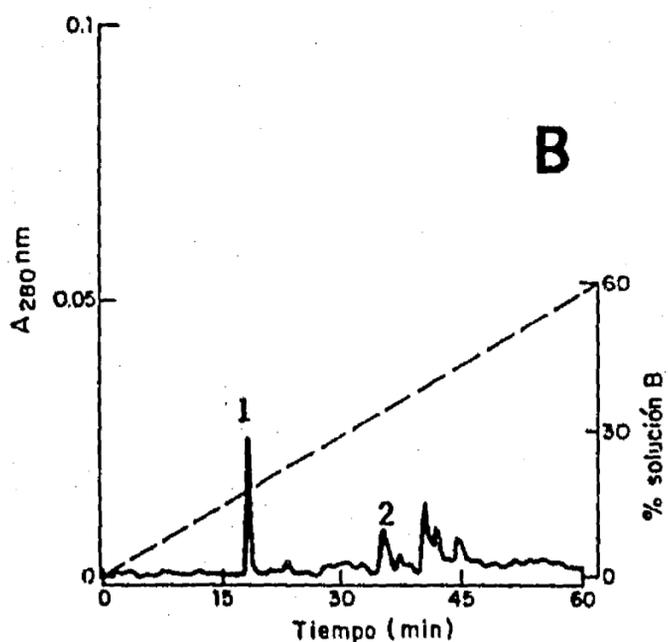
FIGURA 1

Purificación por CLAP de los péptidos sintéticos de la toxina α
 Los péptidos sintéticos 1-10, 1-14, 1-14M, 1-27, 22-36, 30-40 y 61-65 se purificaron en una columna de fase reversa C18, aplicándose un gradiente lineal de 0-60% de solución B en 60 minutos. La fase móvil A consistió de TFA 0.12% y la fase móvil B consistió de acetonitrilo con 1% de TFA. Para cada péptido se aplicaron de 100-250 μ g. Los asteriscos indican el pico que corresponde al péptido, por análisis de aminoácido

FIGURA 2

PURIFICACION DEL PEPTIDO QUIMERICO β .

A Filtración en Sephadex G-50 (medio) del péptido quimérico β . A una columna (0.9x180 cm) de SephadexG-50 equilibrada con una solución de ac. acético 40 %, se aplicaron 100 mg del péptido soluble en 2 ml de la solución de ac. acético. La velocidad de flujo fué de 30 ml/h y las fracciones colectadas de 2.5 ml. Las líneas horizontales indican los cortes. El porcentaje de recuperación fue de 97 %, correspondiendo el 5% a la fracción I, 54 % a la fracción II y 41 % a la fracción III. La fracción II correspondió al péptido quimérico por análisis de aminoácidos.



B Purificación por CLAP del péptido quimérico β . La fracción II de Sephadex (100 μ g) se aplicó en una columna de fase reversa C18, sometiéndose a un gradiente de 0-60 % de solución B en 60 minutos. Fase móvil A= TFA 0.12 %, fase móvil B= acetonitrilo con 0.1 % de TFA. Los numero 1 y 2 indican los picos que por análisis de aminoácidos corresponden al péptido quimérico β .

de purificación en CLAP en una columna C18 (figura 2b). Las fracciones principales se sometieron a análisis de aminoácidos correspondiendo a la composición esperada la fracción 1 y 2.

3. Toxicidad de los péptidos sintéticos.

Ninguno de los péptidos sintéticos de la toxina 2 resultaron tóxicos a ratones a concentraciones de hasta 1 mg/ratón.

El péptido quimérico purificado fue letal para ratones CD1 a concentraciones de 400 µg por 20 g.

4. Ensayos electrofisiológicos con el péptido quimérico.

Los resultados de la evaluación de la actividad fisiológica del péptido quimérico sobre canales de sodio voltaje dependientes, ensayada en células de neuroblastoma N18, se muestra en la figura 3. En estos ensayos se obtuvo un efecto de bloqueo del canal de Na⁺ similar al obtenido con las toxinas de tipo β aunque a una concentración 200 veces mayor que con la toxina 2 nativa.

5. Titulación de los sueros anti-péptidos sintéticos.

Para evaluar la capacidad inmunogénica tanto de los péptidos correspondientes a la toxina 2 como del péptido quimérico, se buscó la presencia de anticuerpos específicos en los sueros de los diferentes grupos de ratones inmunizados. Todos los sueros anti-péptidos correspondientes a la toxina 2 (incluyendo el generado con el péptido 1-27), evaluados contra los péptidos libres en ELISA, presentaron respuesta de anticuerpos, a excepción del suero anti-péptido 61-65 que resultó negativo y el anti-péptido 1-10 que presentó una reactividad muy baja. Los resultados del ELISA para los antígenos homólogos sin acarreador se muestran en la figura 4, donde también se presentan los resultados del péptido quimérico, siendo éste el de mayor inmunogenicidad. Los resultados en ELISA de los sueros anti-péptidos, probados

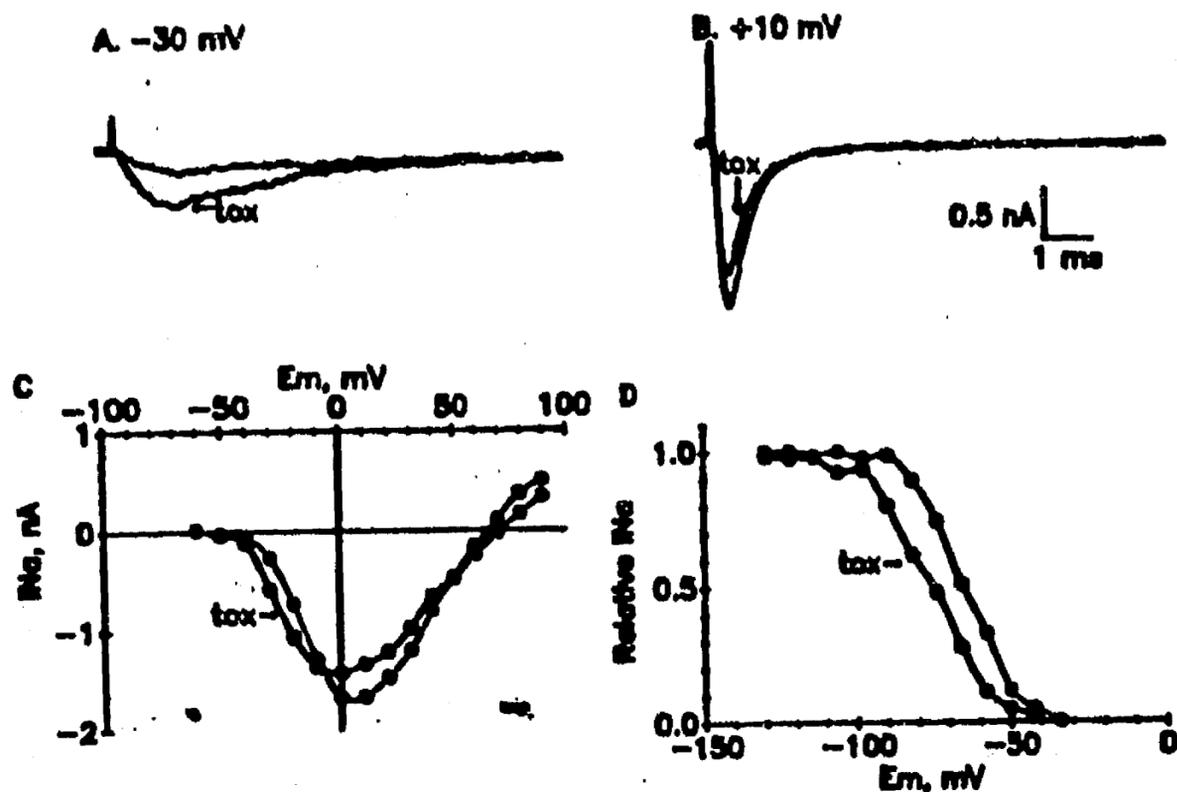


FIGURA 3

Ensayos electrofisiológicos del péptido β quimérico en células de neuroblastoma por ensayos de voltaje sostenido. En el recuadro 3A y 3B se presentan los registros de corriente de Na^+ obtenidos antes y 8 minutos después de la aplicación de 9.2 mM del péptido quimérico β . A potenciales de prueba más negativos, los registros de corriente en presencia del péptido fueron mayores que el control (recuadro 3A). A potenciales de prueba más positivos, los registros de corriente en presencia del péptido fueron menores, aunque no se alteró la forma del trazo de corriente (recuadro 3B). En el recuadro 3C, se presentan las gráficas de corriente voltaje (I-V), obtenidas de los registros antes y después de aplicar el péptido en donde se encontró una desviación de la curva I-V a potenciales más negativos y un 20 % de bloqueo en la conductancia. En el recuadro 3D se observa también una desviación de la curva de inactivación dependiente de voltaje.

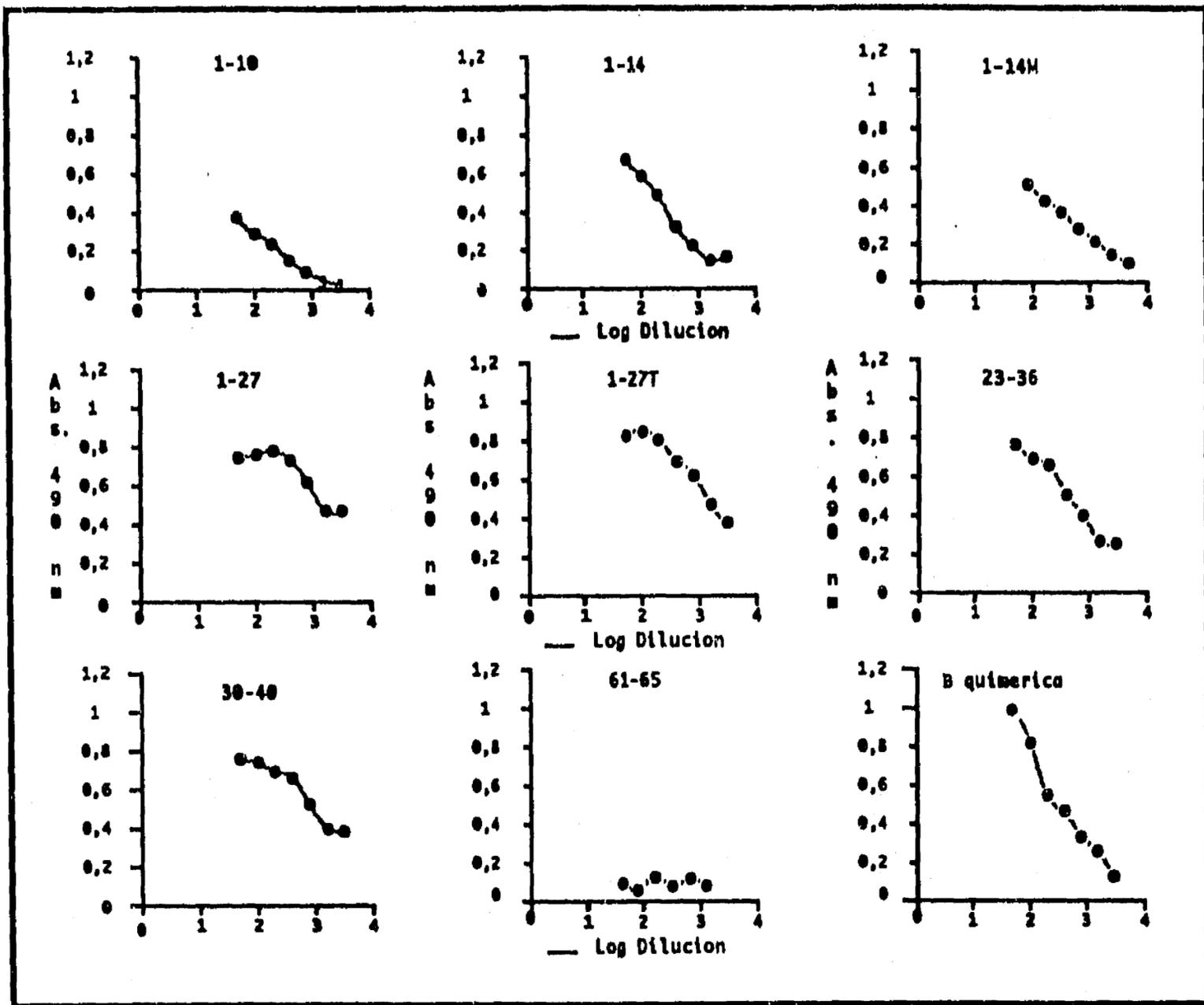


FIGURA 4

Titulación en ELISA de los sueros anti-péptidos sintéticos contra los antígenos homólogos.

Los sueros de los ratones inmunizados con los diferentes péptidos sintéticos acoplados a tiroglobulina (excepto el péptido 1-27 y β quimérico que se inocularon sin acarreador) se titularon en su reactividad hacia los péptidos homólogos pegados directamente a las placas de ELISA. El péptido 1-27T corresponde al péptido 1-27 acoplado a tiroglobulina como acarreador. El péptido 1-14M corresponde al péptido 1-14 Modificado que presenta una delección en el Glu 2. Los valores graficados corresponden a la media de ensayos por triplicado a los que se les restaron los valores del control negativo.

contra la toxina 2 (**figura 5**), mostraron que solo los sueros inducidos con los péptidos 1-14M, 1-27, 22-36 y el quimérico reconocieron la toxina nativa, los dos primeros y el último presentaron una curva de titulación muy similar y sólo el péptido 22-36 presentaron una reactividad menor. Estos resultados se presentan en la **figura 5** en donde también se presenta la curva de titulación del suero de ratón anti-toxina 2 nativa. Los antisueros inducidos por los demás péptidos no presentaron reactividad hacia la toxina nativa.

6. Ensayos de neutralización.

Para evaluar cuáles de los péptidos inmunogénicos contienen epítopes inductores de anticuerpos neutralizantes de la actividad de la toxina 2 nativa, los grupos de ratones inmunizados con los diferentes péptidos y la toxina quimérica, se sometieron al reto directo de una DL₅₀ de toxina 2 de *C. noxius*, evaluándose la sobrevivencia 24 h después de la inoculación de la toxina. Los resultados de estos ensayos se presentan en la **tabla 4**. El único péptido que produjo protección parcial fue el 1-14M. Los péptidos 1-10, 22-36 y 30-40 indujeron 60 % de sobrevivencia, sin embargo, estos resultados probablemente están dentro del error experimental por lo cual podrían considerarse dentro del control. Sorprendentemente, sin embargo, el péptido 1-27 y el péptido quimérico β originaron un fenómeno de sensibilización, de tal manera que una DL₅₀ de toxina 2 causó la muerte de todos los ratones preinmunizados desafiados. Como control de estos ensayos se utilizaron 10 ratones inmunizados con la toxina 2 nativa en el cual se obtuvo 100 % de sobrevivencia, mientras que como control negativo se usó un grupo de 10 ratones no inmunizados.

También evaluamos la capacidad neutralizante de los sueros anti-péptidos más inmunogénicos en ensayos de protección pasiva. Utilizamos para esto grupos de 8 ratones no inmunes retados con una DL₅₀ de la toxina 2 en mezcla con diferentes diluciones de los antisueros generados en conejo. Los resultados se presentan en la **tabla 5** donde se muestra la máxima sobrevivencia obtenida y la dilución del antisuero usado para esto. Nuevamente como control positivo se utilizó el suero anti-toxina 2 y como control negativo suero preinmune de conejo.

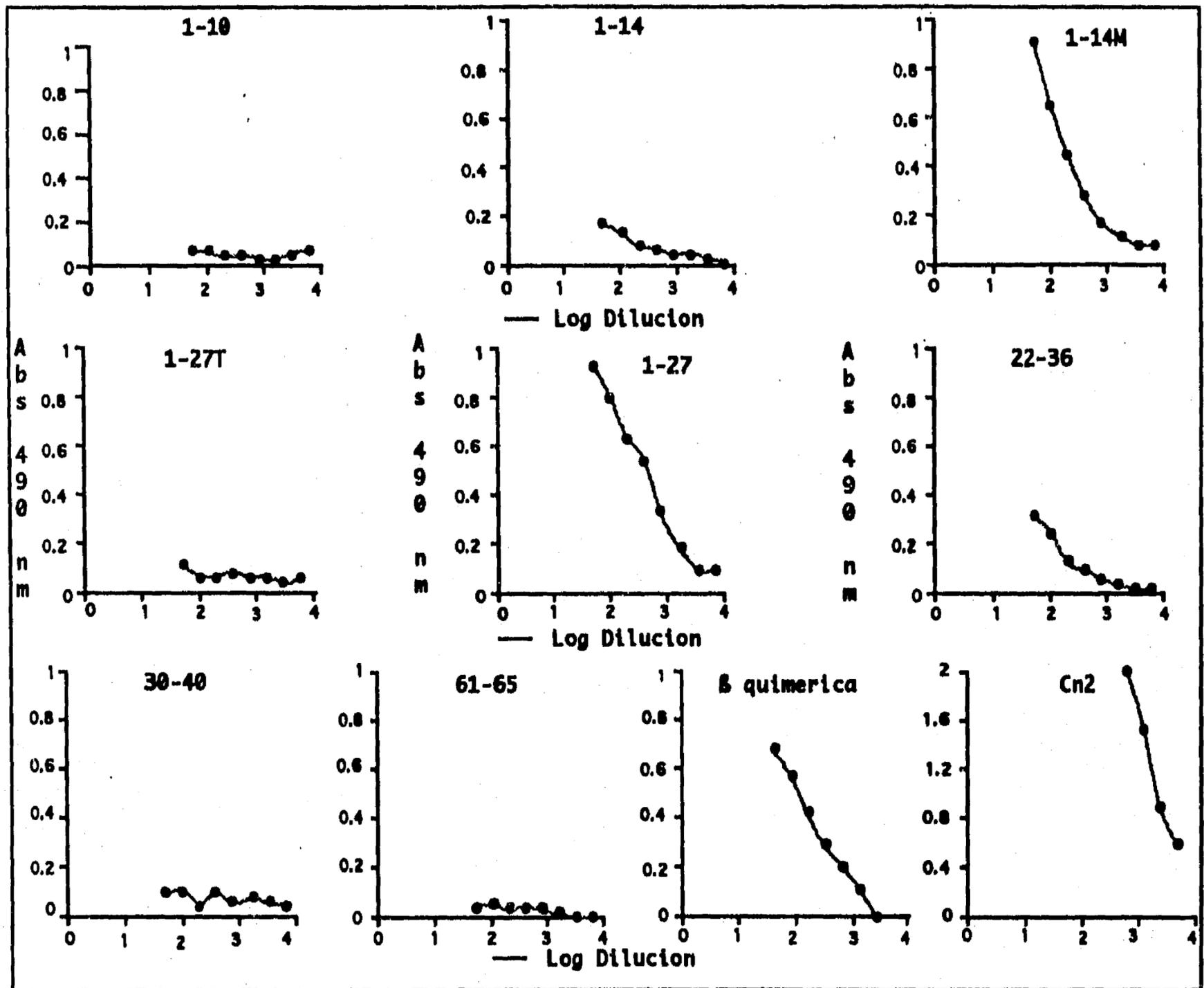


FIGURA 5

Reactividad cruzada de sueros anti-péptidos sintéticos con la toxina 2 de *C. noxius*.

La reactividad cruzada de los sueros anti-péptidos sintéticos contra la toxina 2 nativa, fué evaluada en ELISA. Sólo los sueros anti-péptidos 1-14M, 1-27, 22-36 y β quimérica presentaron reactividad contra la toxina nativa. Como control de reactividad se utilizó suero anti-toxina nativa. Los valores graficados corresponden a la media de ensayos por triplicado, a los cuales se les restaron los valores correspondientes al control negativo.

TABLA 4

NEUTRALIZACION *IN VIVO* DE UNA DL50 DE TOXINA 2 DE *C. noxius* EN ANIMALES INMUNIZADOS CON LOS DIFERENTES PEPTIDOS SINTETICOS

Grupo	Sobrevida (%)
1-10	60
1-14	50
1-14M	80
22-36	60
30-40	60
1-27	0
1-27T	40
P. quimérico β	0
Toxina 2	100
Control	50

Los grupos de ratones inmunizados con los diferentes péptidos sintéticos, como se describe en material y métodos, 9 días después de la cuarta inmunización se retaron con una DL50 de toxina 2 de *C. noxius*, aplicada intraperitonealmente. Como control utilizamos un grupo de 10 ratones no inmunizados. La sobrevida de cada grupo se evaluó a las 24 h posteriores al reto para determinar la sobrevida.

TABLA 5

NEUTRALIZACION PASIVA DE UNA DL50 DE
TOXINA 2 DE *C. noxius* CON SUEROS
ANTIPEPTIDOS SINTETICOS

antisuero	protección (%)	$\frac{1}{\text{dilución}}$
1-10	30	S/D
1-14	30	S/D
1-14M	100	1.3
22-36	60	S/D
30-40	10	S/D
1-27	70	S/D
1-27T	80	S/D
61-65	40	S/D
P. quimérico β	100	2.6
Toxina 2	100	8.0
Suero Preimmune	50	S/D

S/D = Suero sin diluir

Grupos de 8 ratones CD1 se inocularon intraperitonealmente con una mezcla de suero antipeptido (diferentes diluciones) y una LD₅₀ de toxina 2 de *C. noxius*. La mezcla fue preincubada por 1 h a temperatura ambiente, con agitación. La sobrevivencia de cada grupo se evaluó a las 24 h posteriores al reto para determinar la protección de cada antisuero. Los valores reportados como 1/dilución corresponden a la dilución en la cual se obtuvo la máxima neutralización.

Sin lugar a dudas, los sueros que presentaron anticuerpos protectores fueron el 1-14 y el péptido quimérico. Esto está de acuerdo con las curvas de titulación previas (figura 5). Los sueros anti 1-27, 1-27T y 22-36 también mostraron protección aunque en menor grado.

7. Ensayos de proliferación celular.

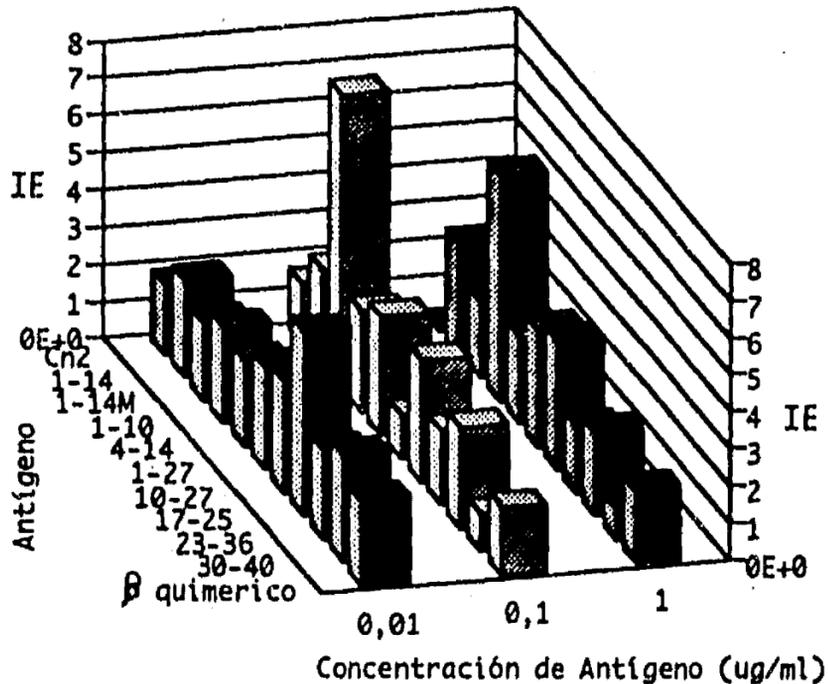
Para evaluar la presencia de epítopes T (H-2^d) medimos la respuesta proliferativa de células T (células de ganglio linfático) inducidas *in vivo* y estimuladas *in vitro* con los péptidos sintéticos que indujeron anticuerpos con reactividad cruzada con la toxina 2 y en los ensayos de neutralización indujeron algún grado de protección (1-14, 1-14M, 1-27 y péptido quimérico β). Además para evaluar segmentos más restringidos se incluyeron tres péptidos que corresponden parcialmente a la secuencia de los péptidos 1-14 y 1-27 (4-14, 10-27 y 17-25). Para cubrir también el segmento correspondiente a los 10 primeros residuos de aminoácidos del extremo N-terminal (péptido 1-10).

Los resultados de los ensayos se presentan en la figura 6. El recuadro 6a, muestra los índices de estimulación obtenidos con los diferentes péptidos y la toxina 2, en presencia de tres diferentes concentraciones de antígeno. Para todos los antígenos sintéticos se utilizaron concentraciones en el rango de 0.001-10 $\mu\text{g/ml}$. Solo se presentan los datos para 0.001, 0.1 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$. Para la toxina 2 se utilizaron concentraciones de 0.0001-0.1 $\mu\text{g/ml}$.

En la figura 6b se presentan con fines comparativos los datos correspondientes al máximo índice de proliferación obtenida para cada antígeno y se anotan las concentraciones en las cuales se obtuvieron éstos.

FIGURE 6

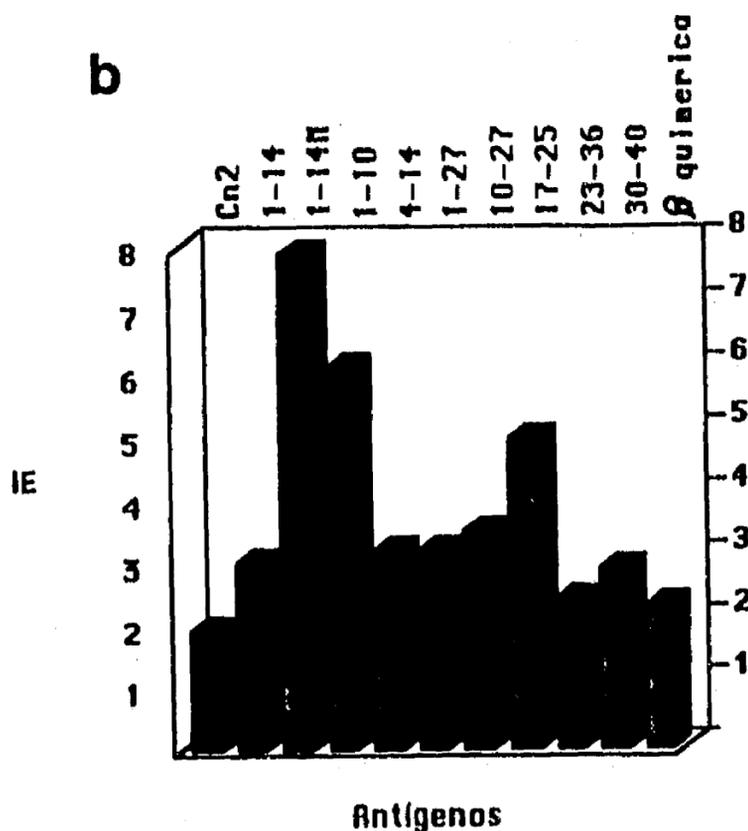
a



Inducción *in vivo* de respuesta proliferativa de células T específicas de la toxina 2 y estimulación *in vitro* por péptidos sintéticos.

a Los ensayos de proliferación se realizaron células de ganglio linfático de ratones inmunizados con toxina 2 como se describe en métodos. 4.0×10^5 células por pozo, se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos sintéticos (0.01, 0.1 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$), excepto la toxina 2 que se probó a concentraciones un orden de magnitud más bajas (0.001, 0.01 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$). Para todas las condiciones probadas el volumen final fue de 200 μl . Después de 72 h de cultivo a 37°C, las células se pulsaron por 18 h con 0.5 μCi de [^3H] timidina / pozo. Se midió la radioactividad incorporada y los resultados se expresan como índice de estimulación. Los ensayos fueron realizados por triplicado y la DS fue menor del 10 % de la media. El índice de estimulación fue calculado como sigue: $\text{IE} = \frac{\text{x cpm experimental}}{\text{x cpm control}}$.

b



b El índice de estimulación máximo obtenido para cada péptido se muestra con el propósito de facilitar la comparación. Los datos fueron extraídos del recuadro a. Las concentraciones de los valores graficados son los siguientes: Cn2 (0.001 $\mu\text{g/ml}$); 1-14 (0.1 $\mu\text{g/ml}$); 1-14M (0.01 $\mu\text{g/ml}$); 1-10 (0.1 $\mu\text{g/ml}$); 1-27 (0.1 $\mu\text{g/ml}$); 10-27 (0.01 $\mu\text{g/ml}$); 17-25 (0.001 $\mu\text{g/ml}$); 23-36 (0.01 $\mu\text{g/ml}$); 30-40 (0.001 $\mu\text{g/ml}$), y β toxina quimérica (0.001 $\mu\text{g/ml}$).

DISCUSION

En la síntesis de los péptidos que corresponden a fragmentos de la toxina 2 se enfatizó la secuencia correspondiente al extremo N-terminal aunque también se incluyeron péptidos correspondientes al extremo C-terminal. El primero porque en experimentos preliminares con un péptido sintéticos correspondiente a la secuencia N-terminal de la toxina II.10 de *C. noxius* (una toxina con alta homología estructural con la toxina 2), este resultó letal en ratones, lo que sugiere la participación del extremo N-terminal en la conformación del sitio activo (Gurrola, 1986), y segundo porque por difracción de rayos X de la variante 3 de *C. sculpturatus*, se sabe que la región N-terminal está expuesta en la superficie de la toxina (Fontecilla-Camps *et al.* 1980).

El extremo C-terminal, también por difracción de rayos X, se sabe está expuesto a la superficie de la toxina de *C. s. sculpturatus* y especialmente cercana al extremo N-terminal (Fontecilla-Camps *et al.* 1980), por lo cual también resultaba interesante de sintetizar y evaluar su capacidad inmunogénica protectora.

El péptido 1-14M (modificado) resultó de la síntesis incorrecta del péptido 1-14 al no pegarse el ac. glutámico. Esto fue definido al purificar y realizar secuencia de aminoácidos del péptido 1-14. A pesar de esto, decidimos utilizar el péptido 1-14M, que carece del ac. glutámico de la posición 2, ya que nos permitía definir la posible relevancia de este aminoácido en la estructuración de un posible epítoto neutralizante.

El hexapéptido C-terminal fue sintetizado a pesar de que en el momento de la síntesis química sólo se conocía por secuenciación de Edman directa la posición del tripéptido Pro-Asn-Lis. El análisis de aminoácidos de ésta región había revelado la presencia adicional de Arg, Cys, y Ser. El péptido sintetizado (Tabla 1) no corresponde a la secuencia finalmente determinada (Zamudio *et al.*, 1992), conteniendo una inversión en la posición de los últimos tres residuos, sin embargo, lo hemos utilizado como control interno.

Todos los péptidos sintetizados se obtuvieron con un rendimiento superior al 60 % y el análisis de aminoácidos correspondió a la secuencia esperada tanto para los péptidos

sintéticos de la toxina 2 como para el péptido quimérico.

La letalidad del péptido quimérico, aún cuando es a concentraciones 400 veces mayores a la DL50 de la toxina 2, sugiere que las regiones cuya secuencia fue conservada, especialmente en el extremo N-terminal y las regiones estructuradas como α hélice o β plegada son relevantes para la conformación del sitio activo y para la especificidad en el mecanismo de acción de las toxinas tipo β como fue mostrado por los ensayos electrofisiológicos. Esto nos permite concluir que hemos obtenido una toxina sintética quimérica de tipo β . Respecto a la concentración en la cual se observa su letalidad pudiera atribuirse a muchas variables. Primero, el péptido contiene 8 cisteínas y la posibilidad de que realice un plegamiento adecuado y correcto a un tiempo dado es baja. Por otro lado las fracciones de péptidos que no adquieren la conformación correcta, si se unen a su sitio receptor sobre las células blanco, esto ocurre con una afinidad submáxima. Sin embargo, los resultados de ensayos de toxicidad con el péptido quimérico sometido a renaturalización mostraron que la concentración tóxica fue similar a la obtenida con el péptido en condiciones reductoras (datos no mostrados). Para explicar estos resultados existen varias posibilidades. 1) que aún en presencia de agentes reductores, exista una población de moléculas capaces de conformar el sitio activo de la toxina nativa, 2) que el proceso de renaturalización no se realizará de manera correcta y homogénea y 3) que la formación de los puentes disulfuro no son relevante para los resultados encontrados. Esto llevaría al siguiente punto. La posición de los distintos residuos de aminoácidos en la estructura primaria debe tener un papel preponderante en el reconocimiento al receptor (canal iónico). Si es cierto que la región N-terminal está involucrada en la letalidad de las toxinas y por ende, en el reconocimiento del canal, basta que esta porción de la molécula esté correctamente sintetizada y libre para que funcione como una toxina parcial.

De los resultados con los sueros anti-péptidos sintéticos cortos acoplados a tiroglobulina como acarreador, definimos que todos estos péptidos son antigénicos a excepción del péptido 61-65, lo que pudiera deberse a que su tamaño no le permite unirse de manera que sea

detectable en la superficie de la placa de ELISA ya que cuando se evaluó la respuesta de anticuerpos contra el mismo péptido 61-65, pero utilizando como antígeno unido a la placa de ELISA el péptido acoplado a BSA, el suero resultó positivo (datos no mostrados). Por otro lado, ninguno de estos péptidos, a excepción del 1-27, resultaron inmunogénicos por sí mismos, ya que cuando se inmunizaron sin acarreador no indujeron respuesta detectable (datos no mostrados). A partir de los resultados de la Inmunización con el péptido 1-27, que indujo respuesta similar tanto cuando se inmunizó sin acarreador, como en presencia de éste, concluimos que esta región es inmunogénica.

La respuesta a este péptido sugiere que presenta en su secuencia al menos un epítope para células T que tiene la capacidad de ser unido por los antígenos de histocompatibilidad de ratones CD1.

De los resultados de reactividad cruzada de los sueros anti-péptido 1-27 y 1-27T con la toxina 2 nativa, la reactividad del anti-péptido 1-27 fue mejor que la del anti-péptido 1-27T, lo que sugiere que dentro de las estructuras al azar que adquiere el péptido libre en solución, a un tiempo dado son más similares a la adquirida por esta región en la toxina nativa, que la estructura adquirida por el péptido acoplado a tiroglobulina. Estos resultados, nos sugieren que la secuencia correspondiente al extremo N-terminal de la toxina se encuentra expuesta y accesible al reconocimiento por los anticuerpos (al menos entre el aminoácido 1-14, por los resultados de reactividad cruzada con el suero anti-péptidos 1-14 y 1-14M). Esto difiere de los resultados reportados por el grupo de Granier *et al.* (1989) quienes encuentran que la región N-terminal de su toxina modelo es poco inmunogénica. Sin embargo, hay que notar que la toxina modelo utilizada por Granier *et al.* (1989) es de tipo α y tiene un aminoácido hidrofóbico en la posición 1 seguido de residuos ácidos en lugar de los aminoácidos básicos presentes en las toxinas tipo β .

Los resultados de la neutralización tanto pasiva como activa, indican que sólo los sueros que reconocen la toxina nativa indujeron algún grado de neutralización: los sueros anti-

péptidos 1-14 y 1-27 (neutralización en terceros), y el 1-14 (neutralización directa). Para los animales inmunizados con el péptido 1-27 en desafío directo, se observó un efecto sensibilizante al efecto de la toxina que discutiremos adelante. Con la síntesis del péptido quimérico quisimos, además de obtener una toxina sintética con la actividad funcional de las toxinas nativas tipo β como mencionamos en la sección de resultados, también pretendíamos obtener un antígeno con mayor capacidad inmunogénica en virtud de su mayor longitud. De esta forma no sería necesario utilizar proteína acarreadora y tratar de incrementar la posibilidad de respuesta contra epítopes conformacionales. Estos factores, pensamos nos permitirían aumentar la posibilidad de obtener anticuerpos específicos para la toxina sintética con capacidad de reconocimiento de la toxina nativa, y en función de la actividad mostrada por el péptido quimérico, la posibilidad de obtener anticuerpos neutralizantes. Los resultados confirmaron la inmunogenicidad del péptido quimérico y la capacidad de éstos para reconocer la toxina nativa. Los resultados de los ensayos de neutralización pasiva con el suero anti-toxina quimérica, nos sugieren que al menos una parte de los anticuerpos responsables de la reactividad cruzada hacia la toxina nativa impiden la acción de la toxina por alguno de los siguientes mecanismos: 1) reconocen el sitio de pegado de la toxina a los canales de Na^+ , 2) se unen a uno o varios sitios diferentes al sitio activo, modificando la afinidad de la toxina o, 3) imposibilitando la acción de la toxina por impedimento estérico. Esto, sin embargo, no se observó en ensayos de protección directa con los animales inmunizados con el péptido quimérico y con el péptido 1-27, en donde no solo no se obtuvo protección si no un efecto de sensibilización al efecto de la toxina, de tal forma que aún cuando el reto se realizó con una DL50 de toxina, esperándose, si los anticuerpos no son protectores, 50 % de sobrevivencia, se obtuvo 0% (cero %) de sobrevivencia a un tiempo de inyección muy corto (alrededor de 15 minutos). Creemos que esto pudiera ser atribuible a que los anticuerpos que reconocen la toxina *in vivo* pueden modificarla, protegiéndola de la degradación por enzimas séricas retardando su depuración o cambiando se afinidad del sitio de acción, dando por resultado que se

mantiene concentraciones altas disponibles de toxina, suficientes para causar una muerte rápida. Sin embargo para definir con bases experimentales la razón de la hipersensibilización, es necesario estudiar el fenómeno con mayor detenimiento.

Por otro lado, respecto a los ensayos para definir posibles regiones portadoras de epítopes T, este objetivo motiva nuestro interés debido a que ahora es conocido que para la inducción de una eficiente respuesta inmune y específicamente en las estrategias actuales para el diseño de vacunas sintéticas es de gran importancia definir la presencia de tanto epítopes B neutralizantes como epítopes T, sobre todo estos últimos con excelente capacidad inductora. Definir si los segmentos que portan determinantes antigénicos neutralizantes, presentan epítopes T debilmente inductores o no presentan éstos, es relevante, ya que es posible insertar uno o varios de epítopes artificialmente permitiendo disminuir la restricción de la respuesta inmune. En las condiciones en las cuales se realizaron los ensayos, solo los péptidos 1-14M, 1-10 y 1-27 indujeron estimulación celular importante, lo cual sugiere que en estas regiones existen potenciales epítopes para linfocitos (H-2^d). En función de estos resultados, hemos sintetizado octámeros traslapados a las regiones que encontramos estimulan, en cierto grado, la proliferación celular (aún cuando los índices de estimulación no fueron muy altos) con la finalidad de definir los epítopes T. La baja actividad proliferativa pudiera deberse a varias razones, una de ellas es que la cepa de ratón utilizada no sea buena respondedora o que el ensayo, utilizando población total de células de ganglio linfático no es suficientemente sensible. Para descartar ambas posibilidades, posteriormente planeamos evaluar la capacidad de inducir proliferación en células de diferentes cepas de ratones y en un sistema de titulación de Interleucina 2, utilizando para ello tanto los péptidos probados en este trabajo como los recientemente sintetizados y aún no probados.

Los resultados obtenidos con la toxina 2 de *C. noxius* (Cn2) fueron inesperados, ya que siendo éste el antígeno con el cual se realizó la inducción *in vivo*, lo esperado era obtener,

si no el mayor índice de estimulación, resultados superiores a los encontrados. Sin embargo en los ensayos iniciales observamos que la incorporación de marca en presencia de CN2 siempre fueron muy bajos, a nivel o por debajo de las cuantas basales. Ante estos resultados, realizamos ensayos de toxicidad de la toxina 2 sobre poblaciones separadas de linfocitos y macrófagos de ratón BALB/c. Los resultados de estos experimentos mostraron que a concentraciones 10 ng/ml de toxina 2, la viabilidad de los linfocitos bajaba hasta el 20 % en solo 30 minutos, en tanto que la viabilidad de los macrófagos se mantenían sin cambio respecto al control (Datos no mostrados). Estos resultados pudieran explicar la baja o nula respuesta proliferativa de las células de ganglios linfáticos, frente a la toxina 2 como antígeno. El nivel al cual la actúa la toxina 2 para alterar la viabilidad celular de los linfocitos aún no lo hemos definido. Sin embargo consideramos que la primera y más obvia posibilidad para descartar es su acción sobre canales de Na^+ sensibles a voltaje. Para definir los eventos que dan lugar a este fenómeno, es necesario una evaluación sistemática que en principio puede ser abordada a través de métodos electrofisiológicos para descartar la acción sobre canales iónicos.

Los resultados de los ensayos de proliferación celular obtenidos con el péptido quimérico, también resultaron mucho más bajos de lo esperado y también pueden ser atribuibles a efectos tóxicos de este péptido, aún cuando no hemos realizado ensayos para verificar este fenómeno en presencia del péptido quimérico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente apoyado por los siguientes Donativos No. 75191-527104 de las Howard Hughes Medical Institute; No. IN202689 y IN300991 de DGAPA-UNAM; No. 0018-N9105 de CONACYT-México y a través de una beca de Doctorado de DGAPA-UNAM y CONACYT-México para E.S. Calderón-Aranda. Se agradece la discusión de Georgina Gurrola, para el diseño de los péptidos sintéticos correspondientes a la toxina 2 de *C. noxius* y a Fernando Zamudio por la purificación de la toxina 2 de *C. noxius*. El apoyo técnico de Elizabeth Mata y Sergio González también se agradece.

REFERENCIAS

- Baharaoui, E., El Ayeb, M., Van Rietschoten, J., Rochat, H., y Granier, C. (1986) *Mol. Immunol.* **23**, 357-366.
- Baharaoui, E., El Ayeb, M., Granier, C. y Rochat, H. (1987) *Eur. J. Biochem.* **167**, 371-375.
- Becerril, B., Vazquez, A., García, C., Corona, M, Bolivar, F., y Possani, L.D. (sometido).
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., y Tarvin, T.L. (1984) *J. Chromatography* **336**, 93-104.
- Calderón-Aranda, E.S., Hozbor, D., y Possani, L.D. (en prensa) *Toxicon*.
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. y Maelicke, A. (1982) *Nature* **296**, 90-91.
- Caterall, W. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5528-5536.
- Caterall, W. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 8669-8676.
- Couraud, F., Jover, E., Dubois, J.M., y Rochat, H. (1982) *Toxicon* **20**, 9-16.
- Dent, M.A.R., Possani, L.D., Ramírez, G.A., y Fletcher Jr. P.L. (1980) *Toxicon* **18**, 343-350.
- El Ayeb, M., Martin, M.F., Delori, P., Bechis, G., y Rochat, H. (1983) *Mol. Immunol.* **20**, 697-708.
- El Ayeb, M., y Delori, P. (1984) *Immunology and immunochemistry of scorpion toxins. Handbook of natural toxins. vol 2*, Tu. A.T. Ed. Marcel Dekker Inc. New York. pp 607-638.
- El Ayeb, M., Bahraoui, E., Granier, C., y Rochat, H. (1986a) *Biochemistry* **25**, 6671-6678.
- El Ayeb, M., Darbon, H., Bahraoui, E., Vargas, O., y Rochat (1986b) *Eur. J. Biochem.* **155**, 289-294.
- Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D., y Bugg, C. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **77**, 6496-6500.
- Goodfriend, L.T. Levine, L. Fasman, G.D. (1964) *Science* **144**, 1344-11346.
- Granier, C. Novotny, J., Fontecilla-Camps, J.C., Fourquet, P., El Ayeb, M., y Bahraoui, E. (1989) *Mol. Immunol.* **26**, 503-513.
- Gurrola, G.B. (1986) Tesis de Maestría presentada a la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kirsch, G.E. Skattebol, A., Possani, L.D. y Brown, A.M. (1989) *J. Gen. Physiol.* **93**, 67-83.
- Merrifield, B.R. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2144-2154.
- Meves, H., Simard, M.J., y Watt, D.D. (1986) Interactions of scorpion toxin with the sodium channel. Tetrodotoxin, saxitoxin and the molecular biology of the sodium channel (Kao, C.Y. y Levinston, S.R. Eds.) Vol. 479 *Ann. New York Acad. Sci.*, New York pp. 113-132

Nonner, W. (1979) *Adv. Cytopharmacol.* **3**, 345-351.

Possani, L.D., Alagon, A.C., Fletcher, J.r.P.L. and Erickson, B.W. (1977) *Arch. Biochem. Bloph.* **180**, 394-403.

Possani, L.D., Martin, B.M., y Svendsen, I. (1982) *Calsberg Res. Commun.* **47**, 285-289.

Possani, L.D. (1984) Structure of scorpion Toxin. *Handbook of natural Toxins* (Tu,A.T. Ed.) vol. 2. Marcel Dekker Inc.,New York pp. 513-550

Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., Rode, G.S. and Erickson, B.W. (1985) *Biochem. J.* **229**, 739-750.

Strichartz, G., Rando, T., y Wang, G.K. (1987) *Ann. Rev. Neurosc.* **10**, 237-267.

Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B.M, Gurrola-Briones, G., Herlon, P., and Possani, L.D. (1992) *Eur. J. Blochem.* **204**, 281-292.)

Zlotkin, E., Miranda, F., y Rochat, H. (1978) Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 48, Arthropod Venoms*,(Bettini, S. Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 317-369.

VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante el desarrollo del presente trabajo hemos definido que los componentes tóxicos son (principalmente los correspondientes a las toxinas para canales de sodio) los inmunodominantes y relevantes para inducir anticuerpos neutralizantes en animales experimentales (figura 2, 3 y tabla 1 de anexo 1). Esto lo observamos cuando utilizamos mezclas complejas como antígenos (macerado de telson y veneno total, y fue mucho más evidente cuando utilizamos fracciones enriquecidas con las toxinas de alacrán (Fracción II de Sephadex G-50). Otras moléculas diferentes a los componentes tóxicos del veneno del alacrán no parecen tener papel importante en la generación de anticuerpos neutralizantes (figura 3, anexo 1).

La toxina 2 de *C. noxius* como componente mayoritario del veneno de alacrán, y representante de las toxinas para canales de sodio de mamíferos resultó, de acuerdo a nuestras expectativas, un buen modelo para la generación de anticuerpos neutralizante del efecto del veneno total (figura 3 y tabla 1 del anexo 1). Estos resultados aún cuando no dieron lugar a 100 % de sobrevida, en experimentos de reto *in vivo* con veneno total, sí dieron lugar cuando el reto se realizó con la toxina purificada. Esto sugiere que los anticuerpos generados con la toxina 2 son capaces de neutralizar principalmente las toxinas estructuralmente relacionadas que se encuentran en el veneno total, pero que los componentes tóxicos no relacionados antigénicamente no son susceptibles de neutralización.

Estos resultados apoyaron nuestro interés de evaluar diferentes regiones de una toxina nativa y una toxina sintética como posibles portadoras de epítopes neutralizantes (anexo 2) y tratar de definir si las regiones con epítopes neutralizantes (epítopes B) coinciden con las que portan los epítopes T, al menos para el haplotipo utilizado. Esta evaluación dió lugar a resultados totalmente congruentes, ya que las regiones definidas como inmunogénicas, portadoras de epítopes neutralizantes y potencialmente portadoras de epítopes inductoras de respuesta de memoria ($H-2^d$), corresponden a secuencias traslapadas de la región amino terminal de la toxina (péptidos que corresponden parcial o totalmente a los residuos de aminoácidos 1-27). También los resultados de nuestro trabajo, apoyan el que ésta región o parte de ella (que al menos pudiera corresponder al segmento 1-14), se encuentra expuesta en la superficie de la toxina nativa y esté accesible al reconocimiento de anticuerpos generados contra éste segmento (anti-péptido 1-14 y anti-péptido 1-27). Todos estos datos son presentados en el anexo 2.

Además, por los resultados de neutralización pasiva que se presentan en la tabla 4 del

anexo 2, se sugiere que el extremo amino terminal de la toxina es o está espacialmente cercano al sitio activo de la toxina, o bien que la unión de anticuerpos a esta región modifica el sitio de pegado de la toxina a su blanco de acción.

Todos estos resultados hacen sentido con hallazgos previos de nuestro grupo que sugieren que la región activa de la toxina se encuentra en el extremo amino terminal.

Estos resultados nos permiten sugerir el uso de la fracción II de Sephadex G-50 (que contiene los componentes tóxicos del veneno de alacrán) como una primera aproximación para obtener sueros mas específicos para su uso en seroterapia, en espera de definir los componentes tóxicos nativos e idealmente regiones o segmentos de componentes tóxicos relevantes para protección. Estos últimos, son susceptibles de ser expresados, en forma de componentes libres no tóxicos pero sí altamente inmunogénicos para respuestas protectoras, o como proteínas de fusión en moléculas híbridas, en vectores de expresión, ambas estrategias basadas en la tecnología del DNA recombinante. Estas estrategias probablemente abrirán las posibilidades a largo plazo de la inducción de protección activa en población de alto riesgo. Para acceder a estas metodologías, es necesario la disponibilidad de los genes que codifican para una molécula dada (en nuestro caso de las toxinas de alacrán) para posteriormente manipularlos mediante técnicas de ingeniería genética, y expresarlos como moléculas no tóxicas.

Este primer paso ya ha sido dado por nuestro grupo, contándose actualmente con varios genes para toxinas de alacrán (Becerril *et al.* sometido). Para una de las toxinas se ha iniciado ya la expresión como una proteína de fusión (Tesis Consuelo Garcia). Esto abre la posibilidad de explorar la capacidad inmunogénica protectora de dichos productos y abordar la manipulación genética de las toxinas para expresar productos que mantengan las regiones que porten los epítopes neutralizantes, no de una sino de diferentes toxinas que incluso no estén estructural y funcionalmente relacionadas, ampliando el universo para la generación de una respuesta protectora contra toxinas de alacranes de diferentes especies.

Para alcanzar esta meta, considero importante enfatizar la necesidad de realizar trabajo de investigación básica para definir los componentes de los alacranes y dentro de éstos, los epítopes que tienen un papel relevante en protección.

En éste punto es importante mencionar algunas de las estrategias utilizadas para abordar la definición de péptidos tanto B como T, relevantes para neutralización:

- 1) Los productos de proteólisis parcial de proteínas ha sido usado en este contexto. Los resultados obtenidos con esta estrategia no han sido muy útiles debido a que de los productos de la digestión resultan antígenos poco inmunogénicos, inducen anticuerpos con

baja afinidad por las proteínas nativas o dan lugar a antígenos altamente tolerizantes (Parish y Ada, 1969).

2) El uso de péptidos lineales y péptidos ramificados, es una estrategia que se ha utilizado ampliamente en diversos modelos experimentales (Koprowski y Melchers, 1986).

Tres descubrimientos fueron de importancia para el estudio de epítopes candidatos para el desarrollo de vacunas, utilizando como herramientas péptidos sintéticos. a) La definición de que los receptores para epítopes T reconocen sitios antigénicos segmentales con una estructura secundaria particular (Berzofsky 1985; Berzofsky *et al.* 1987; Livingstone y Fathman, 1987; Schwartz, 1985), b) el descubrimiento de que los receptores para epítopes B preferencialmente reconocen estructuras terciarias o cuaternarias (Sela 1966) y c) la demostración de que en la estructura de un antígeno existen segmentos "supresores" de la respuesta inmune y que la eliminación de estos segmentos dentro de la estructura da por resultado una buena respuesta (Adorini *et al.* 1979).

La tecnología de péptidos sintéticos ha sido de gran utilidad para el estudio de epítopes tanto B (como ejemplos: Parry *et al.* 1988; Talbot *et al.* 1988; Zavala *et al.* 1987; Askelof *et al.* 1990) como epítopes T (como ejemplos: Cease *et al.* 1986; Lamb *et al.* 1987; Kim *et al.* 1990; Anderson *et al.* 1990; Robinson *et al.* 1991; Busch *et al.* 1990; Kurata y Berzofsky, 1990). También mediante esta técnica ha sido posible definir que la conjugación de péptidos que portan epítopes T y B inducen anticuerpos neutralizantes para una proteína dada aún cuando el epítope T no se encuentre naturalmente dentro de la estructura de la proteína nativa (Auriault *et al.* 1988; Leonetti *et al.* 1990; Londoño *et al.* 1990).

3) Una estrategia combinada del uso de la tecnología de anticuerpos monoclonales y de la síntesis de péptidos consiste en que un anticuerpo monoclonal con capacidad neutralizante de la actividad biológica de una proteína, es utilizado como sonda para detectar en un banco de péptidos sintéticos, es posible definir un mimotopo con alta afinidad, que corresponde a un epítope neutralizante sintético. Esta técnica es aplicable tanto si se trata de un epítope lineal como de uno discontinuo (Geyson, 1985; Geyson *et al.* 1987).

4) Otras estrategias alternativas para definir epítopes relevantes para protección son derivadas de la tecnología de DNA recombinante. Con esta metodología se han definido epítopes B y T de diferentes proteínas modelo mediante la expresión de proteínas recombinantes que portan fragmentos de proteínas modelo -proteínas de fusión- (Thole *et al.* 1988; Ducancel *et al.* 1989; Colina *et al.* 1990; Charbit *et al.* 1990). Otra alternativa, se refiere a la mutagénesis dirigida (Cox *et al.* 1990). Las alternativas derivadas de la manipulación genética son ahora accesibles para nosotros y representan alternativas reales que nos permitan abundar en la definición de los epítopes tanto B como T de las

toxinas de alacrán, sobre todo considerando que el conocimiento generado hasta el momento nos permiten dirigir nuestros esfuerzos hacia las regiones potencialmente portadoras de epítopes relevantes.

En otro sentido con respecto a metodologías para evaluar topología de diferentes regiones de una proteína las alternativas más ampliamente utilizadas consisten en:

- 1) El uso de variantes naturales (El Ayeb *et al.* 1983; Kharrat *et al.* 1990).
- 2) El uso de anticuerpos monoclonales y/o policlonales de especificidad definida, inducidos con proteínas nativas péptidos sintéticos análogos a estas. Esta estrategia aprovecha la capacidad antigénica de diferentes regiones de una molécula, su accesibilidad al reconocimiento por los anticuerpos y la posibilidad de modificar la actividad biológica de la proteína, para asignar una ubicación topológica a diferentes segmentos de la molécula (Bahraoui *et al.* 1989; El Ayeb *et al.* 1986).
- 3) El uso de péptidos sintéticos o productos de digestión parcial de la proteína nativa o de variantes naturales para asignar relevancia funcional a segmentos de la molécula (Granier *et al.* 1989; Ruan *et al.* 1990).
- 4) La modificación química en residuos de aminoácidos específicos (Feeney, 1987; Sampieri y Haberster-Rochat, 1978; Darbon y Angelides 1984; Kharrat *et al.* 1990).
- 5) La mutagénesis dirigida y el uso de técnicas de DNA recombinante. A pesar de que estas metodologías permiten asignar un papel funcional a diferentes regiones de una molécula, la repercusión estructural no se obtiene de manera directa aunque por métodos de predicción de estructura es posible tener una aproximación razonable.

Otras metodologías alternativas para realizar una mejor evaluación en este sentido son el diroismo circular, la resonancia magnética nuclear y finalmente cuando esto es posible la cristalografía por rayos X. De las toxinas para canales de sodio, obtenidas de alacranes, se ha definido la estructura cristalográfica de dos toxinas, una con actividad bloqueadora de tipo α y otra de tipo β (Fontecilla-Camps *et al.* 1980; Fontecilla-Camps *et al.* 1988). Por métodos de computación, utilizando el banco de estructuras de proteínas, nosotros hemos realizado una predicción de la estructura cristalográfica de la toxina 2 de *C. noxius*, utilizada como toxina modelo de tipo β , y comparamos los resultados con la estructura de la V3 de *C. sculpturatus*. Encontramos que los cambios introducidos a partir de la secuencia de la toxina 2 no modifica de manera importante la estructura original de la V3 (datos no mostrados). También evaluamos la posible modificación de la estructura de la V3 de *C. sculpturatus* por sustitución con la secuencia de la toxina quimérica y encontramos que solo las regiones correspondientes al extremo amino terminal y los segmentos estructurados como α hélice y β plegada parcialmente se traslapan a la estructura de la

V3 (datos no mostrados). Por otro lado, mediante predicción de estructura secundaria definimos que las regiones correspondientes a la α hélice y β plegada de la toxina quimérica se mantienen en la misma posición que en la toxina nativa 2 de *C. noxius* (datos no mostrados). En el presente una de las estrategias que pueden apoyarnos de manera importante en el sentido de la relación estructura-función probablemente es la mutagenesis dirigida, en función de la disponibilidad de los genes de varias de las toxinas de alacrán.

En otro sentido, y a partir de los resultados obtenidos hasta el momento por nuestro grupo, hemos tomado una conciencia mas crítica acerca de la posibilidad de utilizar péptidos sintéticos o proteínas recombinantes como posibles vacunas anti-toxinas de alacrán. El primer factor para considerar, se refiere a que el envenenamiento por piquete de alacrán es un proceso agudo en el que se requieren altos niveles de anticuerpos circulantes en el momento del accidente para obtener una protección adecuada. Sin embargo la máxima respuesta de anticuerpos en animales experimentales se alcanza 4-5 días posteriores a la reinmunización y solo se mantiene a títulos adecuados por 45 a 60 días (datos no mostrados). De tal forma que mientras no sea posible inducir una respuesta inmune neutralizante que se mantenga a niveles suficientemente altos para proteger por un período largo de tiempo, no sera posible proponer que la inducción de inmunidad activa tiene un papel relevante en salud pública.

Otro factor a enfatizar es la hipersensibilización al efecto de la toxina, encontrado en animales inmunizados con fragmentos sintéticos correspondientes a toxinas de alacrán (tabla 3 del anexo 2), lo cual también nos hace considerar con gran cautela el desarrollo de una vacuna anti-alacrán. Es necesario definir si es la naturaleza sintética de los péptidos utilizados para la inmunización los responsables de este efecto o es independiente de esto.

IX. REFERENCIAS

- Adorini, L., Harvey, M.A., Miller, A., y Sercarz, E. (1979) *J. Exp. Med.* **150**, 293-306
- Alagón, A., y López-Acuña, M. (1979) Reunión. Secc. Tec. Soc. Mex. Salud Pública, Marzo 1979.
- Alagón, A.C., Guzman, H.S., Martín, B.M., Ramírez, A.N., Carbone, E., y Possani, L.D. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**, 153-161.
- Anderson, D.C., Van Schooten, W.C.A., Jason, A., Barry, M.E., Vries, R.R.P. (1990) *J. Immunol.* **144**, 2459-2464.
- Askelof, P., Rodmalm, K., Wrangsell, G., Larsson, U., Svenson, S.B., Cowell, J.L., Undén, A., y Bartfai, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 1347-1351.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Neyrinck, J.L., Drobecq, H., Tartar, A. y Capron, A. (1988) *J. Immunol.* **141**, 1687-1694.
- Baharaoui, E., El Ayeb, M., Van Rietshoten, J., Rochat, H., y Granier, C. (1986) *Mol. Immunol.* **23**, 357-366.
- Bahraoui, E., El Ayeb, M., Granier, C. y Rochat, H. (1987) *Eur. J. Biochem.* **167**, 371-375.
- Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J.M., Darvon, H., El Ayeb, M., Granier, C., Marvaldi, J., y Rochat, H. (1988) *J. Immunol.* **141**, 214-220.
- Bahraoui, E.M., El Ayeb, M., Granier, C., Beress, L., y Rochat, H. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 55-60.
- Becerril, B., Vázquez, A., García, C., Corona, M., Bolívar, F., y Possani, L.D. (sometido).
- Berzofsky, J.A. and Schechter, A.N. (1981) *Mol. Immunol.* **18**, 751-763.
- Berzofsky, J.A. (1985) The nature and role of antigen processing in T cell activation: The year in Immunology 1985-1985, Cruse, J.M., and Lewis Jr, R.E. (Eds). Karger, Basel. 18-24.
- Berzofsky, J.A., Cease, K.B., Cornette, J.L., Spouge, J.L., Margalit, H., Berkower, I.J., Good, M.F., Miller, L.H., y DeLisi, C. (1987) *Immunol. Rev.* **98**, 9-52.
- Busch, R., Strang, G., Howland, K., y Rothbard, J.B. (1990) *Int. Immunol.* **2**, 443-451.
- Caterall, W. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5528-5536.
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. y Maelicke, A. (1982) *Nature* **296**, 90-91.
- Cease, K.B., Berkower, I., York-Jolley, J., y Berzofsky, J.A. (1986) *J. Exp. Med.* **164**, 1779-1784.
- Colina, K.F., Perler, F.B., Matsumura, I., Meda, M., y Nutman, T.B. (1990) *J. Immunol.* **145**, 1551-1556.

- Cox, E.M., Emerson, S.U., Lemon, S.M., Ping, L., Stapleton, J.M., y Feinstone, S.M. (1990) Use of oligonucleotide-directed mutagenesis to define the immunodominant neutralization antigenic site of HIV. *Vaccines 90*. Brown, F., Chanock, R.M., y Lerner, R.A. (Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 169-173.
- Charbit, A., Leclerc, C., Van der Werf, S., Martineau, P., Ronco, J., O'Callaghan, D., y Hofnung, M. (1990) Antibody response to foreign epitopes expressed within envelope proteins of Gram-negative bacteria. *Vaccines 90*. Brown, F., Chanock, R.M., y Lerner, R.A. (Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 451-455.
- Darbon, H., y Angelides, K.J. (1984) *J. Biol. Chem.* **256**, 6074-6084.
- Dehesa-Dávila, M. (1989) *Toxicon* **27**, 281-286.
- Dent, M.A.R. (1982) Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ducancel, F., Boulain, J.C., Tremeau, O., y Menez, A. (1989) *Protein Eng.* **3**, 139
- El Ayeb, M., Martin, M.F., Delori, P., Bechis, G., y Rochat, H. (1983) *Mol. Immunol.* **20**, 697-708.
- El Ayeb, M., Bahraoui, E., Granier, C., y Rochat, H. (1986) *Biochemistry* **25**, 6671-6678.
- Feeney, R. (1987) *Int. J. Peptide Protein Res.* **29**, 145-161.
- Fontecilla-Camps, J.C., Almasy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D., y Bugg, C. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **77**, 6496-6500.
- Fontecilla-Camps, J.C., Almasy, R.J., Ealick, S.E., Suddath, F.L., Watt, D.D., Feldmann, R.J. and Bugg, C.E. (1981) *Trends. Biochem. Sci.* **6**, 291-296
- Fontecilla-Camps, J.C., Habersetzer-Rochat, C., y Rochat, H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**, 7443-7447.
- García, C.R. Tesis Maestría, Colegio Ciencia y Humanidades, Universidad Nacional Autónoma de México. (En proceso).
- Geyson, H.M. (1985) *Immunol. Today* **6**, 364-369.
- Geyson, H.M., Macfarlan, R., Rodda, S.J., Tribbick, G., Mason, T.J., y Schoofs, P. (1987) Peptides which mimic carbohydrate antigens: Towards better carbohydrate antigens, Bell, R., y Torrigiani, G. (Eds.) Wiley, New York pp. 103-112.
- Gimenez-Gallego, G., Navia, M.A., Reuben, J.P., Katz, G.M., Kaczorowski, G.J. y Garcia, M.L. (1988) **85**, 3329-3333.
- Granier, C. Novotny, J., Fontecilla-Camps, J.C., Fourquet, P., El Ayeb, M., y Bahraoui, E. (1989) *Mol. Immunol.* **26**, 503-513.
- Green, N., Alexander, H., Wilson, A., Alexander, S., Shinnick, T.H., Sutcliffe, J.G. Lerner, R.A. (1982) *Cell* **28**, 477-487.
- Gurrola, G.B., Molinar-Rode, R., Stiges, M., Bayon, A., y Possani L.D. (1989) *J. Neural Transm.* **77**, 11-20.

- Possani, L.D., Ramírez, G.A., Fletcher, Jr. P.L. y Gurrola, M.A.H. (1978) FEBS. Lett. **91**, 261-264.
- Possani, L.D., Fletcher, Jr.,P.L., Alagón, A.B.C., Alagón, A.C., y Julia, J.Z. (1980) *Toxicon* **18**, 175-183.
- Possani, L.D., Dent, M.A.R., Martin, B. M., Maelicke, A., y Svendsen (1981a) *Carlsberg Res. Commun.* **46**, 207-214.
- Possani, L.D., Steinmetz, W.E., Dent, M.A.R., Alagón, A.C. y Wulthrich, K. (1981b) *Biochem. Biophys. Acta.* **669**, 183-192.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J., y Svendsen, I. (1981c) *Carlsberg Res. Commun.* **46**, 195-205.
- Possani, L.D., Martin, B.M., y Svendsen, I. (1982) *Calsberg Res. Commun.* **47**, 285-289.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., Rode, G.S. and Erickson, B.W. (1985) *Biochem. J.* **229**, 739-750.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Fletcher, M.D. y Fletcher Jr.P.L. (1991) *J. Biol. Chem.* **226**, 3178-3185.
- Possani, L.D. Coronas, F.I., Fletcher, Jr.P.L. Fletcher, M.D., Lucas, S., Von Elcksted, V.R. y Martin, B.M. (1992) II Symposium of the brazilian society on Toxinology, Campinas, Brasil.
- Ramírez, A.N., Gurrola, G.B., Martin, B.M., y Possani, L.D. (1988) *Toxicon* **26**, 773-783.
- Ramírez, G.A., Fletcher, Jr.P.L. Rode, G.S., y Possani, L.D. (1981) VII Int. Biophys. Cong. III Pan-Am. Biochem. Cong., México, pp. 157.
- Robinson, J.H., Atherton, M.C., Goodacre, J.A., Pinkney, M., Weightman, H., y Kehoe, M.A. (1991) *Infection and Immunity* **59**, 4324-4331.
- Rochat, H., Bernard, P., y Couraud, F. (1979) *Scorpion Toxins: Chemistry and mode action. Advances of Cytopharmacology vol. 3* (Ceccarelli, B. y Clementi, F. Eds.) Raven Press, New York, pp 325-334.
- Ruan, K.H. , Spurlino, J., Quirocho, F.A., y Atassi, Z. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 6156-6160.
- Sampieri, F., y Hebersetzer-Rochat, C. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* **535**, 100-109.
- Sela, M. (1966) *Adv. Immunol.* **5**, 29-129.
- Sela, M. (1969) *Science* **166**, 1365-1374.
- Schwartz, R.H. (1985) *Annu. Rev. Immunol.* **3**, 237-260.
- Talner, J.A., Getzoff, E.D., Alexander, H. (1984) *Nature (London)* **312**, 127-134.
- Talner, J.A., Getzoff, E.D., Paterson, Y.A. (1985) *Annu. Rev. Immunol.* **3**, 423-438.
- Talbot, P.J., Dionne, G., y Lacroix, M. (1988) *J. Virol.* **62**, 3032-3036.

- Herion, P., y Possani, L.D. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 281-292.
- Johnson, B.A., y Slugg, E.E. (1992) *Biochemistry* **31**, 8151-8159.
- Kharrat, R., Darbon, H., Rochat, H., y Granier, C. (1989) *Eur. J. Biochem.* **181**, 381-390.
- Kharrat, R., Darbon, H., Granier, C., y Rochat, H. (1990) *Toxicon*, **28**, 509-523.
- Kim, K.J., McKinness, S., y Manclark, Ch.R. (1990) *J. Immunol.* **144**, 3529-3534.
- Koprowski, H., y Melchers, F. (1986) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **130**, 1-85.
- Kranz, D.M., Herron, J.N. and Voss, E.W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6987-6995.
- Kurata, A., y Berzofsky, J.A. (1990) *J. Immunol.* **144**, 4526-4535
- Lamb, J.R., Ivanyi, J., Rees, A.D.M., Rothbard, J.B., Holand, K., Young, R.A., y Young, D.B. (1987) *EMBO J.* **6**, 1245-1249.
- Leonetti, M, Pillet, L., Maillere, B., Lamthanh, H., Franchon, P. Couderc, J., y Menez, A. (1990) *J. Immunol.* **145**, 4214-4221.
- Lerner, R. (1984) *Adv. Immunol.* **36**, 1-44.
- Livingstone, A., y Fathman, C.G. (1987) *Annu. Rev. Immunol.* **5**, 477-501.
- Londoño, J.A., Gras-Masse, H., Dubeaux, Ch., Tartar, A. y Drullhe, P. (1990) *J. Immunol.* **145**, 1557-1563.
- Martin, B.M., Carbone, E., Yatani, A., Brown, A.M., Ramírez, A.N., Gurrola, G.B. y Possani, L.D. (1988) *Toxicon* **26**, 785-794.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., y Phillips, M. (1985) *Nature* **313**, 316-318.
- Miranda, F., Rochat, H., y Lissitzky, S. (1962) *J. Chromatography* **7**, 142-154.
- Monroy-Velazco, J. (1961) *Rev. Mex. Cienc. Med. Biol.*, **1**, 1.
- Mudgett-Hunter, M., Anderson, W., Haber, E. and Margolies, M.N. (1985) *Mol. Immunol.* **22**, 477-488.
- Novotny, J. and Haber, E. 1986 *Biochemistry*; Bahraoui, E., El Ayeb, M., Van Rietschoten, J. (1986) *Mol. Immunol.* **23**, 357-366.
- Olamendi, T.C.P. (1991) Tesis de Maestría presentada al Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Parish, C.R., y Ada, G.L. (1969) *Immunology* **17**, 153-161.
- Parry, N.R., Syred, A., Rowlands, D.J., y Brown, F. (1988) *Immunology* **64**, 567-572.
- Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, Jr.P.L. y Erickson, B.W. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 394-403.

Thole, J.E.R., Van Schooten, W.C.A., Keulen, W.J., Hermans, P.W.M., Janson, A.A.M., De Vries, R.R.P., Kolk, A.H.J., Van Embden, J.D.A. (1988) *Infection and Immunity* **56**, 1633-1640.

Vaca, L.A.D. (1989) Tesis de Maestría presentada al Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Nacional Autónoma de México.

Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B.M., Gurrola-Briones, G., Herlon, P., y Possani, L.D. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 281-292.

Zavala, F., Tam, J.P., Barr, P.J., Romero, P.J., Ley, V., Nussenzweig, R.S., y Nussenzweig, V. (1987) *J. Exp. Med.* **166**, 1591-1596.

Zlotkin, E., Miranda, F., y RoCHAT, H. (1978) Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 48, Arthropod Venoms, (Bettini, S. Ed.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 317-369.

APENDICE

APENDICE 1

**SCORPION TOXINS: A MODEL FOR PEPTIDE
SYNTHESIS OF NEW DRUGS.**

**PROCEEDINGS OF THE
FIRST BRAZILIAN CONGRESS
ON PROTEINS**

**Benedito Olivalra
Valdemiro Sgarbieri
Editors**

**CONBRAP
90**

UNICAMP
March, 4 to 9, 1990.

UNICAMP

SCORPION TOXINS: A MODEL FOR PEPTIDE SYNTHESIS OF NEW DRUGS

L.D. POSSANI; G.B. GURROLA; T.O. PORTUGAL; F.Z. ZAMUDIO;
L.D. VACA; E.S.A. CALDERON and G.E. KIRSCH

Department of Biochemistry, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, 62270 México.
Department of Physiology and Molecular Biophysics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas
77030, USA.

Scorpion toxins are basic polypeptides of relatively low molecular weight (1), that recognize Na^+ and K^+ ion channels of excitable membranes (2). Two families of scorpion toxins have been described (review 3): long-chain peptides with 60 to 66 amino acid residues tightly bound by four disulfide bridges (4,5), which are specific blockers of Na^+ channels (6, reviews 7 and 8) and short-chain peptides with 38-39 amino acid residues bound by three disulfide bridges (9,10), that block K^+ channels (11, 12, reviews 13 and 14) of several excitable tissues. The most thoroughly studied are the Na^+ channel blockers, for which two sub-types of toxins have been named: α toxins, initially found in the Old World (Asia and Africa) scorpions, which affect the inactivation mechanism of the Na^+ channels and β toxins, found originally in the New World (America) scorpions, which modify the activation mechanism of the Na^+ channels. The complete amino acid sequence for at least 20 such toxins have been reported. The tridimensional structure, by X-Ray diffraction, is presently known for two distinct Na^+ channel toxins (5). Studies on the structure-function relationship of these toxins started with chemical modifications of specific residues in the native peptides (15). Recently, entirely synthetic peptides corresponding to the amino acid sequences of native toxins have been prepared (16, 17). A final objective is to obtain information on structural features of the toxins, that cause a specific function on excitable tissues. An alternative goal is to modify the toxicity of these peptides without affecting too much their antigenic determinants, for possible applications of such compounds in serotherapy or in direct immunization schemes, as synthetic vaccines. The purpose of this manuscript is to address various aspects of these experimental strategies. First, we describe the synthesis of several fragments from toxic peptides extracted, purified and characterized from the Mexican scorpion *Centruroides navius*. Second, we analyze the direct effect of the chemically obtained peptides on different biological preparations, and we verify their immunological properties in murine immune system. Finally, based on theoretical considerations of the structural similarities of Na^+ channel blocking toxins obtained through the metric analysis method (18), we report the design and synthesis of a chimeric toxin, and we study its biological properties, showing that scorpion toxins are good models for testing possible new pharmaceutical drugs.

MATERIAL AND METHODS

Purification and Characterization of Toxins

Venom from *Centruroides noxius* scorpions collected in Nayarit State (Mexico) was obtained by electrical stimulation of the glands (telsons), dissolved in water, centrifuged and the supernatant was freeze-dried and stored at -20°C , until used. Usually 10,000 scorpions are required to obtain 1 gram of venom.

Purification of toxins was carried out by the procedure previously described (3, 19). Briefly, soluble venom is separated by gel filtration in Sephadex G-50 column (0.9 x 200 cm), in 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7. Toxic fractions are further separated by ion exchange chromatography in two steps: first, a carboxymethyl-cellulose column (0.9 x 30 cm) equilibrated with 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 and eluted with a sodium chloride gradient from 0.0 to 0.5 M; and second, a similar chromatographic column, but at 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.0, eluted with NaCl gradient from 0.0 to 0.38M (3). Toxic components are monitored by intraperitoneal injection into albino mice (strain CD1), of 100 to 200 μl of fractions containing from 5 to 50 μg protein each. Lethality symptoms are salivation, lacrimation, dispnea, sporadic convulsions, paralysis of rear limbs, diarrhea, respiratory or cardiac arrest (20). Homogeneity of peptides are followed by gel electrophoresis using the beta-alanine-urea system, described by Reisfeld *et al.* (21). Eventually, a fourth purification step is required for certain toxic fractions, consisting of high performance liquid chromatography (HPLC), through a reverse phase column with an octadecylsilane resin (18). Further chemical characterization of purified components are conducted by amino acid analysis of hydrolyzates prepared by the method of Moore and Stein (22) in a Durrum D-500 amino acid analyzer (20). The primary structure determination follows the procedures earlier described (18), by means of automatic Edman degradation (23), using a Beckman 890M microsequencer, or an Applied Biosystem Sequencer (18).

Chemical Synthesis of Peptides

Peptides corresponding to the amino acid sequence of several toxins, purified and sequenced from the venom of the scorpion *C. noxius* (3, 18, 19, 23), was performed by the solid phase method of Merrifield (24). A detailed description of the technique used is found in our previous publications (17, 23). Briefly, this method consist of sequential condensation of protected amino acids, from which the first, at the C-terminal region, is covalently attached to a solid support (24), and subsequent enlargement of the polypeptide chain is obtained by polymerization with carbodiimide in presence of methylene chloride, used as solvent. Side-products are washed in each step of the cycle: deprotection, neutralization, condensation of each new amino acid added to the growing polymer. At the end of the synthesis, the resulting peptide is liberated from the solid support by fluorhydric acid cleavage, which also deprotects the reactive side-chains of some amino acids (24), depending on the specific sequences. For small peptides, containing only two or three amino acids the liquid phase method was used (25). Most peptides were synthesized manually; however, for very large peptides, like the chimeric toxin containing 57 amino acid residues, an automatic Applied Biosystem machine was used, according to the procedure implemented by the company. At the end of the synthesis all peptides were purified, either by thin layer chromatography (dipeptides and tripeptides) or by HPLC

(larger peptides), as described (17, 25). Verification of the synthesis after purification was carried out mainly by amino acid analysis or by amino acid sequence determination, as described before for the native toxins.

Immunological Studies

Several immunization schemes were followed to produce polyvalent or monoclonal antibodies in mice (strains Balb/c or CD1), (24, 26). Usually pre-immune serum was obtained from each animal before starting an immunization scheme. Several groups of animals, containing 6 to 10 mice, were used for each immunization scheme. Peptide alone (3 to 50 μ g) or peptide covalently attached to a carrier molecule, such as mouse serum albumin (24), tyroglobuline (26), or nitrocellulose paper (E. Calderon, unpublished) was used to immunize mice. Immunization proceeded either in presence of Freund adjuvant (24), alumina (26) or alone.

A typical immunization procedure will consist of 6 independent applications of antigens, separated on time by 15 days each, in every single animal. After one week of each injection, the animal were bled for testing the anti-sera. Double immuno-diffusion was conducted in agar gels as described (24). Monoclonal antibodies were obtained, selected and cloned, after fusion of spleen cells of immunized mice with a myeloma cell line (SP2/OAg-14), as described by F. Zamudio (23), and P. Herion, G. Gurrola, R. Saavedra, F. Zamudio, R. Sanchez, and L.D. Possani (in preparation). Radio-immune assay (RIA) or enzymatic-immuno assay (ELISA) were carried out, as described (23-26).

Bioassay and Physiological Characterization of Peptides

Values for medium lethal dose (LD50) of native toxins were obtained as described (20), using six or ten mice for each dose and injecting groups of six or ten mice for every LD50 determination (both for CD1 and Balb/c strains of mice). Lethality tests were performed in albino mice (strain CD1) using the three routes of administration. A stock solution of synthetic peptides, corresponding to the amino acid sequence of Noxiustoxin from positions 1 to 9 (NTX1-9) and 30 to 39 (NTX30-39), 10 mg/ml in water, was used. Synthetic peptide NTX1-20 was also tested, but the solubility in water was poor; stock solutions were prepared in presence of organic solvents, such as dimethyl-formamide, and subsequently diluted in appropriated buffers. Anisol, organic solvents and dithiothreitol in water at the same equimolar concentrations as the peptides were also injected in control animals to rule out the possibility of artifactual effects of these possible contaminants. Three animals were injected intraperitoneally, subcutaneously and intraventricularly. The cerebro-ventricular localization of the intra-cranial injection was controlled using Evans-Blue as a marker. Synthetic long-chain chimeric toxin was assayed by intraperitoneal injections in mice (strain CD1), 50 to 400 μ g/20 g mouse weight.

The experiments with synaptic terminals (synaptosomes) were performed with brains removed from adult albino mice (strain CD1). Brains without cerebellum of four mice were usually used to obtain purified synaptosomal fraction, following the method of Hajós (27), with slight modifications as described (28). Preloading of synaptosomes with [2,3-³H]-GABA], perfusion with the various experimental conditions and radioactivity measurements were performed as described (17).

Neutralization experiments with monoclonal or polyvalent antibodies were performed as indicated in the legends of the figures. For monoclonal antibody a 10 fold excess antibody over toxin was mixed together and incubated for 1 hr, at room temperature, prior to injection to the mice. The amount of toxin used was either the equivalent of one or ten LD50 values. For polyvalent anti-peptide or anti-toxin serum an amount of one LD50 value of toxin was preincubated 1 hr with 80 or 160 μ l of serum prior to injection to a group of 6 animals.

Cell culture (Neuroblastoma N18 cells) and electrophysiological recordings were performed as previously described (29, 31).

RESULTS AND DISCUSSION

Peptides corresponding to the amino acid sequence of toxins from the scorpion *C. noxius*, that block both sodium and potassium channels of excitable membranes, were synthesized (Figure 1). From Noxiustoxin (9), the following peptides were prepared: hexapeptide (NTX1-6), nonapeptide (NTX1-9) and eicosapeptide (NTX1-20) from the N-terminal region; pentapeptide (NTX35-39), decapeptide (NTX30-39), nonadecapeptide (NTX21-39) from the C-terminal part of the molecule; the full length peptide (NTX1-39) and a discontinuous hexapeptide containing the amino acid sequence of the tripeptide from the C-terminal part, covalently linked to the tripeptide from the N-terminal (NTX-II10) region of the toxin. From the Na⁺ channel blocker toxin II-9.22 (19,23), two peptides were synthesized: tetradecapeptide from positions 1 to 14 and a pentapeptide from positions 61 to 65. Finally, a decapeptide from the N-terminal region of toxin II-10 (19, unpublished) was also synthesized. All peptides were purified by high performance liquid chromatography, their amino acid compositions were determined, and when necessary the amino acid sequence was confirmed by direct Edman degradation in a microsequencer Beckman 890M (17, 23, 26). The long-chain peptide (chimeric-toxin) of 57 amino acid residues was also synthesized and used for toxicity, immunological and electrophysiological experiments (Figure 2.) This chimeric toxin was designed following general features of a comparative study, by the metric analysis method (18), of the primary structures of known sodium channel blocking toxins isolated from the venom of scorpion from all over the world. Figure 2 shows some of these characteristics. On the upper part, the α helix (n) and the β sheet (r) forming regions of variant 3 toxin, from *C. sculpturatus*, are shown, based on the X-ray data of this model toxin (5). On the bottom part, all common amino acids, highly conserved, are also indicated. Thirteen primary structures of scorpion toxins are compared. In order to enhance similarities among these sequences, gaps have to be introduced on the primary structures of the toxins from both North African and Asian scorpions, at the N-terminal part of the molecule, approximately at positions 17 to 20, which corresponds to the loop J of the tridimensional structure of the toxin. These peptides belong to the group of the α -scorpion toxins (32), while the toxins from American scorpions, represented by model toxin II of *C. suffusus suffusus*, belong to the β -scorpion toxins (32). The last family of toxins have gaps in the region of the loop B, corresponding to amino acids at positions 43 to 50. α -toxins affect the inactivation mechanism of Na⁺ channel, and β -toxins affect the activation mechanism (32). In designing chimeric toxin β , shown at the lower bottom part of Figure 2, similar amino acids to the American scorpion toxins were chosen, specially at the α helix and β sheet forming amino acids segments of the peptide. All cysteines were conserved and gaps were introduced in the loop J region.

The idea was to preserve general features, typical of the β -scorpion toxins. Two additional amino acids at positions corresponding to the J loop were introduced with the hope to modify affinity for the channel. We expect to obtain a novel synthetic β -scorpion toxin. The results presented here were obtained with the β -chimeric peptide, as produced by the automatic synthesizer, without further purification.

Figure 1. Amino Acid Sequence of Synthetic Peptides.

Peptides	Amino Acid Sequences		
	1	5	10
NTX1-39	Thr-Ile-Ile-Asn-Val-Lys-Cys-Thr-Ser-Pro-		
	11	15	20
	Lys-Gln-Cys-Ser-Lys-Pro-Cys-Lys-Glu-Leu-		
	21	25	30
	Tyr-Gly-Ser-Ser-Ala-Gly-Ala-Lys-Cys-Met-		
	31	35	39
	Asn-Gly-Lys-Cys-Lys-Cys-Tyr-Asn-Asn.		
NTX1-6	Thr-Ile-Ile-Asn-Val-Lys.		
NTX1-9	Thr-Ile-Ile-Asn-Val-Lys-Cys-Thr-Ser.		
NTX1-20	Thr-Ile-Ile-Asn-Val-Lys-Cys-Thr-Ser-Pro-		
	Lys-Gln-Cys-Ser-Lys-Pro-Cys-Lys-Glu-Leu.		
NTX35-39	Lys-Cys-Tyr-Asn-Asn.		
NTX30-39	Met-Asn-Gly-Lys-Cys-Lys-Tyr-Asn-Asn.		
NTX21-39	Tyr-Gly-Ser-Ser-Ala-Gly-Ala-Lys-Cys-Met-		
	Asn-Gly-Lys-Cys-Lys-Cys-Tyr-Asn-Asn.		
NTX1110	Tyr-Asn-Asn-Thr-Ile-Ile.		
	1	5	
II-9.2.2(1-14)	Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Asp-Lys-Asn-		
	10	14	
	Thr-Gly-Cys-Lys-Tyr.		
	61	65	
II-9.2.2(61-65)	Pro-Asn-Lys-Arg-Ser.		
	1	5	10
II-10(1-10)	Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Asn-Ser-Tyr-Thr.		

X-ray		bbbb	aaaaaaaa	bbbb	bbbb						
		1	10	20	30	40	50	60	70		
AaH	II	VKDGIVDDVN	CTYFC	GRNAYCNZEC	TKLK	GESGYCQNASPYGNACYCYKLPDHRVTRG	PGR	GH			
Lqq	V	LKDGYIVDDKN	CTYFC	GRNAYCNZEC	KK	KGGESGYCQNASPYGNACWCYKLPDHRVTRG	GR	GN			
Be	M10	VRDGYIADDD	CAYFC	GRNAYCNZEC	KK	GAESGKCYACQYGNACWCYKLPDHRVTRG	PK	QK	VSGKCN		
Lqq	IV	GVRDAYIADDD	CVYTC	GSHSYCNTEC	TK	DGAESGYCQNLGKYGNACWCYKLPDHRVTRG	PGR	CR			
AaH	I	KRDGYIVYPM	CVYTC	VP	P	CDGLC	KKNGGSSGSSCF	LVP	SGLACWCKDLPDHRVTRG		
Ts	gamma	KEGYLMNH	EGCKLSCYIR	PSGYCGRECGIK	K	GSSGYCAW	P	ACYCYGLPNNVWVDRATNLC			
Ts	III-8	KEGYAMNH	EGCKPSCYIR	PAGPCDGYCKTHLK	ASSGYCAW	P	ACYCYGVFNI...				
Ts	IV-5	KDGYPVETDN	CAYICWNY	DMATCDKLCIDK	K	ADSGYCTWV	H	ILCYCYGLPKX...			
Css	II	KEGYLVKSDGCKYECLELGDNDYCLRECKQQYGRKSSGGYCYA	F	ACWCTHLYEQAVVWVPLPNKTCN							
CsE	v3	KEGYLVKSDGCKYECLELGDNDYCLRECKQQYGRKSSGGYCYA	F	ACWCTHLYEQAVVWVPLPNKTCN							
CsE	I	KDGYLVK	TCCKKCYKLGENDYCNRECKQYGRKSSGGYCYG	F	GCYCEGLPDSTPTWVPLPNK	CT					
Cn	II-14	KDGYLVDA	EGCKKCYKLGENDYCNRECKQYGRKSSGGYCYG	F	GCYCEGLPDSTPTWVPLPNK	CT					
Clt	I	KEGYLVHSTGCKYECLELGDNDYCLRECKQQYGRKSSGGYCYA	F	GCWCTHLYEQAVVWVPLPNKTCN							
Common		Y	C	C	C	C	C	C	C		
				loop J			loop B				
β -Chimeric		KEGYLVKSDGCK	C	NDYCLRECKQQYGRKSSGGYCYA	AG	P	ACCTC	KLGDC	VAG	TK	C
			GRGEG								

Figure 2. Comparison of Primary Structure of Several Toxins by the Method of Metric Analysis. The following sequences were compared (see review 3): AaH II is toxin II from *Androctonus australis*; Lqq, from scorpion *Leiurus q. quinquestratus*; Be, from *Buthus eupeus*; Ts, from *Tityus serrulatus*; Ccs, from *Centruroides s. suffusus*; CsE, from *C. sculpturatus* Ewing; Cn, from *C. noxius* and Clt from *C. limpidus tecomanus*. The chimeric toxin, type β , was design after this analysis (last sequence). The upper part shows the X-ray diffraction results, where the α and β sheet forming amino acid sequence are labeled (5). In the bottom part of the sequences are also indicated the common amino acids and the loop J and B region of the molecules.

All the above mentioned synthetic peptides were tested for toxicity in mice. Table 1 shows that the most relevant information obtained is the presence of toxicity in peptides corresponding to the N-terminal amino acid sequence of Noxiustoxin (17), and toxin II-10 of *C. noxius*. The β -chimeric peptide was toxic at high concentration. However, peptides corresponding to the C-terminal part of Noxiustoxin were not toxic at very high dose (400 μ g/20 g mouse weight). Lethality tests have shown that the effects were dose dependent, but were independent of the route of administration of the peptides (intraperitoneally, subcutaneously or intra-cranially). Synthetic peptides corresponding to the C-terminal region of NTX were not toxic. The "in vivo" tests were confirmed by "in vitro" experiments using two systems, the neurotransmitter release assay with radiolabeled GABA preloaded to mouse brain synaptosomes (28), and an electrophysiological preparations by means of voltage-clamped measurements on excitable membranes (29). Figure 3 shows the results of some synthetic peptides on 3H-GABA release from synaptic terminals. It is clear from these experiments that the N-terminal fragments: NTX1-9 and NTX1-20 are active on neurotransmitter release, similar to the effect of native Noxiustoxin, while the C-terminal peptide NTX30-39 is not (17), given additional support to the lethality tests verified in mice. Further evidence showing that the N-terminal nonapeptide and eicosapeptide of Noxiustoxin affect K^+ ion channels was obtained by experiments done with voltage-clamped dorsal root ganglion neurons (33). NTX1-19 blocks the K^+ currents, in a similar manner, as the native toxin; the effect is reversible by washing the preparation with buffer (E. Carbone and L.D. Possani, unpublished).

Table 1. Lethality Tests of Synthetic Peptides.

Peptide (dose μ g)	Administration route		
	Intraperitoneally	Subcutaneously	Intraventricularly
NTX1-9 (200)	Intoxication symptoms within 20 min. Death after 4 hr	Intoxication symptoms within 20 min. hyperexcitability lacrimination, survived	Intoxication symptoms convulsions within 12 min. Death before 20 min.
NTX1-9 (100)	Doubtful symptoms	No symptoms	Toxic, death within 20 hr
NTX1-9 (20)	No symptoms	No symptoms	Symptoms slightly different from NTX
NTX1-20 (200)	Deadly	Not tested	Not tested
NTX30-39 (400)	No symptoms	No symptoms	No symptoms
Native NTX (40)	Deadly	Deadly	Deadly
II-10(1-10)-MSA	Deadly	Not tested	Not tested
β -chimeric1-57 (400)	Deadly	Not tested	Not tested

Note: MSA is mouse serum albumin to which peptide II-10(1-10) from *C. noxius* was coupled.

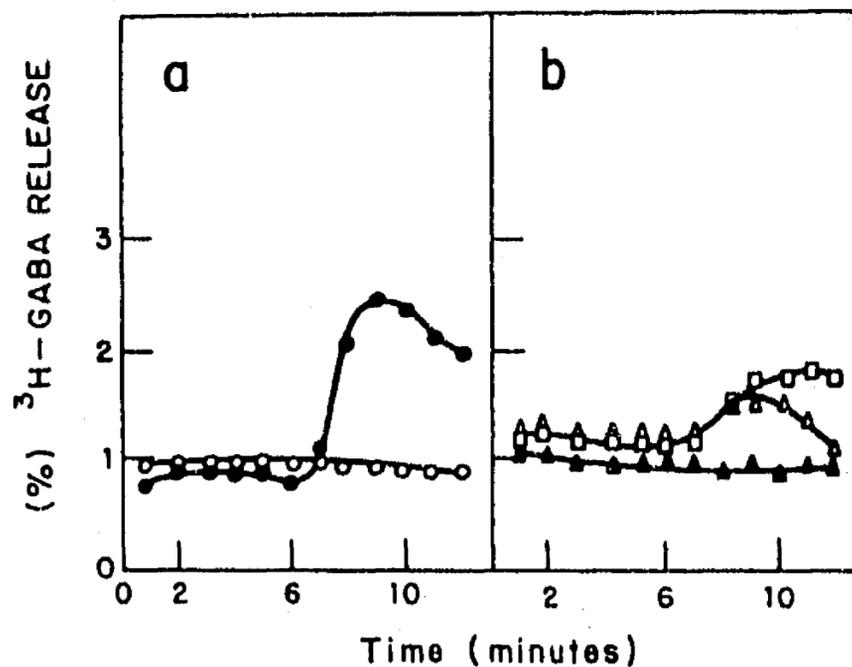


Figure 3. Effect of Native NTX and Synthetic Peptides on Transmitter Release. Synaptosomes obtained from mice were loaded with labeled GABA and perfused with standard Ringer's perfusion medium. Left (a) represents the effect of $0.2 \mu\text{M}$ native NTX (closed circles) and control (open circles). Right (B) the effect of $100 \mu\text{M}$ NTX1-9 (open triangles), $100 \mu\text{M}$ NTX30-39 (closed triangles), and $100 \mu\text{M}$ NTX1-20 (open squares).

Figure 4 shows the effect of β -chimeric peptide on a N18 neuroblastoma cell line, maintained in voltage-clamped experiments (29). Panels A and B show superimposed Na^+ current records obtained before and eight minutes after adding $9.2 \mu\text{M}$ β -chimeric peptide to the bathing solution. In the presence of toxin, currents were larger at more negative test potentials (A) but smaller at more positive potentials (B). The waveform of the currents in panel B was not altered by synthetic peptide; in particular, the fact that the inactivation phase was unchanged indicates that the chimeric toxin does not behave like an α toxin. Panel C shows the complete current-voltage (I-V) relationships before (open circles) and after (filled circles) chimeric toxin application. Toxin treatment resulted in both a shift of the I-V curve to more negative potentials and a 20% block of maximum conductance. The block could be relieved by washing with toxin-free solution (not shown) but the shift could not. A similar degree of shift was detected in voltage dependence of steady-state inactivation (D). The chimeric toxin therefore shows the characteristic features of β -scorpion toxins, as predicted by the metric analysis studies and by the designin features discussed above (Figure 2). However, the potency seems reduced compared with native toxin, as also expected, although other reason could explain the low toxicity levels of the β -chimeric peptide. For example, the possibility of the presence of undesirables synthetic peptides (crude preparation of synthetic β -chimeric toxin) and/or the presence of wrong formation of the appropriate disulfide bridges. We should recall that this peptide has eight cysteines, with the possibility of forming 4 different disulfide bridges.

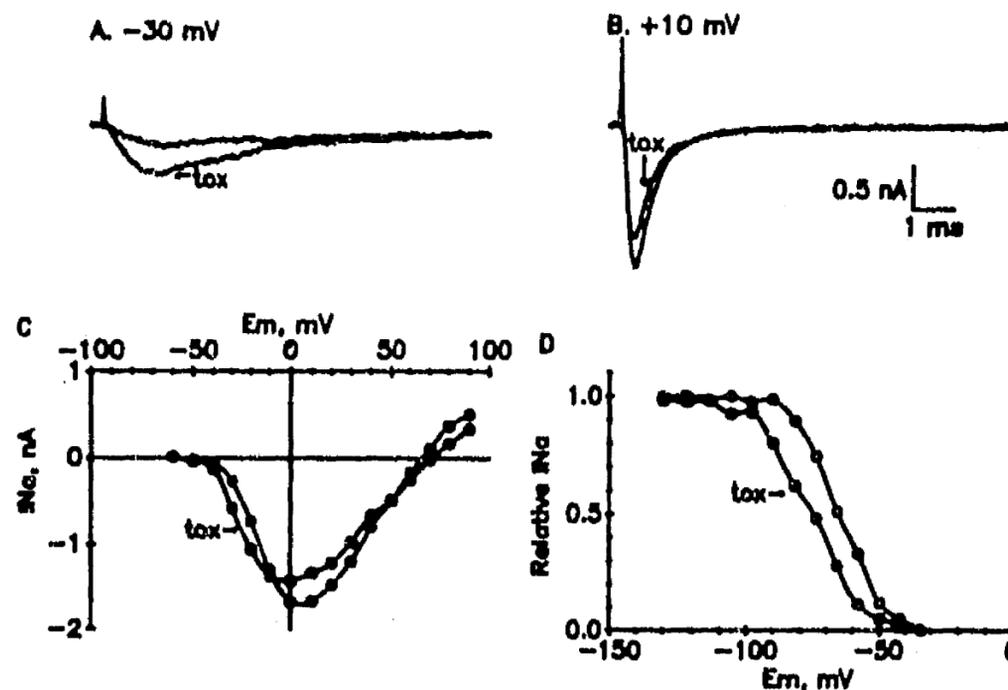


Figure 4. Effects of Chimeric Peptide 1-57 on Na currents of N18 Neuroblastoma Cell. Holding potential was -90 mV . The records were filtered at 5 kHz (-3 dB). Panels A-B show superimposed Na current records obtained before and eight minutes after adding $9.2 \mu\text{M}$ toxin to bathing solution. Panel C shows the complete current-voltage (I-V) relationship before (open circles) and after (filled circles) toxin application. A similar degree of shift was detected in the voltage dependence of steady-state inactivation (D). The experiments were performed at room temperature (25°C). Similar results were obtained in 4 additional experiments.

In conclusion, these data shows that it is possible to obtain synthetic peptides, with amino acid sequence corresponding to native toxins, which mimic the function of naturally occurring peptides; hence, opening the possibility of designing new pharmacological drugs to study or to interfere with the normal function of excitable tissues.

The second important set of experiments conducted with the synthetic peptides of Figure 1 and 2 concern the immunological properties of these peptides. As shown in figures 5 to 7, all peptides are capable of eliciting an immunological response in mice. Figure 5 shows the results of immunodiffusion in agarose gels.

Figure 5. Immunodiffusion with Sera Anti-synthetic Peptides. The central well contains synthetic NTX1-39 coupled to mouse serum albumin. Peripheral wells contain anti-sera obtained against synthetic peptides NTX1-39 (lower well), NTX21-39 (right well), NTX30-39 (upper well), and control with buffer-saline (left well).

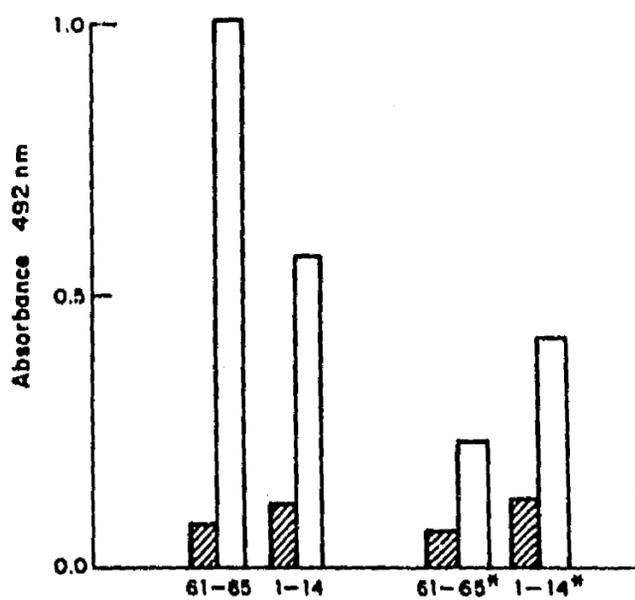


Figure 6. Elisa Assays with Serum from Mice Immunized with Synthetic Peptides. Elisa plates were coated with, either synthetic peptides covalently linked to albumin (left set of bars), or peptides alone* (right set of bars). Anti-sera were obtained with synthetic peptides II-9.2.2(1-14) and II-9.2.2.(61-65). Bars (white) represent immune sera, while shadowed bars are from pre-immune mice.

The central contains well contains full length synthetic Noxiustoxin (NTX1-39) coupled to mouse serum albumin, and in the peripheral wells several anti-sera obtained against synthetic peptides NTX1-39 (lower well), NTX21-39 (wright well), NTX30-39 (upper well) and control with buffer-saline (left well). All anti-sera recognize the full length synthetic peptide NTX1-39. Care must be taken, because mouse serum albumin treated with carbodiimide alone is also a good antibody forming agent (data not shown). Pre-adsorption of antibodies to albumin must be performed, before assaying the hyper-immune serum, in order to avoid artefactual positive results. Furthermore, mice immunized with synthetic peptide (NTX1-39) are protected when challenged with a lethal dose of native NTX (24). Figure 6 shows the profile of ELISA assays conducted with serum obtained from mice immunized against synthetic tetradecapeptide toxin II-9.2.2 (at positions 1-14), and pentapeptide (positions 61 to 65), corresponding to the C-terminal amino acid sequence of the same toxin from *C. noxius*. The readings at 492 nm in the ELISA plates were higher for the sera of immunized mice (right bars), compared to pre-immune sera (left bars). Adsorption of peptides linked to a carrier molecule (left set of bars), gives better results than peptide alone (right set of bars). Note that the carrier molecule used for the ELISA assay was albumin, while the carrier used for immunization was tyroglobulin.

This strategies diminishes the probability of false positive results. Another hand the apparent lower levels of antibodies obtained with peptide alone could be due to a lesser extent of binding of the synthetic peptides to the ELISA plates. Regardless of the actual level of antibodies, it seems clear from these experiments, that both peptides (1-14 and 61-65) are immunogenic in mice. The next set of experiments (Figure 7) shows that mice (strain Balb C) immunized with native toxin II-9.2.2 or with β -chimeric peptide1-57 (Figure 2) produces antibodies capable of recognizing the native toxin. In Figure 7 A we show the results of a LD75, that is, the native toxin concentration capable of killing 75% of a mouse population (control mice). Figure 7 B shows the results of direct challenging immunized mice with a LD75 of native toxin. The mice assayed in B were previously immunized with native toxin (six injections of a sub-lethal dose); 100% survival was obtained. Therefore, native toxin II-9.2.2 immunizes mice by producing protecting antibodies. Figure 7 C shows the results of a group of mice used for the determination of the LD50 value of native toxin II-9.2.2; and D shows the challenge of mice (six) with a LD50 concentration (always corrected to 20 g of mouse body weight) of native toxin to mice previously immunized with β -chimeric peptide. No apparent protection was found in this experiment. However, in Figure 7, E and F a definitive result was obtained, showing that animals immunized with the synthetic β -chimeric peptide1-57 produce serum capable of protecting third animals in "in vivo" challenge, after pre-mixing anti-sera against chimeric toxin with native toxin II-9.2.2, in amounts of an equivalent LD50 value. In Figure 7 E, 160 μ l of serum from mice immunized with β -chimeric toxin were mixed with buffer containing native toxin II-9.2.2. (one LD50 value), incubated for 1 hr at room temperature and challenged a third group of mice (non immunized); 100% survival was observed. In Figure 7 F, the same experiment was conducted, but decreasing the amount of anti-serum to 80 μ l; a partial protection was obtained, 25% of mice died. The last two experiments show that the serum produced by mice immunized against the synthetic β -chimeric toxin, when mixed with native toxin (one LD50 value) and injected in control mice protect them in a dose dependent manner. An amount equivalent to 160 μ l of anti-serum is required to neutralize one LD50 value of native toxin. Taking together the experimental results of Figure 7 C to F we conclude that beta-chimeric toxin is potentially promising to serve as a

The central contains well contains full length synthetic Noxiustoxin (NTX1-39) coupled to mouse serum albumin, and in the peripheral wells several anti-sera obtained against synthetic peptides NTX1-39 (lower well), NTX21-39 (right well), NTX30-39 (upper well) and control with buffer-saline (left well). All anti-sera recognize the full length synthetic peptide NTX1-39. Care must be taken, because mouse serum albumin treated with carbodiimide alone is also a good antibody forming agent (data not shown). Pre-adsorption of antibodies to albumin must be performed, before assaying the hyper-immune serum, in order to avoid artefactual positive results. Furthermore, mice immunized with synthetic peptide (NTX1-39) are protected when challenged with a lethal dose of native NTX (24). Figure 6 shows the profile of ELISA assays conducted with serum obtained from mice immunized against synthetic tetradecapeptide toxin II-9.2.2 (at positions 1-14), and pentapeptide (positions 61 to 65), corresponding to the C-terminal amino acid sequence of the same toxin from *C. noxius*. The readings at 492 nm in the ELISA plates were higher for the sera of immunized mice (right bars), compared to pre-immune sera (left bars). Adsorption of peptides linked to a carrier molecule (left set of bars), gives better results than peptide alone (right set of bars). Note that the carrier molecule used for the ELISA assay was albumin, while the carrier used for immunization was tyroglobulin.

This strategies diminishes the probability of false positive results. Another hand the apparent lower levels of antibodies obtained with peptide alone could be due to a lesser extent of binding of the synthetic peptides to the ELISA plates. Regardless of the actual level of antibodies, it seems clear from these experiments, that both peptides (1-14 and 61-65) are immunogenic in mice. The next set of experiments (Figure 7) shows that mice (strain Balb C) immunized with native toxin II-9.2.2 or with β -chimeric peptide1-57 (Figure 2) produces antibodies capable of recognizing the native toxin. In Figure 7 A we show the results of a LD75, that is, the native toxin concentration capable of killing 75% of a mouse population (control mice). Figure 7 B shows the results of direct challenging immunized mice with a LD75 of native toxin. The mice assayed in B were previously immunized with native toxin (six injections of a sub-lethal dose); 100% survival was obtained. Therefore, native toxin II-9.2.2 immunizes mice by producing protecting antibodies. Figure 7 C shows the results of a group of mice used for the determination of the LD50 value of native toxin II-9.2.2.; and D shows the challenge of mice (six) with a LD50 concentration (always corrected to 20 g of mouse body weight) of native toxin to mice previously immunized with β -chimeric peptide. No apparent protection was found in this experiment. However, in Figure 7, E and F a definitive result was obtained, showing that animals immunized with the synthetic β -chimeric peptide1-57 produce serum capable of protecting third animals in "in vivo" challenge, after pre-mixing anti-sera against chimeric toxin with native toxin II-9.2.2, in amounts of an equivalent LD50 value. In Figure 7 E, 160 μ l of serum from mice immunized with β -chimeric toxin were mixed with buffer containing native toxin II-9.2.2. (one LD50 value), incubated for 1 hr at room temperature and challenged a third group of mice (non immunized); 100% survival was observed. In Figure 7 F, the same experiment was conducted, but decreasing the amount of anti-serum to 80 μ l; a partial protection was obtained, 25% of mice died. The last two experiments show that the serum produced by mice immunized against the synthetic β -chimeric toxin, when mixed with native toxin (one LD50 value) and injected in control mice protect them in a dose dependent manner. An amount equivalent to 160 μ l of anti-serum is required to neutralize one LD50 value of native toxin. Taking together the experimental results of Figure 7 C to F we conclude that beta-chimeric toxin is potentially promising to serve as a

model for production of a synthetic vaccine against scorpion toxins. The inconclusive results of Figure 7 D can be explained, among other things, by the appearance of immunological sensitization, due to the use of impure antigens (synthetic β -chimeric toxin), which is not an unusual phenomenon.

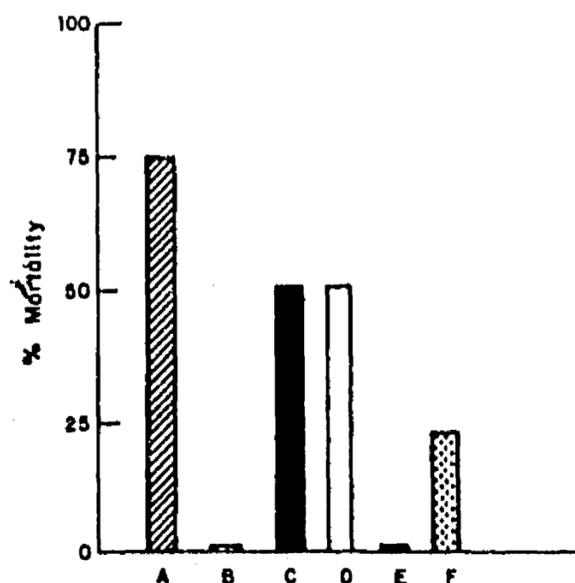


Figure 7. "In vivo" Challenge of Control and Immunized Mice with Native Toxin. Letters A and C represent respectively, the LD75 and LD50 of native toxin II-9.2.2 injected in control animals. B is 100% survival of mice pre-immunized with native II-9.2.2. and challenged with one LD75 of the same toxin. D represents mice pre-immunized with β -chimeric peptide and challenged with one LD50 value of toxin II-9.2.2. E and F are experiments using control animals injected with a mixture of native toxin (one LD50 value) and two different volumes (E is 160 μ l, and F is 80 μ l) of sera obtained from mice preimmunized with β -chimeric peptide 1-57.

Finally, another approach has been followed to study relevant antigenic determinants in the structure of scorpion toxins, by means of the use of monoclonal antibodies.

Figure 8 shows displacement curves of a monoclonal antibody (BNTX-16, produced by P. Héron, G. Gurrola, R. Saavedra, R. Sánchez, F. Zamudio and L. Possani, unpublished) performed through ELISA assays, using native Noxiustoxin and several synthetic peptides containing amino acid sequences of NTX. The pentapeptide (NTX35-39) is not capable of displacing the binding of native NTX, while synthetic hexapeptide NTX1-6 and the discontinuous peptide NTX10 are capable of displacing almost entirely the binding of native toxin to the monoclonal antibody. The discontinuous peptide is more efficient than the linearly continuous peptides. This type of experiments is useful for determination of possible epitopes in the antigenic molecules, specially if complemented with neutralization experiments, as shown in Table 2. This table reports the results of mixing toxin II-9.2.2 with various distinct monoclonal antibodies (23) and injecting into mice. Toxin alone injected to 5 mice at a dose of 10 LD50 kills all mice within 20 min. The same happens when 10 LD50 doses of toxin are premixed with a non related monoclonal

antibody (BTX-16). However, one of the monoclonal antibodies against toxin II-9.2.2 (BCF2) was capable of prolonging the life of 3 animals for approximately three days (60hr) and actually 2 out of 5 animals survived several weeks (they did not die by scorpion toxin action). If an LD50 dose is used, the 5 animals survive the injection. Other monoclonal antibodies (BCF1, BCF3, BCF7 to 9) prolonged the survival from 15 to 20 hr (data not shown), but all mice eventually died, when injected with an excess of 10 LD50 values of toxin preincubated with purified antibodies (10 fold excess antibody over the molar ratio of toxin). These data were interpreted as follows: only one of the six distinct monoclonal antibodies obtained (23) was able to produce neutralizing antibodies against toxin II-9.2.2.

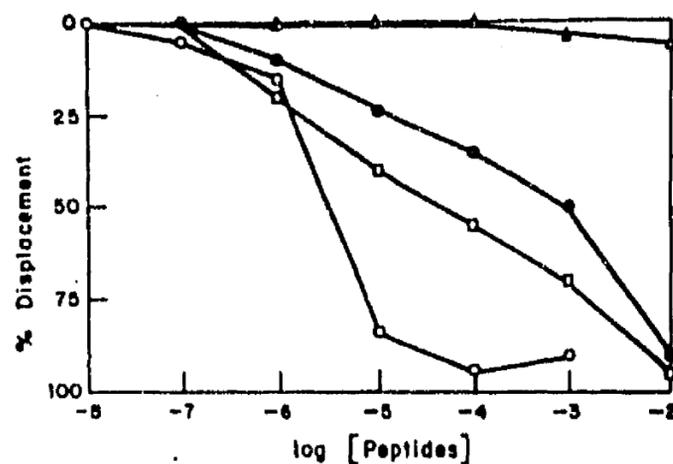


Figure 8. Displacement Curves of Monoclonal Antibody BNTX 16 with Synthetic Peptides. Native Noxiustoxin attached to the ELISA plate is capable of binding monoclonal antibody BNTX16. The binding of BNTX16 is displaced by addition of excess free NTX, as indicated by open circles, but is not displaced by synthetic NTX35-39 (open triangles). Two synthetic peptides: NTX1-6 (closed circles) and a discontinuous peptide H10 (open squares) are capable of competing with native toxin for the binding to the monoclonal antibody. Rabbit anti-mouse immunoglobulines attached with peroxidase were used to develop the ELISA color on the plates.

Table 2. "In vivo" Neutralization Assay with Monoclonal Antibodies Anti-toxin C. noxius II-9.2.2.

Mixture injected (toxin + antibody)	Mice Survival (alive/total)	Time of Survival (mean value hours)
Toxin alone	0/5	1/3
Toxin + BNTX16	0/5	1/3
Toxin + BCF1,8,9	0/5	60
Toxin + BCF5	0/5	15
Toxin + BCF2	2/5*	60
Toxin + BCF2	5/5**	Indefinite

Quantities of toxin equivalent to ten LD50 values were mixed with antibodies at molar ratio 1:10 (toxin:anti-body), incubated at room temperature for 1 hr, before intraperitoneal injection in 5 mice each experiment; * Two mice survived more than 3 weeks, in good health; ** In this experiment toxin equivalent to one LD50 value was mixed with the monoclonal BCF2.

This antibody (BCF2) is now been examined against a variety of synthetic peptides to determine a plausible epitope, capable of displacing the binding of the monoclonal antibody to the parent toxin. It is expected that a similar result as the one obtained in Figure 8 might be found. In this event, a new synthetic peptide will be designed with the expectancy of obtaining a possible antigen to be used as a vaccine against toxin II-9.2.2 from *C. noxius*. This leads to another problem, since scorpion venoms are composed by families of related toxic peptides and it is important to synthesize a peptide that could protect against all the toxins. Figure 9 shows displacement experiments were a monoclonal antibody (BCF8) was similarly displaced by a variety of different toxins from *C. noxius* venom and by a toxin from another scorpion species *C. limpidus tecomanus*. Analysis of the primary structure of these toxins has provided evidence for conservative regions of the primary structure of the toxins assayed (23). Thus, using this approach relevant information can be obtained, that may turn out to be important in designing new drugs (synthetic vaccines).

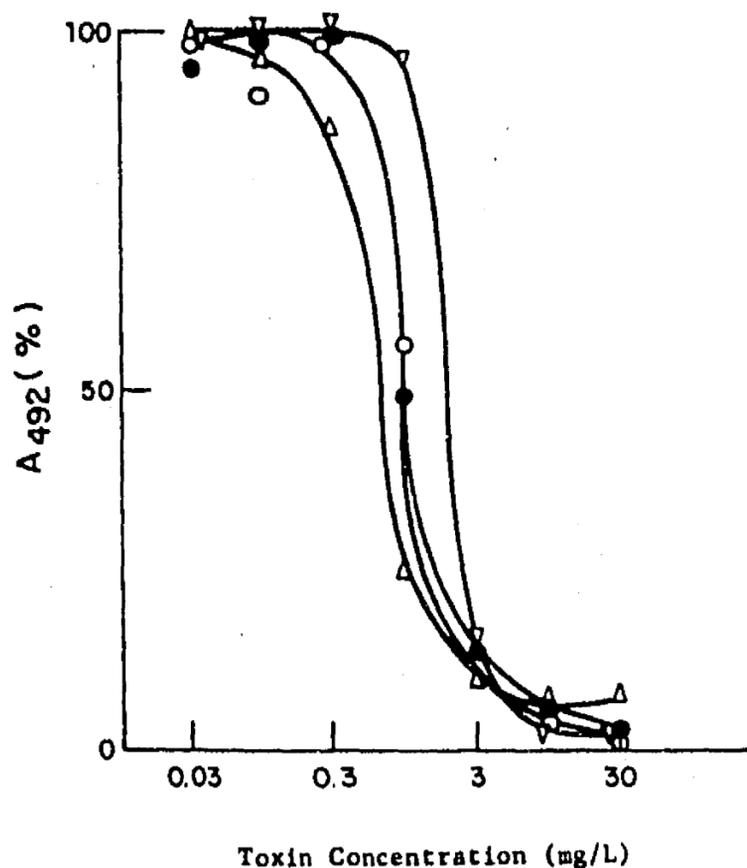


Figure 9. Displacement Experiments with Monoclonal Antibody BCF8. Toxin II-9.2.2 attached to ELISA plates are recognized by the monoclonal antibody BCF8. The binding of this monoclonal is displaced by addition of free native toxin (open circles) at the concentrations indicated. Toxin II-14 (triangles pointing upward) from the same scorpion *C. noxius* is as potent as toxin II-9.2.2 in displacing the binding of monoclonal BCF8 to the plates. Similarly two other toxins: II-10 from *C. noxius* (closed circles) and toxin 1 from *C. limpidus tecomanus* (triangles pointing downward) are very effective competitors. Rabbit anti-mouse immunoglobulines labeled with peroxidase were used as second antibodies.

SUMMARY

This communication reports experiments utilizing a series of synthetic peptides, which corresponds to the amino acid sequences of fragments of the primary structure of sodium and potassium channel blocking peptides, purified from scorpion venoms. Among these synthetically obtained fragments, some are toxic "per se" and eventually could be used as new drugs for studying ion channel of excitable membranes, such as the nonapeptide NTX1-9. Others are not toxic, but are immunogenic. Larger synthetic peptides, like NTX1-39 and beta-chimeric peptide1-57 are probably better candidates to be used in immunization protocols. In summary, our work documents a number of potentially valuable experimental approaches for the development of new pharmaceutical drugs, namely: the use of monoclonal antibodies obtained against native toxins, displacement experiments with synthetic peptides containing amino acid sequences identical or similar to that of natural toxins, neutralization experiments followed by "in vivo" challenges, and finally, direct lethality tests in conjunction with electrophysiological recordings.

ACKNOWLEDGEMENTS

The technical assistance of Mr. Fredy I. Coronas Valderrama and Humberto Moncada is greatly appreciated. The authors also thank Prof. Dr. Emilio Carbone from the University of Torino (Italy) and Prof. Dr. Arthur Brown from the Baylor College of Medicine (USA) for support and discussions. Dr. Alejandro Bayon and Dr. Maria Sitges from the National University of Mexico (Mexico), are also acknowledged for Figure 3.

This work was partially supported by a grant from Rockefeller Foundation (RF870349, #26), and by grants PVT/QI/NAL/84/2182, PVT/Al/NAL/85/3029 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT).

REFERENCES

1. MIRANDA, E; ROCHAT, H.; and LISSITZKY, S. *J. Chromatography*, 7:142-154, (1962).
2. KOPPELHÖFER, E.; and SCHMIDT, H. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 303:133-149, (1968).
4. POSSANI, L.D. Structure of scorpion toxins, in *Handbook of Natural Toxins* (Ed. A.T. Tu), vol. 2, pp. 513-550, Marcel Dekker Inc., New York, (1984).
4. ROCHAT, H.; BERNARD, P. and COURAUD, E. Scorpion toxins: chemistry and mode of action, in *Advances of Cytopharmacology* (Eds. Ceccarelli, B. and E. Clementi), vol. 3, pp.325-334, Raven Press, New York, (1979).
5. FONTECILLA-CAMPS, J.C.; ALMASSY, R.J.; SUDDATH, E.L.; WATT, D.D. and BUGG, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 77:6496-6500 (1980), and Fontecilla-Camps, J.C., Habersetzer-Rochat, C. and Rochat, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 85:7443-7447, (1988).
6. CATTERALL, W. *J. Biol. Chem.*, 251:5528-5536, (1976).
7. MEVES, H.; SIMARD, J.M. and WATT, D.D. *Ann. New York Acad. Sci.*, 479:113-132, (1986).

8. LAZDUNSKI, M.; FRELIN, C.; BARIHANIN, J.; LOMBET, A.; MEIRI, H.; PAURON, D.; ROMÉY, G.; SCHMID, A.; SCHWEITZ, H.; VIGNE, P. and VIJVERBERG, H.P.M.: *Ann. New York Acad. Sci.*, 479:204-220, (1986).
9. POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M. and SVENDSEN, I. *Carlsberg Res. Commun.*, 47:285-289, (1982).
10. GIMENEZ-GALLEGO, G.; NAVIA, M.A.; REUBEN, J.P.; KATZ, G.M.; KACZOROWSKI, G.J. and GARCIA, M.L. *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, 85:3329-3333, (1988).
11. CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L.D. and MAELICKE, A. *Nature*, 296:90-91, (1982).
12. MILLER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R. and PHILLIPS, M. *Nature*, 313:316-318, (1985).
13. CASTLE, N.A.; HAYLETI, D.G. and JENKINSON, D.H. *Trends Neurosci.*, 12:59-65, (1989).
14. MOCZYDLOWSKI, E.; LUCCHESI, K. and RAVINDRAN, A. *J. Membrane Biol.*, 105:95-111, (1988).
15. HABERSETZER-ROCHIAT, C. and SAMPIERI, F. *Biochemistry*, 15:2254-2261, (1976).
16. GRANIER, C.; BAHRAQUI, E.; VAN RIETSCHOTER; ROCHIAT, H. and EL-AYEB, M. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 23:187-197, (1984).
17. GURROLA, G.B.; MOLINAR-RODE, R.; SITGES, M.; BAYON, A. and POSSANI, L.D. *J. Neural Transm.*, 77:11-20, (1989).
18. POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; SVENDSEN, I.; RODE, G.S. and ERICKSON, B.W. *Biochem. J.*, 229:739-750, (1985).
19. POSSANI, L.D.; DENTI, M.A.R.; MARTIN, B.M.; MAELICKE, A. and SVENDSEN, I. *Carlsberg Res. Commun.*, 46:207-214, (1981).
20. POSSANI, L.D.; ALAGON, A.C.; FLETCHER, Jr. P.L. and ERICKSON, B.W. *Arch. Biochem. Biophys.*, 180:394-403, (1977).
21. REISFELD, R.A.; LEWIS, U.J. and WILLIAMS, D.E. *Nature*, 195:281-283, (1962).
22. MOORE, S. and STEIN, W.H. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In: *Methods of Enzymology* (Eds. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) vol. 6, pp 816-831, Academic Press, New York, (1963).
23. ZAMUDIO, F.Z. Obtencion, caracterizacion y uso de anticuerpos monoclonales para el estudio de estructura y funcion de toxinas de alacranes. Master of Sciences Thesis presented at the School of Chemistry, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, (1989).
24. GURROLA, G.B. Sintesis quimica de peptidos correspondientes a secuencias de aminoacidos de toxinas de alacranes y sus propiedades. Master of Sciences Thesis presented at the School of Chemistry, Universidad Nacional Autonoma de Mexico (1986).
25. VACA, L.A.D. Sintesis de peptidos correspondientes a la secuencia de la Noxiustoxina: Determinantes antigenicos y efectos sobre canales ionicos. Master of

Sciences Thesis presented to Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, (1989).

26. OLAMENDI, T.C.P.; GURROLA, G.B. and POSSANI, L.D. Respuesta inmune de ratones a peptidos sinteticos correspondientes a la secuencia de aminoacidos de la toxina H-9.2.2. del alacran *C. noxius*. Abstract 0142, Proceedings VIII National Congress of the Mexican Immunology Society, S. Luis Potosi, Mexico, (1989).
27. HAJÓS, F. *Brain Res.*, 93:485-489.
28. SITGES, M.; POSSANI, L.D. and BAYON, A. *J. Neuroscience*, 6:1570-1574, (1986).
29. KIRSCII, G.E.; SKATTEBOI, A.; POSSANI, L.D. and BROWN, A.M. *J. Gen. Physiol.*, 93:67-83, (1989).
30. HAMILI, O.P.; MARTY, A.; SAKMANN, B.; and SIGWORTH, F.J. *Pfluegers Archiv*, 391:85-100, (1981).
31. LUX, H.D. and BROWN, A.M. *J. Gen. Physiol.*, 117:500-544, (1984).
32. JOVER, E.; COURAUD, F. and ROCHAI, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95:1607-1614, (1980).
33. CARBONE, E. and LUX, H.D. *J. Physiol.*, 386:547-570, (1987).

APENDICE 2

PROTECCION CONTRA ALACRAN.

VACUNAS CIENCIA Y SALUD

EDITADO POR:

Alejandro Escobar Gutiérrez

José Luis Valdespino Gómez

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

SECRETARIA DE SALUD

México, 1992

PROTECCION CONTRA EL ALACRANISMO

LOURIVAL D. POSSANI
EMMA S. A. CALDERON
TIMOTEO P OLAMENDI
MANUEL DEHESA DAVILA
GEORGINA B. GURROLA

En este capítulo se revisarán algunos aspectos del problema del alacranismo en México. Se discutirán algunos datos obtenidos con una vacuna experimental animal, para la cual el antígeno fue generado por polimerización de extractos solubles de glándulas venenosas de alacranes mexicanos. Se dará énfasis a la discusión de los procedimientos y datos bioquímicos más importantes obtenidos en el fraccionamiento del veneno soluble extraído por estimulación eléctrica de telsons de alacranes vivos. También se mencionarán algunas propiedades inmunológicas de los extractos de las glándulas, del veneno soluble, de sus fracciones cromatográficas y de sus polipéptidos altamente purificados. Finalmente, se presentarán datos de ratones inmunizados con péptidos sintéticos, diseñados con base a la secuencia de aminoácidos de las toxinas de alacranes.

Las perspectivas futuras de este trabajo se enfocan a la determinación de epítopos protectores de las toxinas del veneno y a la clonación y modificación por ingeniería genética de genes que codifican para estos péptidos tóxicos.

No obstante el vasto trabajo experimental realizado, todavía no existe una vacuna disponible contra los efectos neurotóxicos del veneno de alacrán.

Desde el punto de vista médico, el problema del envenenamiento por piquete de alacrán DEBE SER TRATADO MEDIANTE EL USO DEL SUERO ANTIALACRAN, única medicina de elección para el tratamiento los casos severos de accidentes con estos arácnidos.

ASPECTOS CLINICOS

El alacranismo es un problema de salud pública originado por la picadura de alacranes venenosos. Afecta a grandes núcleos de población, tanto en el medio rural como en el urbano, y da lugar a altas tasas anuales de morbilidad. Se estima que en México por lo menos 200,000 personas son picadas anualmente por estos arácnidos, ocasionando cerca de 700 a 800 muertes (1,2).

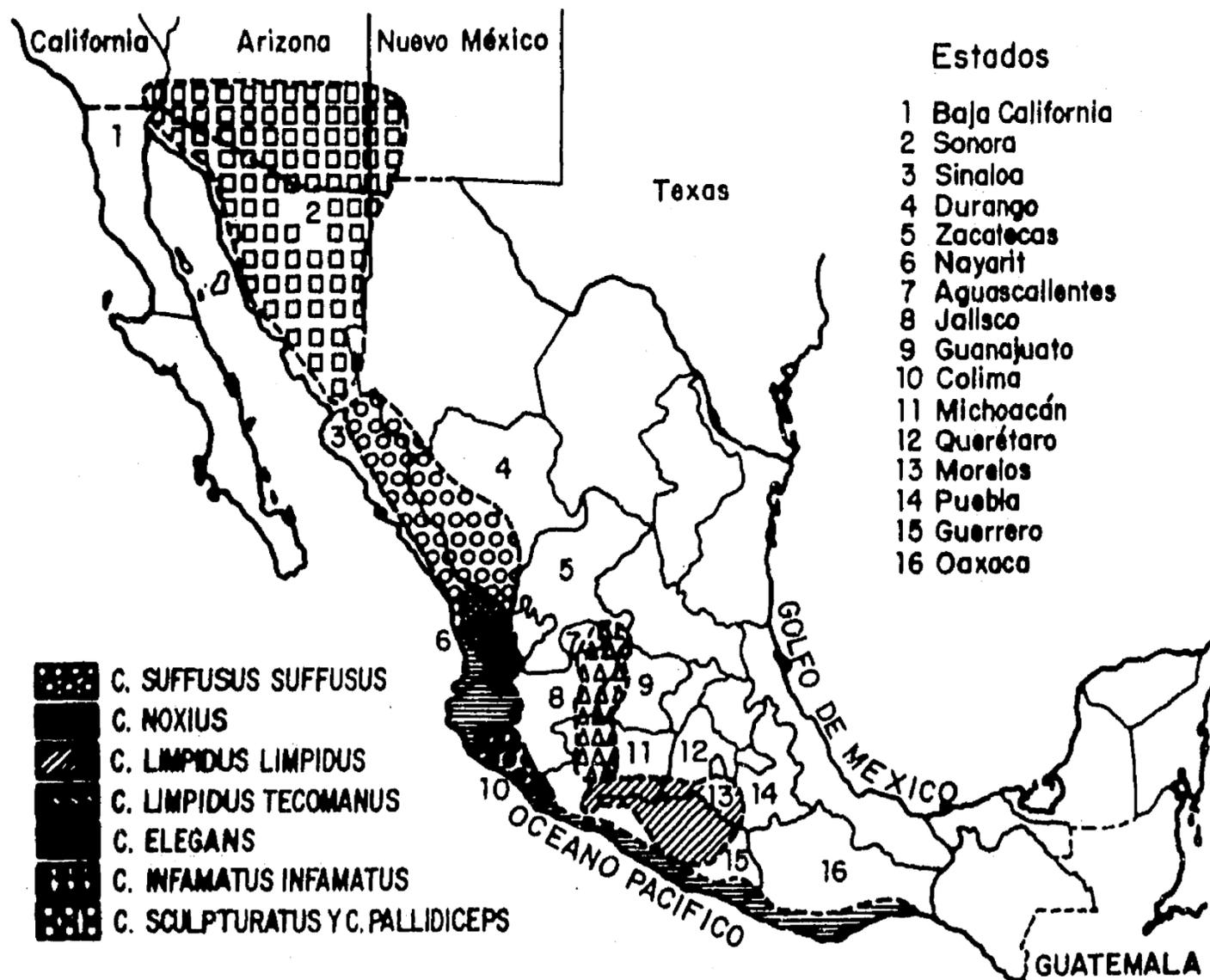
Históricamente se consideraba que las zonas de mayor riesgo eran la ciudad de Durango y el estado de Colima. Sin embargo, la magnitud de este fenómeno abarca una gran extensión de nuestro país. En la figura # 1, se sitúa de forma esquemática la distribución geográfica de las especies peligrosas de alacranes mexicanos.

El *Centruroides suffusus suffusus* se localiza en Durango, noroeste de Zacatecas y este de Sinaloa; *Centruroides noxius* se encuentra en Nayarit, sureste

de Sinaloa y noroeste de Jalisco; *Centruroides limpidus limpidus* abarca Morelos, suroeste del estado de México, sureste de Michoacán, sureste de Puebla, norte y sur de Guerrero. En Colima, suroeste de Jalisco y de Michoacán habita el *Centruroides limpidus tecomanus*; mientras que en el oeste de Jalisco, áreas costeras de Nayarit, Guerrero y Oaxaca se ubica el *Centruroides elegans*. El *Centruroides infamatus infamatus* se distribuye en el suroeste de Guanajuato, noreste de Jalisco, sur de Aguascalientes, centro y norte de Michoacán y, finalmente, *Centruroides sculpturatus* y *Centruroides pallidiceps* se encuentran en la parte central de Sonora.

Como veremos, el problema médico es causado por proteínas de bajo peso molecular del veneno de ciertos alacranes. De las 134 variedades de especies mexicanas(3), menos de una decena causan problemas de salud en humanos (Figura #1). Los polipéptidos tóxicos, o toxinas como simplemente se les llaman, son moléculas especie específicas, esto es, todos los alacranes producen componentes tóxicos en sus glándulas pero sólo algunas causan un efecto notable en el hombre (4). La mayoría de esas toxinas afectan a invertebrados, artrópodos y sus larvas (crustáceos, chapulines, cucarachas, moscas, arañas, etc) con los que el alacrán generalmente se alimenta.

Figura # 1
Distribución geográfica de alacranes peligrosos de la República Mexicana



CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS Y ANTIGÉNICAS DE LOS AGENTES

En México, *Centruroides* es el único género de alacrán venenoso, pertenece a la familia *Buthidae* (5,6). Los estudios taxonómicos y biogeográficos más completos sobre los alacranes mexicanos fueron realizados en la década de los años treinta, principalmente por el grupo de Hoffmann (3,5,7,8). Destaca también en ese período la aportación de Ruíz Castañeda (9) en la creación y elaboración del antisuero polivalente contra el envenenamiento por picadura de alacrán. Igualmente las contribuciones realizadas por Díaz Nájera (10,11), Mazzoti y Bravo-Becherelle y Del Pozo y col (12-18) han sido muy importantes para abordar este grave problema de salud. Si bien el agente causal de la enfermedad es ampliamente conocido (alacrán), todavía hay mucho que hacer en términos de investigación básica para caracterizar las toxinas del veneno y determinar las propiedades antigénicas específicas, que a su vez permitirían el desarrollo de una vacuna.

En nuestro laboratorio hemos podido obtener el veneno de las especies de alacranes peligrosos de México y empezamos la tarea del aislamiento y de la caracterización química y funcional de los péptidos tóxicos (4). El primer trabajo realizado, en colaboración con personal del Instituto Nacional de Higiene, fue una vacuna experimental animal (19). Se preparó un extracto soluble de glándulas maceradas de alacranes, siguiendo los protocolos del Instituto para elaborar los inóculos con los que produce el suero antialacránico en caballos. Este extracto fue separado por cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-50, produciendo cuatro subfracciones, de las cuales la fracción II es la que contiene el(los) principio(s) tóxico(s). Esta fracción se destoxificó por polimerización con glutaraldehído 26 mM. Su efecto fue probado en ratones y se usó para inmunizar a conejos. Los estudios posteriores conducidos en ratones con los sueros hiperinmunes de conejos, indicaron que era posible utilizar esta vacuna experimental para proteger a estos animales en contra del veneno de alacranes (19).

No obstante, dos problemas importantes surgieron en este estudio: por un lado se demostró que el extracto de glándulas venenosas contiene una gran cantidad de proteínas y otros componentes (fracciones I, III y IV de Sephadex G-50) que distraen la respuesta inmune, y por otro se encontró que para la producción de una vacuna humana eficiente, se requerirían cantidades muy grandes de telsons de alacranes, los cuales son casi imposibles de conseguir. Se calculó que solamente para el año de 1981 se deberían producir cerca de 11 millones de

dosis de vacuna para proteger toda la población en riesgo (niños menores de 10 años de edad que habitan en los 11 estados de la República más afectados por el alacranismo), (Lopez-Acuña D, comunicación personal). Otra necesidad del proyecto requería verificar si el veneno puro, extraído por estimulación eléctrica de telsons de ejemplares vivos, pudiera constituir un mejor inmunógeno para la obtención de la vacuna. Finalmente, el uso de fracciones puras o de toxinas altamente homogéneas probablemente sentaría las bases para el diseño de una vacuna sintética, que se podría obtener en grandes cantidades y con mejor control de calidad. Algunos de los resultados obtenidos en este sentido se discutirán en los incisos finales de este capítulo. Desde entonces nos hemos dedicado a la tarea de aislar y caracterizar las toxinas del veneno de alacranes mexicanos (4,19-31). Se aislaron más de 25 toxinas hasta su homogeneidad y para la mayoría determinamos su estructura primaria. También se estudió su efecto molecular de acción como bloqueadores de canales iónicos de tejidos excitables (32-34).

Hemos descrito la existencia de tres familias distintas de péptidos tóxicos: 1) cadenas polipeptídicas cortas, específicos para canales de potasio; 2) cadenas medianas, específicas para canales de sodio, y 3) cadenas largas, tóxicas para insectos y crustáceos.

La estrategia de investigación fue propuesta para responder preguntas como estas: ¿Cuántas proteínas tóxicas diferentes existen en el veneno de los alacranes peligrosos de México?; ¿Cuáles son los epítopos relevantes para la respuesta inmune protectora?; ¿Los sitios activos de los polipéptidos son diferentes de los epítopos protectores?; ¿Podemos sintetizar fragmentos de las secuencias de la toxinas que funcionen como posible vacuna?; ¿Podemos utilizar técnicas de la biología molecular para clonar y modificar los genes que codifican para las toxinas, a fin de obtener una mejor vacuna experimental?.

Las respuestas a estas preguntas sin duda ayudarán a la caracterización biológica y antigénica del agente causal del alacranismo en México.

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS Y CLINICOS

A fin de ilustrar el alcance del problema del alacranismo, mencionamos algunos datos epidemiológicos. Varios reportes anteriores relatan datos del alacranismo en la República Mexicana (2,3,5,7,8,12-14,35). En este capítulo incluiremos algunos datos no publicados que compilamos para ejemplificar la actualidad y la magnitud del problema.

Estos datos no incluyen todos los casos ocurridos en los tres Estados mencionados, ya que gran parte de los afectados no recurren a la asistencia médica. Sólo se muestran cifras de pacientes envenenados.

En los cuadros # 1 y 2 se resumen los casos acontecidos en los últimos años en Guanajuato, Nayarit y Morelos. En primer plano están los datos de la ciudad de León, Guanajuato (Cuadro # 1), según los registros de la Cruz Roja Mexicana y del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

En el cuadro # 2 siguen los pacientes registrados en Nayarit y Morelos, por parte de la Secretaría de Salud; para Nayarit en el año de 1988 se incluyen también los que fueron atendidos por el IMSS.

La tasa promedio anual de morbilidad en el período 1981-1986 de la ciudad de León fue de 90.4 x 10,000 habitantes. La mayoría de los accidentes sucedieron en menores de 30 años de edad (35), siendo los niños el grupo más afectado.

Cuadro # 1
Casos de envenenamiento en León, Guanajuato, 1981-1986

Años	1981	1982	1983	1984	1985	1986	TOTAL
Cruz Roja	5,733	6,678	6,170	6,681	6,158	6,648	36,068
IMSS	916	1,366	1,172	1,274	1,140	1,341	7,182
Total	6,649	8,044	7,342	7,928	7,289	7,989	42,250
Defunciones	0	1	1	5	1	1	9

FUENTES: Archivos de la Cruz Roja Mexicana, León, Gto. y Departamento de Codificación, IMSS, León, Gto.

Cuadro # 2
Pacientes picados por alacrán en los estados de Nayarit y Morelos, 1983-1988

AÑO	CASOS		DEFUNCIONES
	Estado de Nayarit	Estado de Morelos	
1983	1,759	-	16
1984	1,068	1,564	21
1985	1,063	2,641	7
1986	1,206	3,042	6
1987	1,510	3,775	1
1988	1,109 1,814*	3,661	6
TOTAL	7,770	16,442	57

FUENTES: Informe Semanal de Enfermedades Transmisibles y No Transmisibles, Secretaría de Salud, Tepic, Nay.
Dirección de Control de Enfermedades Transmisibles por Vector y Zoonosis, Secretaría de Salud, Cuernavaca, Mor.
*Incluye datos de la Jefatura Delegacional de Servicios Médicos, Delegación Regional IMSS, Nayarit

El alacrán pica cuando es agredido, es decir se trata de un mecanismo de defensa. Los accidentes ocurren cuando se camina descalzo y se le pisa o al levantar piedras sin fijarse primero que es lo que hay debajo. Varias especies de alacranes peligrosos cohabitan con los humanos. La mayoría de los accidentes suceden en la casa y es frecuente que los alacranes caigan del techo sobre las personas que están dormidas y al moverse durante el sueño aplastan al animal y así es como son picadas. En las zonas endémicas, es recomendable revisar constantemente aquellos lugares que tengan agujeros, buscar debajo de los muebles y no olvidar sacudir los zapatos y la ropa antes de usarlos.

En primavera y verano, los alacranes tienen su periodo de reproducción y es la época donde suelen alimentarse más, por ello en este tiempo es más fácil su encuentro con el ser humano. Durante el periodo de lluvias, los alacranes suben árboles, cercas de potreros o invaden las habitaciones para protegerse del agua. Por esto, en algunas regiones la época de lluvias coincide con el mayor número de accidentes.

En los meses de otoño e invierno el alacrán se abriga en grietas y huecos de la tierra y esto explica su menor aparición. Se han correlacionado ciertos factores arquitectónicos con la proliferación de los alacranes. Entre ellos están los techos o paredes de vara, paja, palma o cartón, paredes con tabique sin aplanado. Mazzoti (13) observó que los alacranes no pueden trepar superficies lisas, al contrario de las cucarachas. Las medidas para proteger las casas son: cubrir de azulejo o lámina las partes bajas de la casa; aplicar pintura de aceite en postes de acceso. Al introducir objetos que han permanecido largo tiempo afuera, revisarlos antes; tener patios y solares limpios que circunden la casa. Los techos de las casas se deben proteger con malla o telas de gasa, para que los alacranes que caminan por el techo, si caen, no sea sobre las personas. Las cunas de los niños hay que cubrir las con tela de gasa y las patas de las camas con material liso. Las camas no deben de estar pegadas a las paredes.

Propiamente estos artrópodos no tienen enemigos naturales. Mazzoti (13) probó que los alacranes han desarrollado cierta resistencia a los insecticidas que se pueden usar en las habitaciones humanas. Esta experiencia es valiosa y debe de tomarse en cuenta para futuras acciones.

Factores de riesgo

De Hoffmann (8), tomamos los siguientes factores a considerar en la picadura por alacrán, los cuales hemos modificado con el fin de establecer que el grado de envenenamiento dependerá de los factores atribuibles tanto al alacrán como al huésped.

De esta distinción de factores podremos orientar la atención del paciente envenenado (36).

Son *factores de riesgo por parte del artrópodo*:

- 1). El grado de poder tóxico del veneno, que es distinto en las diferentes especies.
- 2). La cantidad efectiva de toxina inyectada en uno o en varios piquetes y que depende de:
 - a) volumen de la glándula y
 - b) estado fisiológico de la misma al momento de la picadura.

Los *factores de riesgo para el huésped* son:

- 1). Baja talla y peso de la víctima.
- 2). Condiciones de salud al momento de la picadura.
- 3). Tiempo que transcurre entre el accidente y la aparición de síntomas generales.
- 4). Tiempo que transcurre entre el accidente y el inicio de la atención médica.
- 5). Sitio corporal de la picadura; de este último factor queda la duda sobre si el sitio de la picadura influye en la gravedad del caso.

Cuadro clínico y clasificación

En México, el cuadro clínico es similar para todas las especies, sin embargo la gravedad del envenenamiento dependerá de los factores de riesgo antes mencionados. El veneno puede iniciar sus efectos en breves minutos o hasta un lapso de 2 horas. Si después de este tiempo no hay sintomatología, lo más probable es que el alacrán no inyectó veneno o pertenece a una especie no peligrosa para el hombre.

Hemos propuesto una clasificación clínica (35) que divide la sintomatología en manifestaciones locales y generales y que es útil con fines de tratamiento y pronóstico de acuerdo a los factores mencionados.

I: Manifestaciones locales:

- 1). Dolor local.
- 2). Enrojecimiento.
- 3). Inflamación.
- 4). Hormigueo.
- 5). Prurito.
- 6). Adormecimiento regional.

II: Manifestaciones generales (no necesariamente se presentan en el orden señalado):

- 1). Inquietud, convulsiones tónico-clónicas, ataxia, fiebre, somnolencia, diaforesis, coma.
- 2). Lagrimeo, nistagmus.
- 3). Estornudos, cosquilleo nasal (más frecuente en niños menores de 2 años), rinorrea.
- 4). Sialorrea, disfagia (es frecuente que la disfagia se refiera como una sensación de cabellos atorados en la garganta), estridor laríngeo, disfonía, tos.

- 5). Hipersecreción bronquial, estertores roncantes.
- 6). Disnea, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, choque.
- 7). Taquicardia, bradicardia.
- 8). Hipertensión o hipotensión arterial.
- 9). Náusea, vómito, distensión abdominal.

Complicaciones

Se han descrito complicaciones clínicas que están o pueden estar asociadas al envenenamiento por picadura de alacrán. Primordialmente se deben verificar los efectos clínicos directos debido al veneno, pero eventualmente pueden ocurrir problemas debido al tratamiento aplicado. Entre los que se presentan en un lapso de horas están la insuficiencia respiratoria y la insuficiencia cardíaca. En los niños, la primera predomina sobre otras manifestaciones; cursa con disnea, inquietud, taquipnea, tiros intercostales y diafragmáticos y aumento en las secreciones bronquiales. No hemos observado cianosis, pero tampoco se han determinado gases arteriales en estas condiciones. La terapéutica en estos casos consiste en 1) tratamiento específico neutralizando la acción del veneno con suero inmune antialacrán; 2) cuidados de apoyo respiratorio dirigidos a conservar un intercambio adecuado de gases y 3) medidas generales de atención.

La insuficiencia cardíaca es de predominio izquierdo donde el síntoma cardinal es la disnea. La hipertensión es una de las causas de insuficiencia cardíaca congestiva y pudiera haber miocarditis, la cual es una de las causas más comunes de edema pulmonar. Se desconoce si la alteración primaria es en corazón o en los pulmones. El tratamiento de estas complicaciones corresponde al segundo y tercer nivel de atención, por lo cual no se comenta en este capítulo.

El dolor local o regional en la zona del piquete está dado por la acción del veneno sobre las terminales nerviosas; ocasionan neuritis y parestesias que desaparecen entre una a dos semanas. En general no son incapacitantes y las vitaminas del complejo B ayudan a acortar el tiempo;

VACUNAS DISPONIBLES

Como mencionamos en la introducción de este capítulo, hasta este momento no existe una vacuna disponible para humanos. Los casos de accidentes pueden y/o deben ser tratados con suero antialacránico, dependiendo de la severidad del caso y de acuerdo a los criterios que se describen en el inciso siguiente.

SUERO ANTIALACRAN

En México se encuentran disponibles dos sueros heterólogos inmunes contra el veneno de alacrán.

El Suero Antialacrán® (SA) es producido en México por la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud. Es elaborado en caballos que se inmunizan con extractos solubles de glándulas maceradas de *C. limpidus limpidus*, *C. noxius* y *C. suffusus suffusus*. Debido a la homología entre los componentes de los venenos de las especies de *Centruroides*, el antisuero generado con antígenos de las tres mencionadas protege accidentes ocasionado por cualquiera de las especies de alacranes peligrosas de México. El suero de caballo inmune es sometido a un proceso de fraccionamiento y las inmunoglobulinas se digieren enzimáticamente, con lo cual se logra disminuir la posibilidad de reacciones alérgicas. Esta forma de inmunidad pasiva es el único tratamiento específico que existe para neutralizar el efecto del veneno.

También en México, los Laboratorios Dr. Zapata S.A. preparan un suero llamado Antialacrán-DL® comúnmente usado para los casos de accidentes con estos arácnidos.

Indicaciones y esquemas de aplicación

La aplicación del suero antialacránico va a depender de los factores de riesgo ya mencionados pero en principio, todo paciente debe mantenerse bajo vigilancia médica.

El tratamiento médico puede dividirse en dos:

1) En pacientes que tienen manifestaciones locales (ver clasificación) se deben administrar analgésicos-antipiréticos del tipo del ácido acético salicílico o dipirona, antihistamínicos, como la clorfeniramina o difenhidramina, antiinflamatorios y realizar profilaxis contra el tétanos.

2) Para los pacientes que sufren manifestaciones generales (ver clasificación) además de lo anterior, hay que instaurar el esquema de tratamiento a base de Suero Antialacrán (SA), o Antialacrán-DL, tal como se describirá a continuación.

El suero debe aplicarse lo más rápidamente posible en presencia de envenenamiento. La vía a utilizar preferencialmente es la endovenosa. La razón de ello es la rapidez con la que actúa el medicamento neutralizando el veneno. También se puede utilizar la vía intramuscular, pero la absorción del suero es lenta y puede dar lugar a que el veneno actúe. Es aconsejable la aplicación simultánea de un antihistamínico. Los sueros antialacránicos disponibles en el mercado están liofilizados y se deben reconstituir con 5 mL de agua inyectable.

La dosis que se administra es variable y dependerá de la gravedad del envenenamiento. Se inicia con la aplicación de un frasco ampula. Si al cabo de 60 minutos no hay una disminución de la sintomatología, se aplica otra ampula intravenosa. En general, son suficientes dos ampulas, pero pudiera haber casos en que se requiera más antisuero. Se debe de vigilar y hacer el seguimiento del estado hidroelectrolítico, respiratorio, hemodinámico y neurológico (35,37-39). Recuerde, *el suero antialacrán debe usarse en presencia de datos de envenenamiento*. Hay datos recientes obtenidos por nuestro grupo en el laboratorio con animales experimentales, que sugieren que está contraindicado aplicar una sobredosis de suero.

Para el piquete de alacrán se han utilizado otros medicamentos como atropina, neostigmina y esteroides, sin embargo no se ha probado su valor y pudiera incluso ser riesgoso su empleo. No obstante, la atropina puede llegar a usarse en el tratamiento de posibles complicaciones que acompañan el cuadro clínico del envenenamiento.

La limitante más clara del uso del suero antialacránico es la posibilidad de reacciones secundarias, debido a que el suero es de equinos. Las reacciones adversas se han logrado casi abolir si el suero es mezclado con un antihistamínico del tipo de la clorfeniramina (2,35).

Reacciones alérgicas

Los trastornos alérgicos o por hipersensibilidad se presentan en forma de reacciones sistémicas generalizadas. El antisuero puede llegar a ocasionar un cuadro de esta naturaleza que se manifiesta por: aprensión, parestesias, urticaria generalizada, sibilancias, tos, incontinencia, choque, fiebre, dilatación pupilar, pérdida del conocimiento y convulsiones. Es un cuadro muy grave que puede conducir a la muerte del paciente en el transcurso de 5 minutos.

El tratamiento del choque consiste en administrar adrenalina subcutánea en dosis de 0.5 mL a 1 mL de solución 1:1000, que se repite en 5 a 10 minutos y posteriormente según se requiera. La hidrocortisona (100 a 250 mg) inyectada intravenosamente después de la adrenalina puede evitar reacciones prolongadas. Durante este proceso, es esencial mantener las vías aéreas permeables y administrar soluciones intravenosas para tratar la hipotensión.

Si comparamos la sintomatología de las reacciones alérgicas al antisuero con la del envenenamiento se observa cierta similitud. No deben de confundirse y atribuirse al antisuero lo que son manifestaciones de envenenamiento.

Enfermedad del suero

La "enfermedad del suero" es una reacción alérgica sistémica que puede ocurrir en el transcurso de una a dos semanas después de la administración de cualquier suero extraño o medicamento. Esta enfermedad se debe principalmente a complejos antígeno-anticuerpo circulantes inducidos por el agente agresor.

Se caracteriza por fiebre, malestar general, urticaria, linfadenopatía, artralgias o artritis, náuseas, vómito y dolor abdominal. Rara vez hay neuropatía. La glomerulonefritis con proteinuria y la disminución de la función renal pueden aparecer al final de la segunda semana. El ácido acetil salicílico reduce el dolor articular. Los antihistamínicos alivian la urticaria. En algunos pacientes hay que utilizar corticosteroides del tipo de la prednisona.

IMPACTO EPIDEMIOLOGICO DEL USO DEL SUERO ANTIALACRAN

No resta la menor duda que el suero inmune antialacrán ha sido un importante recurso terapéutico, sobre todo en los casos clínicos que justifican su uso. En México, la experiencia de nuestro grupo en el uso del suero de caballo antialacrán, es altamente satisfactorio de acuerdo a los criterios descritos anteriormente (35). Los pacientes debidamente tratados se recuperan en lapsos de 30 minutos a algunas horas.

Con relación a las posibles complicaciones clínicas por uso del suero, en un estudio en el cual se aplicaron 20,000 dosis de SA intravenoso mezclado con un antihistamínico (clorfeniramina), no se observó un solo caso de fenómeno alérgico. De esta forma, podemos afirmar que es injustificada la inseguridad de algunos médicos en aplicar el suero en los casos de sintomatología que lo ameriten. Cabe notar, sin embargo, que los pacientes a los cuales se aplicó el suero no fueron seguidos posteriormente en cuanto al posible desarrollo de la enfermedad del suero.

Por otro lado no queda la menor duda que el índice de mortalidad en la República Mexicana sería mucho más elevado si no existiera el suero antialacránico. También es probable que los casos de muerte registrados (Cuadros # 1 y 2) son por falta o por aplicación tardía del suero, en casos que justificaban aplicación inmediata.

En países Latinoamericanos como el Brasil, se prepara y se aplica exitosamente el suero equino antiveneno de alacrán (40,41). De misma forma, en países del norte de Africa, se utiliza el suero antialacránico contra la picadura de especies endémicas peligrosas (42,43).

VACUNAS EN DESARROLLO

Como mencionamos anteriormente, el veneno de los alacranes peligrosos para el hombre contiene familias de péptidos tóxicos. De éstas, la familia de péptidos que bloquean canales de sodio de membranas excitables es la más importante desde el punto de vista de su concentración en el veneno, y por su potencia (LD₅₀ en ratones). Estas toxinas están constituidas por 60 a 70 aminoácidos, altamente empaquetados y estabilizados por 4 puentes de disulfuro. La estructura de estos péptidos es estable y después de someterlos a ebullición por 5 minutos, continúan siendo tóxicos. Un ejemplo es la toxina II-9.2.2 del veneno del alacrán de Nayarit (*C. noxius*), cuya concentración relativa en el veneno es del orden de 6 % del total y cuya LD₅₀ en ratones es 0.5 µg por 20 gramos de peso corporal (25,44).

La otra familia de péptidos tóxicos para humanos está constituida por polipéptidos cortos, con 39 residuos de aminoácidos, estabilizados por 3 puentes de disulfuro, cuya función está relacionada con el bloqueo de canales de potasio (26,32). El ejemplo estudiado es la noxiustoxina, del mismo alacrán de Nayarit. Su importancia médica es menor que la II-9.2.2, por dos razones: primero la concentración en la cual aparece en el veneno es del orden de solamente 0.3 a 0.4 % y la LD₅₀ en ratones es mayor, esto es, se necesita más péptido para matar la mitad de la población de ratones -del orden de 30 µg por 20 gramos de peso corporal- (45). Estos datos bioquímicos indican que es más importante obtener una vacuna en contra de las toxinas que actúan sobre canales de sodio que las de potasio. En nuestro laboratorio para continuar con el trabajo del diseño de una vacuna sintética anti-veneno de alacrán, tomamos como modelo la toxina II-9.2.2 y la noxiustoxina (NTX).

Un requisito indispensable para aspirar a la preparación de una vacuna específica es definir el(los) componente(s) mínimo(s) necesario(s) que induzca(n) una respuesta inmune protectora. En este sentido la primera pregunta a responder fue si un componente único y homogéneo representante de las toxinas de canales de sodio y responsable de la letalidad del veneno, como por ejemplo la toxina II-9.2.2, es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes para el veneno total y cómo se compara esta capacidad con el macerado de telson (antígeno utilizado para la preparación de los sueros equinos antialacránicos). También incluimos en este estudio el veneno soluble obtenido por estimulación eléctrica de alacranes vivos y la fracción II de la columna de Sephadex G-50, que contiene todos los componentes tóxicos para mamíferos.

Para estos experimentos se inmunizaron lotes de ratas Wistar hembras con los diferentes antígenos. Como conocemos la concentración relativa de la II-9.2.2 en cada estadio de la purificación (inclusive para el veneno total), para la inmunización de los animales se tomaron cantidades equivalentes de toxina II-9.2.2 de muestras de veneno de glándulas maceradas, de veneno soluble, de fracción II y de la propia toxina II-9.2.2 homogénea. Se realizaron tres inoculaciones con cada antígeno (cantidades equivalentes de II-9.2.2) con intervalos de 15 días en lotes distintos de ratas. Se sangró la mitad de las ratas de cada lote 9 días después de la tercera inmunización. El suero obtenido se utilizó para ensayos de protección pasiva por desafío en terceros ratones no inmunes. Los animales no sangrados se usaron para ensayos de desafío directo. En todas las condiciones el desafío se llevó a cabo con una LD₅₀ de veneno total de *C. noxius*.

Los resultados se muestran en la figura # 2, en donde se observa que la toxina II-9.2.2 induce una respuesta protectora adecuada contra el reto con veneno total de *C. noxius*. Se logró una sobrevivencia del 100 % en el desafío directo de los animales inmunizados con las mezclas antigénicas (macerado, veneno soluble y fracción II del Sephadex G-50). En los ensayos de desafío a terceros fue completa la capacidad neutralizante de todos los antisueros. Los mejores títulos fueron obtenidos con el anti-veneno total y la anti toxina II-9.2.2. Este resultado nos pareció razonable, ya que si no es la única toxina, resulta que es la más abundante y tiene gran homología estructural con el resto de las toxinas de sodio, tanto del mismo veneno como de las presentes en venenos de otros alacranes mexicanos (Figuras # 3 y 4). La toxicidad remanente, esto es, la que no es neutralizada, pudiera deberse a la acción de otras toxinas como las del tipo para canales de potasio, cuya estructura es muy distinta a las de sodio. Con la NTX se tuvieron resultados semejantes (46).

Las siguientes preguntas a resolver fueron si los péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia parcial de toxinas para canales de sodio y potasio, generan anticuerpos que reconocen a la toxina nativa y que si los anticuerpos monoclonales para una toxina nativa interfieren con su actividad funcional. Para responder estas preguntas se obtuvieron por el método de síntesis química en fase sólida de Merrifield (47), una serie de fragmentos peptídicos (Cuadro # 3) correspondientes a las dos toxinas modelos (II-9.2.2 y NTX). En la figura # 4 se muestran las similitudes de secuencia entre las diferentes toxinas de alacranes que bloquean canales de sodio, así como la secuencia de un péptido sintético "largo" que se denominó péptido quimérico β.

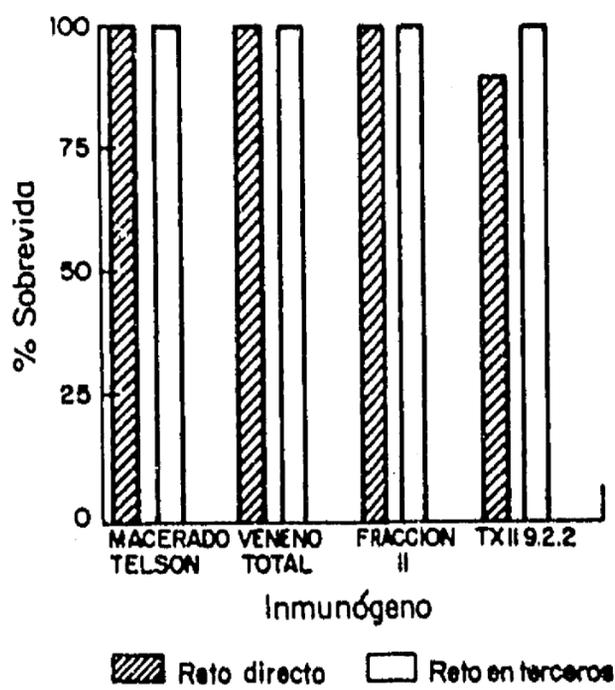


Figura #2

Neutralización in vivo e in vitro de veneno total de *C. noxius* con anticuerpos inducidos por antígenos con diferentes grados de complejidad. El desafío directo se realizó en lotes de ratas inmunizadas con concentraciones equivalentes de toxina II-9.2.2 en: macerado de telson, veneno total, fracción II y toxina II-9.2.2. Se inyectó intraperitonealmente con una LD50 de veneno total de *C. noxius* (0.16 µg/g). El desafío en terceros se llevó a cabo inyectando intraperitonealmente ratones CD1 con una LD50 de veneno de *C. noxius* (para esta cepa = 0.26 µg/g), preincubado con volúmenes crecientes de suero anti-macerado de telson, veneno total, fracción II o II-9.2.2. Las barras de reto en terceros corresponden a la máxima neutralización alcanzada. Los resultados se reportan como porcentaje de supervivencia a las 24 horas posteriores al reto.

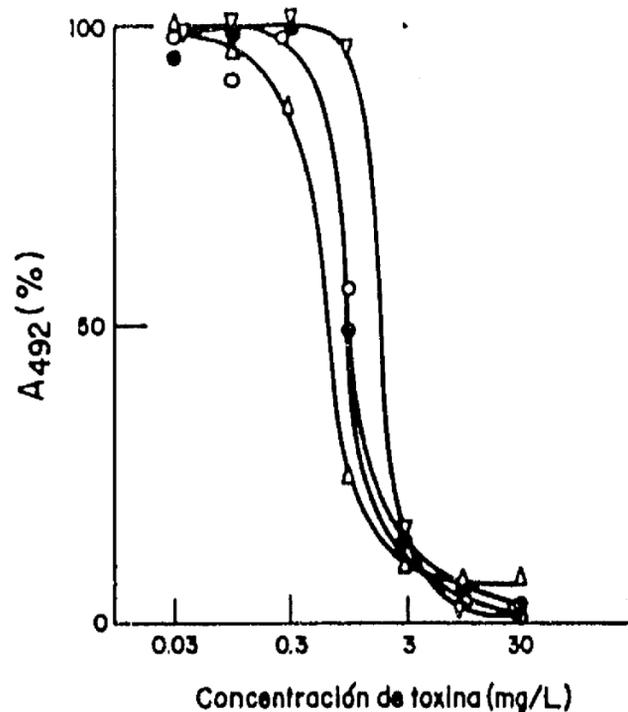


Figura #3

Reacción cruzada de otras toxinas con anticuerpo monoclonal BCF8. La unión del anticuerpo monoclonal BCF8 (1.5 mg/L) a la toxina II-9.2.2 se probó en la presencia de diluciones seriadas de toxina II-9.2.2 (círculo abierto), II-10 de *C. noxius* (círculo lleno), II-14 (triángulo abierto) de *C. noxius*, toxina I de *C. l. tecomarus* (triángulo invertido). Los anticuerpos unidos se revelaron usando anticuerpos de conejo anti-ratón conjugados a peroxidasa. La relación entre la absorbancia a 492 nm en presencia de competidor y la absorbancia en su ausencia se graficó contra la concentración de toxina. Los resultados son el promedio de triplicados.

Rx	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Ts gama	KEGYLMDH	EGCKLSCFIR	PSGYCGREGG	IK K	GSSGYCAW	P	ACYCYGLPNWVKVDRAPNKC								
Ts III-8	KEGYAMDH	EGCKFSCFIR	PAGFCG	YCKTHLK	ASSGYCAW	P	ACYCYGVPDHIKVDYATNKC								
Ts IV-5	KDGYPVEYDN	CAYICWNY	DNAYCDK	LCKDK	K	ADSGYGYWV	H	ILCYCYGLPDSEP(TGST)	KC						
CsII	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN	NDYCLRECKQY	GKSSGGYCYA	F	ACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN										
CsEv3	KEGYLVKKS	DGCKYGGCLKLG	ENEGCDTECKAKN	QGGSYGYCYA	F	ACWCEGLPESTPTYPLPNKSC									
CsEI	KDGYLVEK	TGCKKTCYKLG	ENDFCNRECKWKH	I	GGSYGYCYG	F	GCYCEGLPDSTQWPLPNKCT								
Clt1	KEGYLVNHSTGCKYECLKLGDN	NDYCLRECRQY	GKGGYCYA	F	GCWCTHLYEQAVVWPLPNKTC										
CnII-14	KDTYLVDA	KGCKKNCYKLG	NDYCNRECRMK	H	RGGSYGYCYG	F	GCYCEGLSDSTPTWPLTNKTC								
CnII-9.2.2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDN	NDYCLRECKQY	GKGGYCYAF		ACWCTHLYEQAVVWPLPNKRCS										
P. BETA QUIMÉRICO COMUN	KEGYLMKSDGC	C	GRGEG		NDYCLRECKQY	GKGGYCYA	AG	P	AGCYC	KLGDG	VAG	TK	C		
	Y	C	C		C	C			C	loop B	C	C			C

Figura #4

Comparación de la estructura primaria de varias toxinas por el método de análisis métrico. Se compararon las siguientes secuencias que corresponden a toxinas de canales de sodio tipo beta: toxinas gamma, III-8 y IV-5 de *Tityus serrulatus* (Ts) (27,28); toxina II de *Centruroides s. suffusus* (Cs) (53); toxina V-3 y I de *C. sculpturatus* Ewing (CsE) (54, 48); toxina I de *C. limpidus tecomarus* (Clt) (55) y toxinas II-14 (27) y II-9.2.2 (44) de *C. noxius* (Cn). La secuencia del péptido quimérico β se anota en la parte inferior de la figura. Este fue diseñado de acuerdo al alineamiento de la secuencia de las toxinas. En la parte superior se muestran los resultados de difracción de rayos X (48, 49) marcándose las secuencias formadoras de alfa hélice y hoja beta plegada. En la parte inferior de las secuencias también se indican los aminoácidos comunes y la región de la asa (loop) presente en las toxinas.

El diseño del péptido numérico β se basó en la homología de la secuencia de diferentes toxinas tipo β , respetándose las secuencias comunes y las regiones estructuradas como tiras β plegadas, α hélice y estructura al azar de la toxina nativa. Esta información se conocía por los estudios de difracción de rayos-X de una toxina semejante a la II-9.2.2 (48,49). En las regiones de alta similitud de secuencia se introdujeron sustituciones conservativas de aminoácidos y en las de mayor heterogeneidad se hicieron cambios no conservativos y/o sustituciones con glicina (Figura # 4).

De la misma forma se prepararon varios anticuerpos monoclonales distintos, de los cuales algunos son específicos para la toxina II-9.2.2 y otros para la NTX (44). De esta última se sintetizaron una serie de péptidos correspondientes a su estructura primaria (45). El nonapéptido N-terminal y el péptido sintético 1 a 20 mostraron tener un efecto biológico semejante a la toxina nativa, por lo tanto, son todo o parte del sitio activo de esta toxina. Asimismo, la región carboxilo-terminal es inmunogénica pero no presenta toxicidad (50).

En los experimentos de neutralización con la toxina II-9.2.2 empleando seis anticuerpos monoclonales, se encontró que uno de ellos era neutralizante (44). Este resultado ha permitido proyectar una estrategia que consiste en determinar cual es el epítopo que es reconocido por el anticuerpo monoclonal neutralizante. Esta parte del proyecto está actualmente en proceso. También, en este momento se conducen experimentos de cultivo de células *in vitro* con linfocitos y macrófagos a fin de verificar si en la respuesta inmunológica respectiva, las toxinas son procesadas y si lo son, cuáles son los péptidos finalmente involucrados en la generación de anticuerpos neutralizantes. Cuando se obtenga esta información será utilizada para la síntesis de nuevos péptidos que a su vez servirán para experimentos de protección inmunológica.

Los resultados de los estudios recientes sobre la posible relevancia funcional de diferentes péptidos de longitudes muy variadas (Cuadro # 3), sugieren que el extremo amino terminal de la toxina está en alguna forma involucrado en la actividad funcional de la neurotoxina (45,51).

Cuadro # 4
Secuencia de aminoácidos de péptidos sintéticos

NTX 1-39	1	5	10	15	20
	Tre-Ile-Ile-Asn-Val-Lis-Cis-Tre-Ser-Pro-Lis-Gln-Cis-Ser-Lis-Pro-Cis-Lis-Glu-Leu-				
		25	30	35	39
	Tir-Gli-Ser-Ser-Ala-Gli-Ala-Lis-Cis-Met-Asn-Gli-Lis-Cis-Lis-Cis-Tir-Asn-Asn				
NTX 1-9	1	5	9		
	Tre-Ile-Ile-Asn-Val-Lis-Cis-Tre-Ser				
NTX 1-20	1	5	10	15	20
	Tre-Ile-Ile-Asn-Val-Lis-Cis-Tre-Ser-Pro-Lis-Gln-Cis-Ser-Lis-Pro-Cis-Lis-Glu-Leu				
NTX 30-39	30	35	39		
	Met-Asn-Gli-Lis-Cis-Lis-Cis-Tir-Asn-Asn				
II.9.2.2 (1-14)	1	5	10	14	
	Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val-Asp-Lis-Asn-Tre-Gli-Cis-Lis-Tir				
II.9.2.2 (1-27)	1	5	10	15	20
	Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val-Asp-Lis-Asn-Tre-Gli-Cis-Lis-Tir-Glu-Cis-Leu-Lis-Leu-Gli-				
			25	27	
	Asp-Asn-Asp-Tir-Cis-Leu-Arg				

Ambas toxinas, NTX (noxiustoxina) y la II.9.2.2 provienen de *Centruroides noxius*

Para probar los péptidos correspondientes al extremo amino de la toxina II-9.2.2, éstos fueron acoplados a una proteína acarreadora (tioglobulina) y utilizados para inmunizar a grupos de ratones de la cepa CD1. Después de la cuarta inmunización, los ratones fueron sangrados y los sueros fueron ensayados por ELISA para determinar el título de anticuerpos antipéptido en el suero. Posteriormente los sueros fueron evaluados por la misma técnica de ELISA contra la toxina nativa para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos antipéptido hacia la toxina. Como podemos ver en la figura # 5, los sueros antipéptido 1-14 y 1-27 contienen anticuerpos que reconocen a la toxina nativa.

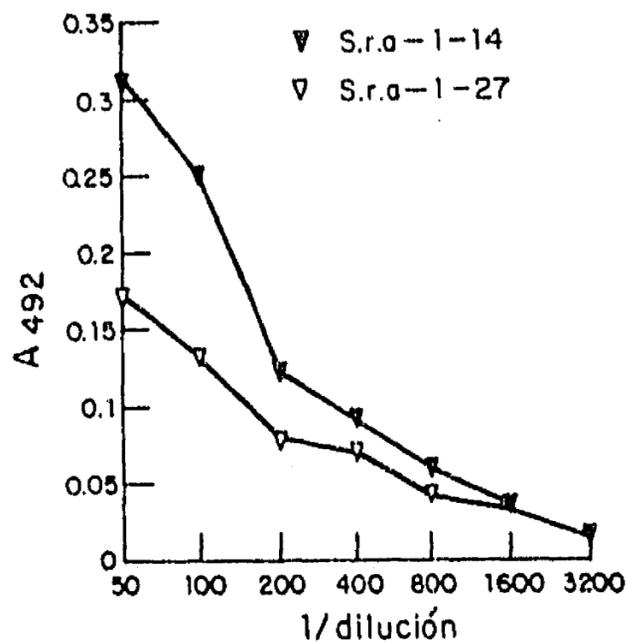


Figura # 5

Titulación en ELISA de los sueros anti-péptido 1-14, 1-27 contra la toxina nativa II-9.2.2. Se cubrieron placas de polivinil con 3 µg/ml de toxina nativa II-9.2.2. Se probaron diluciones seriadas de los sueros anti péptidos y los valores graficados corresponden a lecturas directas a 492 nm, a las cuales se les ha restado el valor obtenido en los controles negativos (suero normal).

Tratando de inducir más eficientemente anticuerpos capaces tanto de reconocer como de neutralizar la toxina nativa, se utilizó el péptido quimérico β (Figura # 4) que adicionalmente evaluamos en su capacidad inductora en ausencia de proteína acarreadora. Un requisito indispensable para esperar una buena inducción de anticuerpos neutralizantes del efecto de la toxina, fue que este péptido presentara actividad biológica de bloqueador tipo β sobre canales de sodio sensibles a voltaje. Esto fue probado electrofisiológicamente en un sistema de voltaje sostenido en células de neuroblastoma N18 en donde se observó bloqueo

de la corriente de sodio semejante al obtenido en presencia de la toxina II-9.2.2 (GE Kirsch, Baylor College of Medicine, comunicación personal). Sin embargo el efecto observado con el péptido quimérico β fue con una concentración mil veces mayor que con toxina nativa. Esto significa que es un buen candidato para ser utilizado como antígeno.

Los experimentos de inducción de anticuerpos se realizaron en ratones Balb/c hembras de 8 semanas de edad y en conejos albinos Nueva Zelanda de 1.5 kg, inoculando 50 µg de péptido quimérico (previamente purificado en Sephadex G-50), emulsificado en adyuvante de Freund para los ratones y adsorbido sobre membranas de nitrocelulosa (52) para el caso de conejos. Como control de la inducción de anticuerpos neutralizantes se inmunizaron animales con la toxina nativa II-9.2.2 adsorbida a membrana de nitrocelulosa; en los ratones Balb/c se usaron 2.5 µg y 7 µg en los conejos Nueva Zelanda. Para ambos antígenos se realizaron tres inmunizaciones con intervalos de 15 días con aplicaciones subcutáneas. Tanto los sueros de ratón como de conejo se obtuvieron a los 9 días posteriores a la segunda y tercera inmunización y fueron utilizados para titular la reactividad tanto hacia el péptido quimérico como hacia la toxina nativa.

En la figura # 6 se presentan las curvas de titulación para los sueros de ratón contra la toxina nativa II-9.2.2. Se obtuvieron resultados similares con el suero de conejo. Las titulaciones se realizaron en ELISA, adsorbiendo a las placas de polivinilo 0.15 g de toxina por pozo. Es notable la alta reactividad del suero antitoxina nativa; la reactividad del suero anti-péptido quimérico también es evidente y notablemente mayor que la obtenida con los sueros antipéptidos de cadena corta.

La siguiente pregunta que quisimos responder fue si los anticuerpos inducidos con los diferentes péptidos sintéticos y con reactividad cruzada hacia la neurotoxina nativa, son capaces *in vivo* de neutralizar el efecto de la toxina. Para contestar esta interrogante y comparar la posible capacidad neutralizante de los anticuerpos antipéptidos sintéticos con los inducidos por la toxina, se realizaron dos series de experimentos: a) desafío directo o neutralización *in vivo* y b) desafío en terceros o neutralización *in vitro*.

El desafío directo consistió en la inoculación de una DL₅₀ de la toxina nativa en los animales inmunizados previamente con los péptidos sintéticos o con la toxina. La capacidad neutralizante se valoró como porcentaje de supervivencia tomándose la lectura hasta las 24 horas posteriores a la inoculación de la toxina.

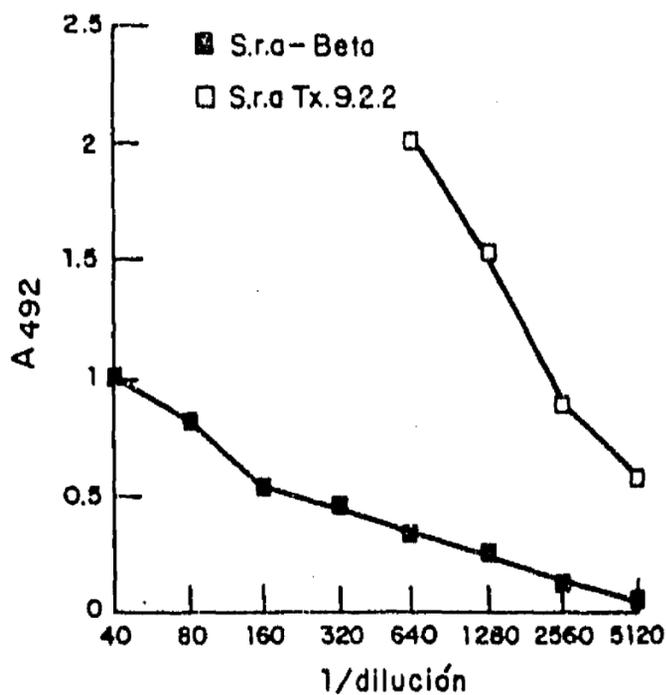


Figura # 6

Titulación en ELISA de la reactividad de los sueros de ratones inmunizados con el péptido quimérico β y toxina II.9.2.2. Se cubrieron placas de polivinil con 0.15 μ g/pozo de toxina II.9.2.2. Los sueros fueron obtenidos 9 días posteriores a la tercera inmunización de lotes de 12 ratones Balb/c inmunizados con: a) 50 μ g/ratón de péptido quimérico beta emulsificado en adyuvante de Freund y b) 2.5 μ g/ratón de toxina II.9.2.2 adsorbida a membranas de nitrocelulosa. La gráfica presenta el promedio de ensayos por triplicado, en donde se han restado los valores de los sueros preinmunes.

Para evaluar la capacidad neutralizante de los sueros antipéptidos con respecto a la protección obtenida con la toxina nativa, se realizaron ensayos de desafío en terceros o neutralización *in vitro* que consistió en mezclar una DL_{50} de toxina con volúmenes crecientes del suero, incubar por una hora a temperatura ambiente en agitación e inocular la mezcla en animales no inmunizados. Nuevamente, la capacidad neutralizante se valoró como la sobrevida a las 24 horas posteriores a la inyección. En la figura # 7 se presentan los resultados del reto directo y en terceros, utilizando los sueros antipéptidos sintéticos 1-14, 1-27, quimérico β y antitoxina nativa. Para los desafíos directos, la sobrevida máxima (100%) fue en los inmunizados con la toxina nativa; en el lote inmunizado con el péptido sintético 1-14 se obtuvo 75% de sobrevida y en el caso del péptido 1-27 no hubo diferencia con respecto al control. Sorprendentemente, al reto directo los animales inmunizados con el péptido quimérico presentaron una hiperreactividad al efecto de la toxina no observándose sobrevida.

No obstante, en los ensayos de desafío en terceros se obtuvo hasta 80% de protección con los anticuerpos anti-péptidos, incluyendo los inducidos por el péptido quimérico y el péptido 1-27, resultando este último el de mayor capacidad neutralizante. Nuevamente la máxima protección se obtuvo con los sueros anti-toxina nativa.

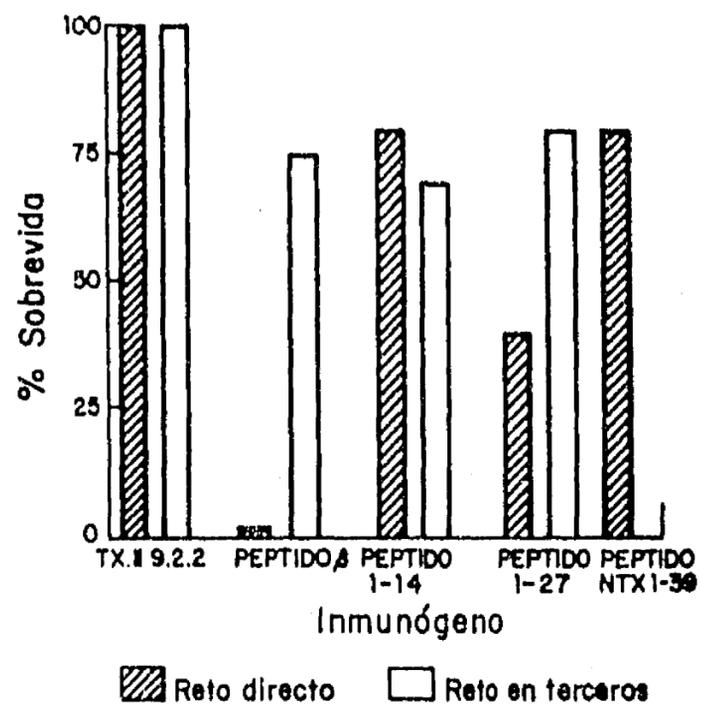


Figura # 7

Neutralización *in vivo* e *in vitro* de la toxina II.9.2.2 con anticuerpos inducidos por péptidos sintéticos análogos a toxinas de *C. noxius*. Los ensayos de neutralización *in vivo* se realizaron en los lotes de animales inmunizados con los péptidos sintéticos de la toxina II.9.2.2 (1-14, 1-27 y péptido quimérico beta) el péptido 1-39, análogo sintético de la toxina NTX. El desafío se llevó a cabo por inyección intraperitoneal de una DL_{50} de toxina II.9.2.2 para el caso de los primeros y una DL_{100} de NTX en el análogo de la toxina de potasio. La neutralización *in vitro* se realizó en ratones CD1 no inmunes, por inoculación de una DL_{50} de la toxina II.9.2.2 preincubada con diferentes volúmenes de los sueros inmunes inducidos tanto por los péptidos sintéticos de la toxina de canal de sodio como por la toxina nativa. Las barras muestran la máxima protección obtenida. Para el análogo sintético de NTX no se realizó desafío en terceros. Los resultados se reportan como porcentaje de sobrevida a las 24 horas posteriores al desafío.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Hasta este momento hemos realizado una cantidad razonable de estudios con los que se han obtenido datos bioquímicos importantes con relación al veneno de alacranes mexicanos y a sus péptidos tóxicos.

También hemos generado una vacuna experimental animal usando varios tipos de antígenos, tal vez el más importante fue el obtenido con la toxina II-9.2.2 nativa. También verificamos que segmentos sintéticos de la región N-terminal de la II-9.2.2 pueden proteger ligeramente a ratones pre-inmunizados al retarse con la toxina nativa. El péptido sintético total correspondiente a la NTX también parece proteger a ratones inmunizados. No obstante, existen varios problemas: los péptidos sintéticos capaces de generar anticuerpos que reconocen a la toxina nativa no necesariamente inducen anticuerpos neutralizantes. Existen algunos epítomos que generan anticuerpos que son útiles para neutralizar la toxina en ensayos de inmunidad pasiva (desafío en terceros), pero que exacerban la respuesta a la toxina en los animales con inmunidad activa (desafío directo).

En nuestra opinión la obtención de una vacuna anti-veneno de alacrán puede llegar a ser una realidad, sin embargo aún tenemos un largo camino para recorrer. Es imperioso determinar en las toxinas nativas cuales son los epítomos inductores de anticuerpos neutralizantes, para poder sintetizarlos en el laboratorio y verificar su eficacia. Es necesario comprobar si persisten los efectos de hiperreactividad generada con ciertos péptidos que hemos sintetizado y ensayado. Una pregunta todavía más relevante es la confirmación de que los epítomos determinados en murinos coinciden con los reconocidos en humanos.

Tal vez en el futuro tendrá que efectuarse la obtención de anticuerpos humanos *in vitro* por cultivo de células y la verificación experimental de su eficiencia en animales de laboratorio. Quizas la clonación de los genes que codifican para las toxinas y las técnicas de ingeniería genética ayudarán a confirmar datos alcanzados con la síntesis química de los péptidos. Posiblemente los antígenos generados por DNA recombinante sean mejores inmunógenos para la protección en humanos.

Mientras logramos obtener estas respuestas que puedan validar el sueño de una vacuna anti-alacránica, la terapia para los cuadros clínicos severos por envenenamiento tendrá que continuar siendo el suero equino anti-alacrán.

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen la asistencia técnica del Sr. Fredy Coronas, del M. en C. Fernando Zamudio y de la QFB Sandra Contreras. La ayuda de la M.V.Z. Elizabeth Mata y del Sr. Sergio González Trujillo en el mantenimiento de los animales del bioterio fue importante para la realización de este estudio. El autor principal (LDP) cuenta con el apoyo económico de la Fundación Howard Hughes Medical Institute (No. 75191-527104).

REFERENCIAS

1. MONROY-VELAZCO J. Alacranes venenosos de México. *Rev. Mex. Cienc. Med. Biol.* 1961, 1: 1
2. DEHESA-DÁVILA M. Epidemiological characteristics of scorpionsting in Leon, Guanajuato, Mexico. *Toxicon* 1989, 27: 281-286
3. HOFFMANN CC, VARGAS L. Contribuciones al conocimiento de los venenos de los alacranes mexicanos. *Bol. Inst. Higiene Méx.* SSA1935, 2: 182
4. POSSANI LD. Structure of scorpion toxins. In: *Handbook of natural toxins*, Vol. 2, Tu AT (ed). New York: Marcel Dekker, 1984. pp 513-550
5. HOFFMANN CC. Monografías para la entomología médica de México. Monografía número 2: Los escorpiones de México, 2a. parte. *An. Inst. Biol.* 1932, 3: 243-361
6. BALOZET L. Scorpionism in the old world, In: *Venomous animals and their venoms*, Vol. III, Bucherl W, Buckley EE (ed). New York: Academic Press, 1971. pp 349-371
7. HOFFMANN CC. La distribución geográfica de los alacranes peligrosos en la República Mexicana. *Bol. Inst. Higiene (Méx.)* 1936, 2: 321
8. HOFFMANN CC, NIETO DR. Segunda contribución al conocimiento de los venenos de los alacranes mexicanos. *An. Inst. Biol.* 1939, 10: 83-92
9. RUÍZ CASTAÑEDA M. Preparación del suero anti-alacrán y su titulación. *Bol. Inst. Hig. (Méx.)* 1933, 6: 208
10. DÍAZ NÁJERA A. Alacranes de la República Mexicana. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1964, 24: 15-30
11. DÍAZ NÁJERA A. Listas y datos de distribución geográfica de los alacranes de México. *Rev. Inv. Salud Públ. (Méx.)* 1975, 35: 1-36
12. MAZZOTI L, BRAVO-BECHERELLE MA. Scorpionism in the Mexican Republic. In: *Venomous and poisonous animals and noxious plants of the Pacific area*: Keegan, MF (ed). London: Pergamon Press, 1963. pp 119-131
13. MAZZOTI L. Protección mecánica de las casas contra la entrada de alacranes (Escorpiones). *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1962, 22: 183
14. MAZZOTI L, MARTÍNEZ PALACIOSA, RAMÍREZ J. Ensayo experimental sobre la acción del diédrin en alacranes de la especie *Centruroides limpidus*. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1962, 22: 179-182
15. DEL POZO EC, ANGUIANO GL, GONZÁLEZ JQ. Acciones del veneno de alacrán sobre el sistema vasomotor. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1944, 5: 227-239
16. DEL POZO EC, GONZÁLEZ JQ. Acciones del veneno de alacrán sobre el aparato respiratorio. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1945, 6: 77-84
17. DEL POZO EC, ANGUIANO LG. Acciones del veneno de alacrán sobre la actividad motora del músculo estriado. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1947, 8: 231
18. DEL POZO EC, DERBEZ JM. Relaciones entre la actividad anticolinérgica, propiedades de activación muscular y la toxicidad de los venenos de diversos alacranes de México. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1949, 10: 203
19. POSSANI LD, FERNÁNDEZ DE CASTRO J, JULIA JZ. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides*, Hoffmann) venom. *Toxicon* 1981, 19: 323-329
20. POSSANI LD, RAMÍREZ GA, FLETCHER PL JR, GURROLA MAH. Isolation of two mammalian from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides elegans* (Thorell). *FEBS Letters* 1978, 91: 261-264

21. POSSANI LD, FLETCHER PL JR, ALAGÓN AC, JULIA JZ. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus lecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 1980, 18: 175-183
22. DENT MAR, POSSANI LD, RAMÍREZ GA, FLETCHER PL JR. Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 1980, 18: 343-350
23. POSSANI LD, STEINMETZ WE, DENT MAR, ALAGÓN AC, WÜTHRICH K. Preliminary spectroscopy characterization of six toxins from Latin American scorpions. *Biochem. Biophys. Acta* 1981, 669: 183-192
24. POSSANI LD, MARTIN BM, MOCHCA-MORALES J, SVENDSEN I. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Calsberg Res. Commun.* 1981, 46: 195-205
25. POSSANI LD, DENT MAR, MARTIN BM, MAELICKE A, SVENDSEN, I. The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Calsberg Res. Commun.* 1981, 46: 207-214
26. POSSANI LD, MARTIN B, SVENDSEN I. The primary structure of Noxiustoxin: a K channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Calsberg Res. Commun.* 1982, 47: 285-289
27. POSSANI LD, MARTIN B, SVENDSEN I, RODE GS, ERICKSON BW. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structure and sequence comparison by metric analysis. *Biochem. J.* (London). 1985, 229: 739-750
28. POSSANI LD, MARTIN B, FLETCHER MD, FLETCHER PL JR. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 3178-3185
29. CARBONE E, WANKE EE, PRESTIPINO G, POSSANI LD, MAILICKE A. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channel by a novel scorpion toxin. *Nature* (London) 1982, 296: 90-91
30. CARABEZ-TREJO A, POSSANI LD. Electromicroscopic evidence for scorpion toxin binding to synapsis of rat brain cortex. *Neuroscience Letter* 1982, 32: 103-108
31. ALAGÓN AC, GUZMÁN HS, MARTIN BM, RAMÍREZ AN, CARBONE E, POSSANI LD. Isolation and characterization of two toxins from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988, 89B: 153-162
32. CARBONE E, PRESTIPINO G, SPADAVECCHIA L, FRANCIOLINI F, POSSANI LD. Blocking of the squid axon K⁺ channel by noxiustoxin: a toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. *Pfluegers Arch. (Eur. J. Physiol.)* 1987, 408: 423-431
33. SITGES M, POSSANI LD, BAYÓN A. Characterization of the action of toxins II.9 and II.10 from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* on transmitter release from mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 1987, 48: 1745-1752
34. YATANIA A, KIRSH GE, POSSANI LD, BROWN AM. Effects of two new world scorpion toxins on single channel and whole cell cardiac sodium channels. *Amer. J. Physiol.* 254, (Heart Circ. Physiol. 1988, 23: H443-H451)
35. DEHESA-DÁVILA M. Estado actual del manejo farmacológico por picadura de alacrán. *Salud Públ. Méx.* 1986, 28: 83-91
36. ALAGÓN AC, DEHESA-DÁVILA M, POSSANI LD. *Monography of scorpions from the genus Centruroides*. Ginebra: World Health Organization, 1990
37. LAGUNAS-FLORES A, ROJAS-MOLINAN. Picadura de alacrán. Experiencia clínica con 147 niños en Acapulco, Guerrero. *Rev. Med. IMSS* 1938, 21: 270
38. VELASCO-CASTREJON O, LARA-AGUILERA R, ALATORRE H. Aspectos epidemiológicos y clínicos de la picadura de alacrán en un área hiperendémica. *Rev. Inv. Salud Públ. (Méx.)* 1976, 36: 93-103
39. VELASCO-CASTREJÓN O. *Alacranismo en México*. México, DF: Dirección General de Epidemiología, SSA, Documento técnico No. 3, dic. 1979
40. VITAL BRASIL O. *Contribuição ao estudo do envenenamento pela picada do escorpião e seu tratamento*. Sao Paulo: Coletanea de trabalhos do Instituto Butantan, 1909. pp 69-81
41. BÜCHERL W. Classification, biology, and venom extraction of scorpions. In: *Venomous animals and their venoms*, Vol. III, Bucherl W, Buckley EE (ed). New York: Academic Press, 1971. pp 317-347
42. HASSAN F. Production of scorpion antivenin. In: *Handbook of natural toxins*, Vol. 2, Tu AT (ed). New York: Marcel Dekker Inc, 1984. pp 577-605
43. EL AYE M, DELORI P. Immunology and immunochemistry of scorpion neurotoxins. In: *Handbook of natural toxins*, Vol. 2, Tu AT (ed). New York: Marcel Dekker Inc, 1984. pp 607-638
44. ZAMUDIO F. Obtención, caracterización y uso de anticuerpos monoclonales para el estudio de estructura y función de toxinas de alacranes. México DF: Facultad de Química, UNAM, Tesis de Maestría, 1989
45. GURROLA GB, MOLINAR-RODE R, SITGES M, BAYON A, POSSANI LD. Synthetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this K channel blocker is located on its amino-terminal portion. *J. Neural. Transm.* 1989, 77: 11-20
46. GURROLA, G. B. Síntesis química de péptidos correspondientes a secuencias de aminoácidos de toxinas de alacrán y sus propiedades. México DF: Facultad de Química, UNAM, Tesis de Maestría, 1986
47. MERRIFIELD RB. Solid phase peptide synthesis IV. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Amer. Chem. Soc.* 1963, 83: 2144
48. FONTECILLA-CAMPS JC, ALMASSY RJ, SUDDATH FL, WATT DD, BUGG CE. Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77: 6496-6500
49. FONTECILLA-CAMPS, J.C., ALMASSY, R.J., SUDDATH, F.L. BUGG, C.E. The three-dimensional structure of scorpion neurotoxins. *Toxicon.* 1982, 20: 1-7
50. POSSANI LD, GURROLA GB, BAYÓN AC, SITGES M. *Synthesis of synthetic noxiustoxin and related peptides*. United States of America: Department of Commerce, Patent and Trademark Office. Patent No. 4,929,718, May 29th 1990
51. OLAMENDI T. Síntesis química y caracterización inmunológica de péptidos correspondientes a la secuencia de la toxina II-9.2.2 del alacrán *Centruroides noxius*. México DF: Unidad de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH, UNAM, Tesis de Maestría, 1991
52. FRENCH D, FISCHBERG E, BUHL S, SCHARFF MD. The production of more useful monoclonal antibodies. *Immunol. Today* 1986, 7: 344-346
53. GARCÍA GP. France: Université de Nice, Ph.D Thesis, 1976

54. BABIN DR, WATT DD, GOOS SM, MLEJNEK RV. Amino acid sequences of neurotoxic protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch. Biochem. Biophys.* 1974, 164: 694-706
55. MARTIN BM, CARBONE E, YATANI A, BROWN AM, RAMÍREZ AN, GEORGINA GB, POSSANI LD. Amino acid sequence and physiological characterization of toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 1988, 26: 785-794