

1

2 23
93

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

37

"INMUNIDAD CONTRA EL VENENO DE Centruroides limpidus limpidus
(ALACRAN DE GUERRERO) INDUCIDA POR PROTEINAS DEL MISMO VENENO".

XCA

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA
PATRICIA MARGARITA TATO ZALDIVAR
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

México, 1979

10939



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAGINA
1.- INTRODUCCION	1
2.- MATERIALES Y METODOS	6
3.- RESULTADOS	14
4.- DISCUSION	30
5.- CONCLUSIONES	34
6.- BIBLIOGRAFIA	35

ABREVIATURAS

DL₅₀ = Dosis Letal al 50%

SDS = Dodecil sulfato de sodio

nm = nanómetros

mA = miliamperios

sc. = vía subcutánea

ip. = vía intraperitoneal

CM-celulosa = Carboximetil-celulosa

rpm = revoluciones por minuto

INTRODUCCION

El bajo nivel socioeconómico de la población rural y la amplia distribución de las especies venenosas de escorpiones en grandes áreas geográficas de la República Mexicana, producen un grave problema en Salud Pública, "El Escorpionismo". Mazzotti y Bravo-Becherelle (1961) reportaron que, durante los lapsos de 1940 a 1949 y de 1957 a 1958, el número de defunciones por picadura de alacrán resultó superior a 1,000 por año, la mortalidad predominó durante el verano y el 75% de las defunciones ocurrieron en niños menores de 3 años. Respecto a la distribución geográfica de la mortalidad, estos autores hicieron un análisis de los mismos periodos por entidad, resultando que los estados con mayor problema fueron: Colima, Nayarit, Guerrero y Morelos; teniendo tasas medias anuales de 83.7, 41.6, 41.5 y 37.3 defunciones por cada 100,000 habitantes respectivamente.

No en todas las zonas geográficas existe el problema con igual intensidad, por lo que Bravo-Becherelle y Mazzotti (1961) clasificaron el escorpionismo con base en la tasa media anual por cada 100,000 habitantes durante los lapsos de 1948 a 1949 y de 1957 a 1958 de la siguiente manera:

- Escorpionismo muy intenso: en 31 municipios con tasas de 100 a 400.
- Escorpionismo intenso: en 75 municipios con tasas de 50 a 99.
- Escorpionismo mediano: en 215 municipios con tasas de 10 a 49.
- Escorpionismo reducido: en 1512 municipios con tasas menores de 10.

En ese mismo trabajo, se reportó que existen 2 zonas donde es muy grave el problema del escorpionismo. La primera abarca casi todo el estado de Colima y las costas vecinas de Jalisco y Michoacán; los municipios con tasas de mortalidad más elevada en esta zona fueron: Cabo Corrientes, Jal. (156.3), Tomatlán, Jal. (162.3), La Huerta, Jal. (128.5), Cihuatlán, Jal. (134.3), Cuautitlán, Jal. (162.3), Manzanillo, Col. (111.2), Tecomán, Col. (162.2), y Coahuayana, Mich. (217.7). La segunda zona corresponde a la cuenca del Rfo Balsas (sureste del Edo. de Puebla, noreste del de Oaxaca, el Edo. de Morelos, suroeste del de México, la mitad norte del Edo. de Guerrero y el sur de Michoacán); donde están localizados 20 de los 31 municipios con escorpionismo muy intenso.

Más recientemente, Tato y cols. (1978) reportaron que en el municipio de Huitzucó, Gro. la picadura de alacrán es la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años.

La distribución geográfica de los alacranes venenosos en México es muy amplia, principalmente la del género Centruroides. Hoffman (1932) en sus trabajos señaló las localizaciones de las diferentes especies de este género, entre las más importantes por su toxicidad se encuentran: Centruroides noxius en Nayarit y en el sur de Sinaloa; C. suffusus suffusus en el Edo. de Durango; C. infamatus en Michoacán y parte de Zacatecas; C. sculpturatus en Sonora; C. limpidus tecomanus en Colima; y C. limpidus limpidus en Guerrero, Morelos y sur del Edo. de Puebla.

El problema del escorpionismo puede explicarse en parte por los asentamientos humanos en zonas donde ya existía el alacrán, aunado al nivel económico y cultural de estas poblaciones rurales, cuyas habitaciones están construidas de tal forma que permiten el fácil acceso a ellas y la permanencia de los alacranes allí; por otro lado, los hábitos nocturnos de estos arácnidos suscitan la mayoría de los accidentes en el hombre.

Una de las formas de contrarrestar el problema ha sido el uso del suero anti-alacránico. Cervera (1936) refiere que el descubrimiento de este suero fué realizado por Todd en 1909, al demostrar que el suero de animales inmunizados con la ponzoña de Buthus quinquestriatus la neutralizaba in vitro y protegía al cobayo contra sus efectos. Después, Brazil en 1918 (Cervera, 1936), en el Instituto de Butantan de Sao Paulo, preparó un suero específico contra el veneno de Tityus bahiensis, trabajo que sirvió de guía al De la Peña y Venzor en 1926 para obtener el primer suero contra el veneno del alacrán de Durango C. suffusus suffusus. Más tarde, Ruiz Castañeda (1933) continuó y mejoró estos estudios obteniendo un extracto de glándulas de alacranes en suero fisiológico y después precipitando el veneno con alcohol de 96°, secándolo a 37°C y deshidratándolo en presencia de ácido sulfúrico. Sin embargo, Hoffman y Vargas (1935) criticaron este procedimiento de obtención del veneno, pues en los experimentos que realizaron con el veneno del alacrán de Durango utilizando este método, encontraron la pérdida de aproximadamente el 40%

de su actividad tóxica. Aunque por mucho tiempo se empleó solamente el veneno del alacrán de Durango para preparar este suero, éste era más o menos eficaz en el tratamiento de picaduras en otros lugares de la República. Sin embargo, actualmente el suero antialacrán se prepara utilizando veneno de varias especies de Centruroides como: C. noxius, C. suffusus suffusus, C. infamatus y C. limpidus tecomanus.

Mazzotti y Bravo-Becherelle (1961) refirieron que la aplicación del suero antialacrán tuvo influencia en la disminución de la mortalidad en las entidades que estudiaron, haciendo hincapié en el peligro que representa para el futuro la sensibilización al suero de un número importante de personas. Vega y Lía (1966) también hacen notar, que en Durango a partir de 1932 la tasa de mortalidad tuvo un decremento considerable debido a la aplicación en forma sistemática del suero antialacrán, pero que no había sido posible reducir la mortalidad a cero.

Desde otro punto de vista, los venenos de escorpiones han sido estudiados en diferentes partes del mundo. Así por ejemplo, Miranda y cols. (1970) aislaron 11 diferentes neurotoxinas del veneno de los escorpiones africanos Androctonus australis. Hector, Buthus occitanus y Leiurus quinquestratus. Rochat y cols. (1970) hicieron secuencias de aminoácidos de dos de las neurotoxinas de Androctonus australis, y encontraron que son proteínas básicas de bajo peso molecular (7,000 daltones aproximadamente) compuestas de 57 a 66 aminoácidos. Babin y cols. (1974) purificaron tres neurotoxinas del veneno de

C. sculpturatus Ewing, encontrando que son cadenas polipeptídicas simples de 65 a 66 aminoácidos con 4 puentes disulfuro intracatenarios y que presentan un alto grado de homología en sus secuencias. Gómez y Diniz (1966) y Possani y cols. (1977) aislaron dos componentes tóxicos y cinco neurotoxinas respectivamente del veneno del escorpión brasileño Tityus serrulatus Lutz y Mello. Recientemente, Tato y cols. (1978) purificaron tres neurotoxinas del veneno de C. limpidus limpidus.

Con otro enfoque, Varela y Sánchez Posada (1938) trataron de detoxificar el veneno de C. limpidus limpidus, alacrán de Guerrero, para obtener un antígeno desprovisto de toxicidad pero útil para inducir la formación de anticuerpos. Los resultados fueron negativos ya que con formol y solución yodiodurada de Lugol lograron detoxificar el veneno pero perdía sus cualidades antigénicas.

Finalmente, Molinari y cols. (1979) encontraron anticuerpos en los sueros de personas que habían sido picadas por escorpiones, los cuales formaron bandas de precipitación con el veneno obtenido de C. limpidus limpidus en pruebas de inmunodifusión.

El propósito de esta investigación fué estudiar algunas de las características inmunológicas del veneno de C. limpidus limpidus e identificar las proteínas responsables de inducir inmunidad con el objeto de obtener una vacuna para uso humano. Se logró aislar una fracción formada por al menos 12 proteínas obtenida del veneno de C. limpidus limpidus la cual no es tóxica pero es capaz de inducir en ratones protección contra el desafío de 39.2 μg del mismo veneno, equivalentes a 2 DL₅₀ para ratones de 20 gr.

MATERIALES Y METODOS

Colecta de Alacranes.

Se colectaron alacranes en un lugar denominado "El Llano", formado por campos de cultivo, los cuales están localizados a 1 km al sur de Huitzoco, Gro., municipio en el que Centruroides limpidus limpidus es muy abundante. Se realizaron varias colectas durante los meses de junio de 1977 y 1978, se trajeron 4,000 especímenes por colecta al laboratorio, donde se clasificaron siguiendo las claves de Hoffman (1932). Se mantuvieron en número de 200 por recipiente y se les administró agua y larvas de Tenebrium molitor ad-libitum (cepa obsequiada por el Dr. Luis Castillo, Facultad de Medicina, U.N.A.M.).

Obtención del Veneno.

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica de acuerdo al siguiente método: cada alacrán se coloca sobre una placa de cobre cubierta con algodón humedecido con solución salina 0.15 M y conectada al polo negativo de una pila de 6 voltios; el manejo de cada espécimen se realiza con dos pinzas entomológicas, con una se mantiene fijo al alacrán sobre la placa de cobre y con la otra se sujeta el antepenúltimo segmento del metasoma. En estas condiciones, con el electrodo conectado al polo positivo de la pila se estimulan los dos últimos segmentos de cada alacrán como se observa en la Fig. 1. La estimulación eléctrica induce la contracción de los músculos de las glándulas de veneno con la consecuente salida de pequeñas gotas de veneno a través del aguijón, las cuales se reciben en una caja de Petri



Figura 1. Obtención de veneno de Centruroides limpidus limpidus por estimulación eléctrica.

que contiene solución salina 0.15 M congelada sobre hielo seco y en condiciones de esterilidad. El veneno obtenido así, se liofilizó y almacenó a -20°C hasta su uso.

Fraccionamiento del Veneno.

Todos los pasos del fraccionamiento se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C . En la primera fase, 150 mg peso seco de veneno crudo se resuspendieron en 8.0 ml de amortiguador de acetato de amonio 0.05 M pH 7.0. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 17,500 rpm durante 20 min en Sorvall modelo RC-2B refrigerada y el sobrenadante se aplicó a una columna de 1.6 x 100 cm de Sephadex G-50 M (Pharmacia, Suecia) previamente equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 0.05 M pH 7.0; la muestra se eluyó con el mismo amortiguador a un flujo de 70 ml/hr. El material se colectó en alícuotas de 3.2 ml y la salida de proteínas se estimó por absorbancia a 280 nm en un monitor ISCO modelo UA-5 (Instrumentation Specialities Company, Inc., Lincoln, Nebraska), conectado a un graficador automático. El material de cada pico se mezcló y liofilizó. A las fracciones así obtenidas, se les determinó su toxicidad en ratones. En la segunda fase, parte del material de la fracción más tóxica denominada pico II, se procesó como sigue: 1.0 gr, peso seco, resuspendido en 30 ml de amortiguador de acetato de amonio 0.05 M pH 7.0 se aplicó a una columna de 1.6 x 60 cm de Carboximetil-celulosa (Whatman, Inglaterra), previamente equilibrada con el amortiguador. La muestra se eluyó por pasos incrementando la concentración del amortiguador de 0.05 a 0.5 M, a un flujo

de 62.5 ml/hr, colectándose en alícuotas de 7.3 ml. El material de cada pico se mezcló y liofilizó.

Prueba de Toxicidad.

Con el objeto de conocer la toxicidad de cada fracción, se inocularon ratones de 20 ± 1 gr por vía subcutánea o intraperitoneal con veneno completo o sus fracciones obtenidas de Sephadex G-50 en concentraciones variables resuspendidas en 0.1 ml de solución salina isotónica. Para cada una de las dosis se emplearon 6 ratones. Los resultados se expresaron como μg de toxina/gr de peso de ratón y la determinación de la dosis letal al 50% se efectuó siguiendo el método de Reed y Muench (1938).

Electroforesis en Geles con SDS.

Los pesos moleculares de las proteínas contenidas en los picos I, II, III y IV, se estimaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS siguiendo el método de Weber y Osborn (1969). Los geles se prepararon con una solución de 22.2 gr de acrilamida y 0.6 gr de metilénbisacrilamida en 100 ml de agua bidestilada y con amortiguador del gel conteniendo 7.8 gr de fosfato monosódico, 38.6 gr de fosfato disódico $\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 2 gr de SDS por litro. Se usaron tubos de vidrio de 12 x 0.55 cm previamente lavados y desengrasados. Los geles se prepararon mezclando:

- 15.0 ml de amortiguador del gel
- 13.5 ml de solución de poliacrilamida
- 1.5 ml de persulfato de amonio (15 mg/ml)

0.045 ml de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)

A cada tubo se le aplicaron 2.5 ml de esta mezcla, se agregaron unas gotas de agua bidestilada para que no se formara menisco y se dejaron solidificar. Las muestras se aplicaron a los geles por duplicado a las siguientes concentraciones: veneno completo 55 μg , pico I 100 μg , pico II 65 μg , pico III 60 μg y pico IV 85 μg de proteína estimada por absorbancia a 280 nm, agregando 5 μl de azul de bromofenol al 0.05%. La electroforesis se realizó en un aparato BIO-RAD con amortiguador del gel disuelto 1:1 y aplicando una corriente de 8 mA/gel durante 8 hr a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron durante toda la noche con una solución de azul de Comassie al 0.25% en una mezcla de 454 ml de metanol al 50% y 46 ml de ácido acético glacial. Se destiñeron con una solución que contenía 75 ml de ácido acético glacial, 50 ml de metanol y 875 ml de agua. La movilidad de las proteínas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Movilidad} = \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{longitud del gel después de destiñirse}} \times \frac{\text{longitud del gel antes de teñirse}}{\text{distancia de la migración del colorante}}$$

Se usaron los siguientes estándares de Schwartz-Mann:

γ globulina (160,000), Albúmina Sérica Bovina (67,000), Apoferritina (48,000), Quimotripsina (23,500) y Citocromo c (12,400 daltones).

Preparación de Antisueños.

El veneno completo se resuspendió en solución salina 0.15 M estéril y se le añadió Melox (William H. Rorer, Inc.) como adyuvante

2:1; con este material se inocularon conejos adultos de la cepa Nueva Zelanda de 2.5 Kg \pm 200 gr, por vía intradérmica cada 7 días, con el siguiente esquema de inmunización: 25 μ g en la primera inoculación, 40 μ g en la segunda, 100 μ g en la tercera, 200 μ g en la cuarta, 400 μ g en la quinta y 800 μ g en la última. Para preparar el antisuero contra las proteínas de pico I se siguió el mismo procedimiento pero inoculando 175 μ g cada vez. Los conejos se sangraron 7 días después de la última inoculación por la vena marginal de la oreja; la sangre se mantuvo durante 3 hr a 4°C y el suero se separó por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min.

Inmunolectroforesis e Inmunodifusión.

La reacción antígeno-anticuerpo se estudió por inmunolectroforesis usando la técnica de Clausen (1971). Los geles se prepararon en portaobjetos de 25 x 75 mm, previamente lavados y desengrasados, se agregó agar purificado al 1% (Merck) en amortiguador de fosfatos de sodio 0.05 M pH 8.6. En la primera prueba se usaron 5 antígenos: veneno completo, picos I, II, III y IV a una concentración de 30 mg/ml cada uno; se depositaron 20 μ l de cada antígeno en el pozo correspondiente y la electroforesis se llevó a cabo en una cámara CAMAG, usando 2.5 mA por laminilla durante 2 hr, después se depositaron 200 μ l de suero anti-veneno completo en el canal. En la segunda, se siguió el mismo método pero las concentraciones de los antígenos fueron las siguientes: veneno completo 20 mg/ml, pico I 30 mg/ml y pico II 150 y 200 mg/ml; y se depositaron 200 μ l de suero anti-pico I.

Los sueros se dejaron difundir 48 hr en cámara húmeda a tem-

peratura ambiente, se lavaron a 4°C con solución salina 0.15 M durante 5 días con 2 cambios diarios, se colocó un papel filtro humedecido sobre el gel y se secaron en una estufa a 37°C. Los geles se tiñeron con una solución de amido negro al 0.1% en ácido acético al 10% durante 10 min, el exceso de colorante se eliminó lavando el gel con ácido acético al 10% y se dejaron secar. Las pruebas de inmunodifusión se realizaron siguiendo el método de Ouchterlony (Clausen, 1971). Los antígenos se depositaron en sus respectivos pozos a las siguientes concentraciones: veneno completo 200 µg, pico I 150 µg y pico II 100 µg/40 µl; 80 µl del suero anti-pico I se depositaron en el pozo central. Se dejó difundir 48 hr, el lavado y la tinción se realizaron en las mismas condiciones mencionadas para el método de inmunolectroforesis.

Detoxificación con Glutaraldehído.

La detoxificación de veneno completo o de sus fracciones se realizó siguiendo la metodología de Rappaport y cols. (1974), con algunas modificaciones. Veneno completo, proteínas de pico II o mezclas de las fracciones de pico II obtenidas a partir de CM-celulosa, se solubilizaron en amortiguador de acetato de amonio 0.05 M pH 7.8, a una concentración de 600 µg/ml. En estas condiciones se agregó gota a gota 25 µl de glutaraldehído al 25% (Sigma) disuelto en 1.0 ml del mismo amortiguador. Las mezclas se incubaron a 38°C con agitación lenta durante 2 hr. Las partículas formadas se separaron por centrifugación en Sorvall a 17,500 rpm durante 15 min. El precipitado se lavó 2 veces con solución salina isotónica para eliminar el exceso de glutaraldehído. Este mate-

rial se resuspendió en solución salina y se utilizó en las pruebas de inmunidad.

Inmunizaciones y Pruebas de Inmunidad.

Veneno detoxificado; proteínas del pico I (Sephadex G-50) resuspendidas y filtradas a través de milliporo 0.22 μm ; proteínas de pico II (Sephadex G-50) detoxificado; material de los picos I, 2 y 3, picos 2 y 3 y del 4 al 14 (CM-celulosa) mezclados en partes iguales y detoxificados; se inocularon en ratones por vía subcutánea a dosis de 50 μg incluidos o no en adyuvante (Melox 2:1) con uno o dos refuerzos. Las inoculaciones se hicieron semanalmente, 7 días después de la última, los ratones se desafiaron por vía subcutánea con 19.6 μg de veneno de Cen-
truroides limpidus limpidus, equivalente a 1 DL₅₀ para ratones de 20 gr, resuspendidos en 0.1 ml de solución salina; se registraron la signología y mortalidad. Para cada experimento se incluyeron controles inoculados con adyuvante. En todas las pruebas de inmunidad se usaron ratones de la cepa CD-1 con un peso de 28 ± 1 gr, los cuales se mantuvieron en jaulas de acrílico proveyéndoseles de agua y alimento ad-libitum.

Estimación de la concentración de proteínas.

Las proteínas del veneno y de sus fracciones se estimaron por absorción de luz ultravioleta de acuerdo al método de Warburg y Christian (1957).

RESULTADOS

Fraccionamiento del Veneno y Toxicidad.

Se obtuvieron 4 fracciones del fraccionamiento del veneno a través de Sephadex G-50, las que se denominaron picos I, II, III y IV (Fig. 2).

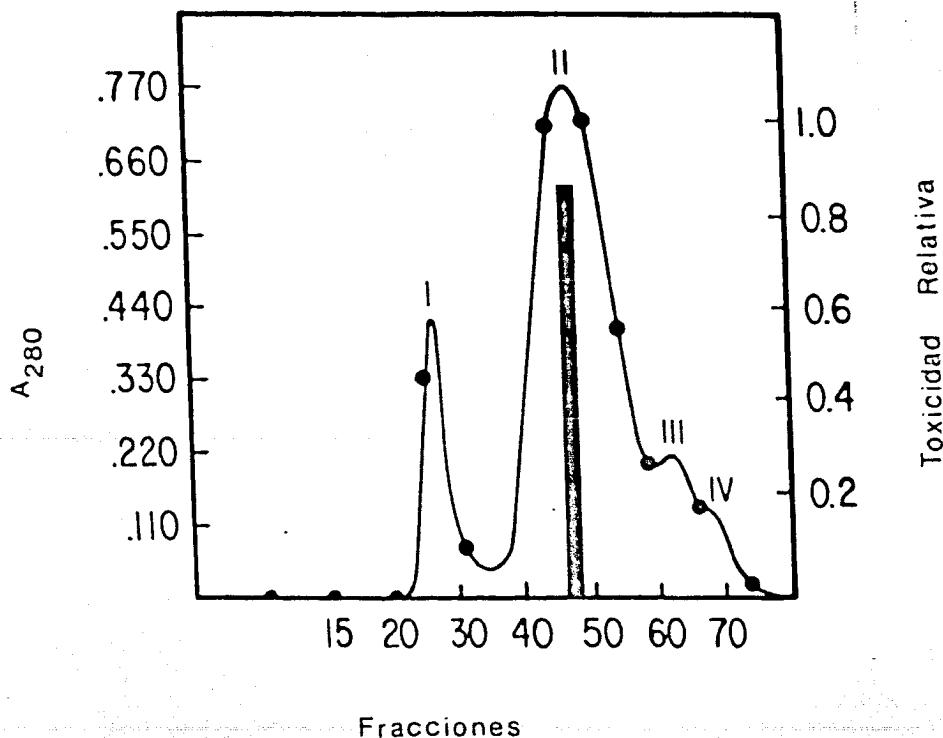


Figura 2. Fraccionamiento del veneno de C. limpidus limpidus en Sephadex G-50 M. La toxicidad de pico II se muestra por un histograma y se expresa como toxicidad relativa por compararla con la del veneno completo, que se define como 1.

Se determinó la toxicidad de todas estas fracciones, los resultados se presentan en la Tabla I. El pico II fué la fracción más tóxica, teniendo una DL_{50} de 0.85 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de peso de ratón. La fracción más pesada (pico I) y la más ligera (pico IV) no fueron tóxicas para el ratón aún a dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{ratón}$.

Tabla I. Toxicidad del veneno completo de C. limpidus limpidus y sus fracciones obtenidas de Sephadex G-50.

Fracción	s.c.	DL_{50} vía	i.p.
	$\mu\text{g}/\text{gr}$		$\mu\text{g}/\text{gr}$
Veneno completo	0.98		0.91
Fraccionamiento (G-50)			
Pico I	no tóxico*		no tóxico*
Pico II	0.85		0.81
Pico III	5.2		-
Pico IV	no tóxico*		no tóxico*

*Ningún animal presentó signos de envenenamiento.

En la segunda fase del fraccionamiento del material de pico II, se obtuvieron al menos 14 fracciones al ser cromatografiado en CM-celulosa (Fig. 3). Todas las fracciones resultaron ser tóxicas para el ratón.

Acetato de Amonio pH 7.0

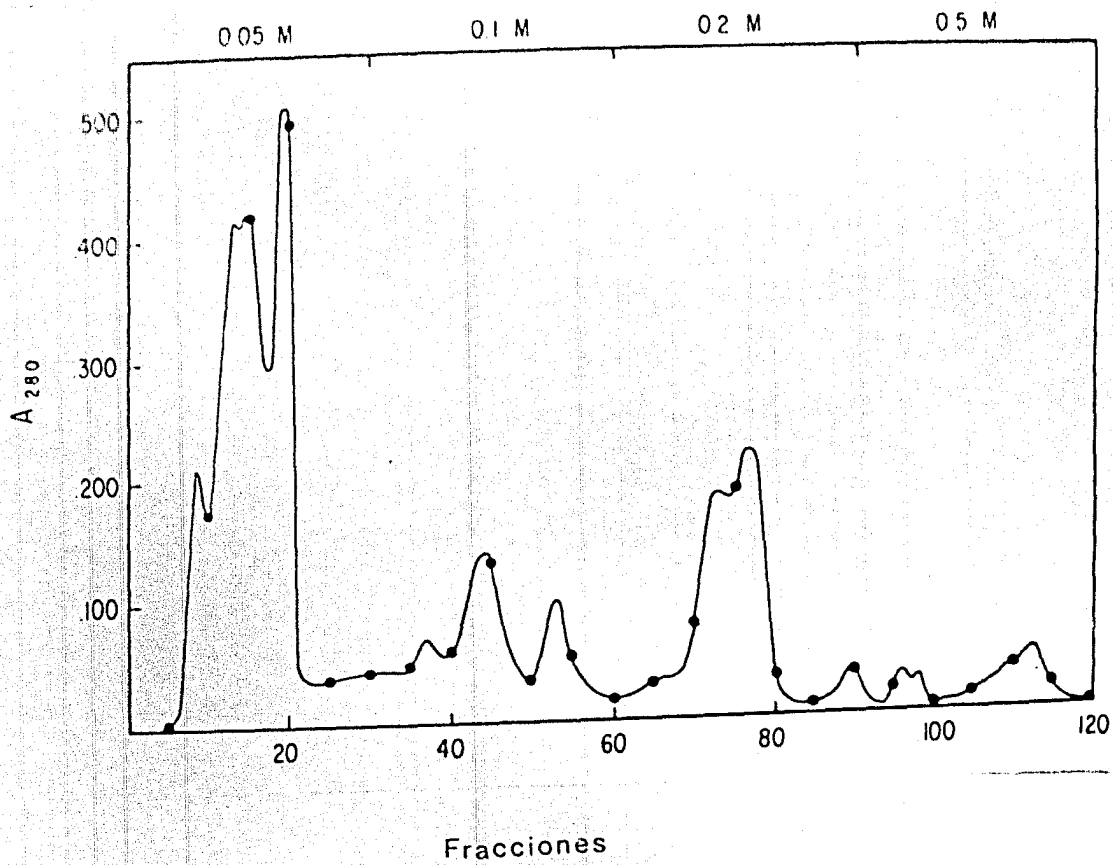


Figura 3. Fraccionamiento del material de pico II en CM-celulosa.

Estimación de Pesos Moleculares.

Por electroforesis se obtuvieron 12 bandas del material protéico de pico I mientras que las proteínas de los picos II, III y IV migraron como bandas únicas, estos resultados se pueden observar en la Fig. 4.

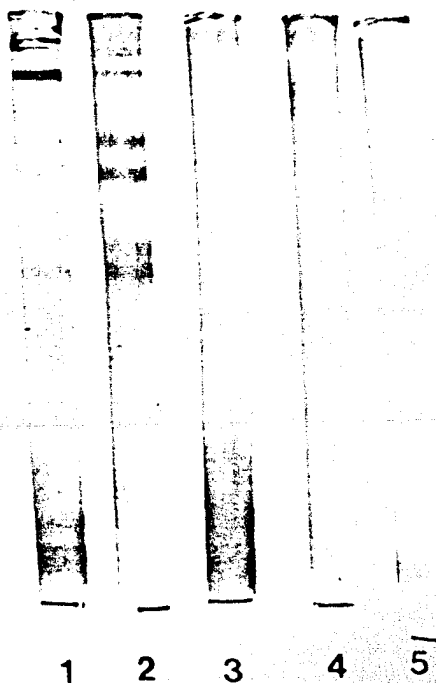


Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Gel 1, veneno completo; gel 2, pico I; gel 3, pico II; gel 4, pico III y gel 5, pico IV.

Los pesos moleculares de las 12 fracciones del pico I se estimó que fueron: 163,000, 155,000, 150,000, 147,000, 141,000, 128,000, 120,000, 88,000, 75,000, 49,000, 44,000 y 9,800 daltones. Mientras que, el peso molecular de las proteínas de los picos II, III y IV fueron: 9,300, 7,900, y 7,400 daltones respectivamente. Estos resultados fueron el promedio de cada muestra por duplicado.

Para eliminar la posibilidad de que la proteína más pequeña de pico I (9,800 daltones) pudiera ser un componente del pico II; el material de pico I se analizó en las siguientes condiciones: el veneno completo se cromatografió en Sephadex G-50 como se describe en materiales y métodos, las primeras 5 fracciones del pico I (de la 23 a la 27, Fig. 2) se mezclaron y liofilizaron. Las fracciones 28 y 29 se liofilizaron por separado. Estas fracciones se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, usando veneno completo como control. Los resultados demostraron que las fracciones 28 y 29 no contenían ninguna proteína con bajo peso molecular (9,800); sin embargo, en el material de pico I (de la 23 a la 27) se encontró una proteína con bajo peso molecular que migró menos distancia que las proteínas de los picos II, III y IV. Este resultado sugiere que la proteína más pequeña de pico I pudiera ser una subunidad de cualquiera de sus proteínas. Más aún, en otro experimento, 1 mg/ml de pico I se resuspendió en amortiguador de acetato de amonio 0.05 M

pH 7.0 y se dializó en una membrana de Spectrapor 4 (Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles) que excluye proteínas por debajo de 14,000 daltones, contra el mismo amortiguador durante 48 hr a 5°C. El propósito de este experimento fué eliminar probables proteínas de pico II que estuvieran contaminando al pico I y además conocer la inmunogenicidad del pico I en estas condiciones, inmunizando ratones con este material. Se hizo una prueba de electroforesis con material de pico I dializado y pico II como control en las condiciones mencionadas en materiales y métodos. Los resultados se resumen en la Fig. 5 donde se puede observar que la proteína más pequeña de pico I (9,800 daltones) migró 6.9 cm. y las de pico II, 7.2 cm. El material de pico II se dializó en membranas de Spectrapor 4, en la forma descrita anteriormente a manera de control. Después de 48 hr. de diálisis se estimó la absorbancia de esta muestra a 280 nm. No hubo lectura, aparentemente las proteínas de pico II fueron excluidas por la diálisis.

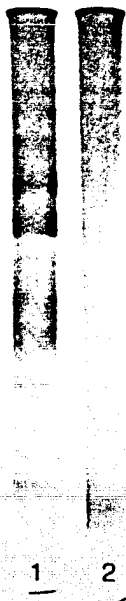


Figura 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de pico I dializado (gel 1) y pico II (gel 2).

Inmunolectroforesis:

Por inmunolectroforesis, el veneno de Centruroides limpidus limpidus contra su antisuero produjo 7 sistemas antígeno-anticuerpo (Fig. 6a), dos antígenos permanecieron en el origen, dos migraron hacia el cátodo y los restantes hacia el ánodo. Cuando el material de pico I se probó contra suero anti-veneno completo, se formaron 3 bandas de precipitación, dos de los antígenos migraron hacia el cátodo, uno permaneció en el origen y los demás migraron hacia el ánodo; mientras que las proteínas de pico II que migraron hacia el ánodo formaron 5 bandas de precipitación (Fig. 6b). El material de pico III formó 2 bandas de precipitación con migración hacia el ánodo y el de pico IV no produjo bandas de precipitación (Fig. 6c).

Por otro lado, el veneno completo probado contra suero anti-pico I formó 9 sistemas antígeno-anticuerpo, mientras que el pico I probado contra su propio antisuero formó 6 bandas, estos resultados se pueden observar en la figura 7a. Sin embargo, el resultado más importante fué que el pico I indujo la formación de anticuerpos que reaccionaron con las proteínas de pico II. Esto se observó cuando el pico II se probó contra el suero anti-pico I y formó 5 bandas de precipitación (Fig. 7b).

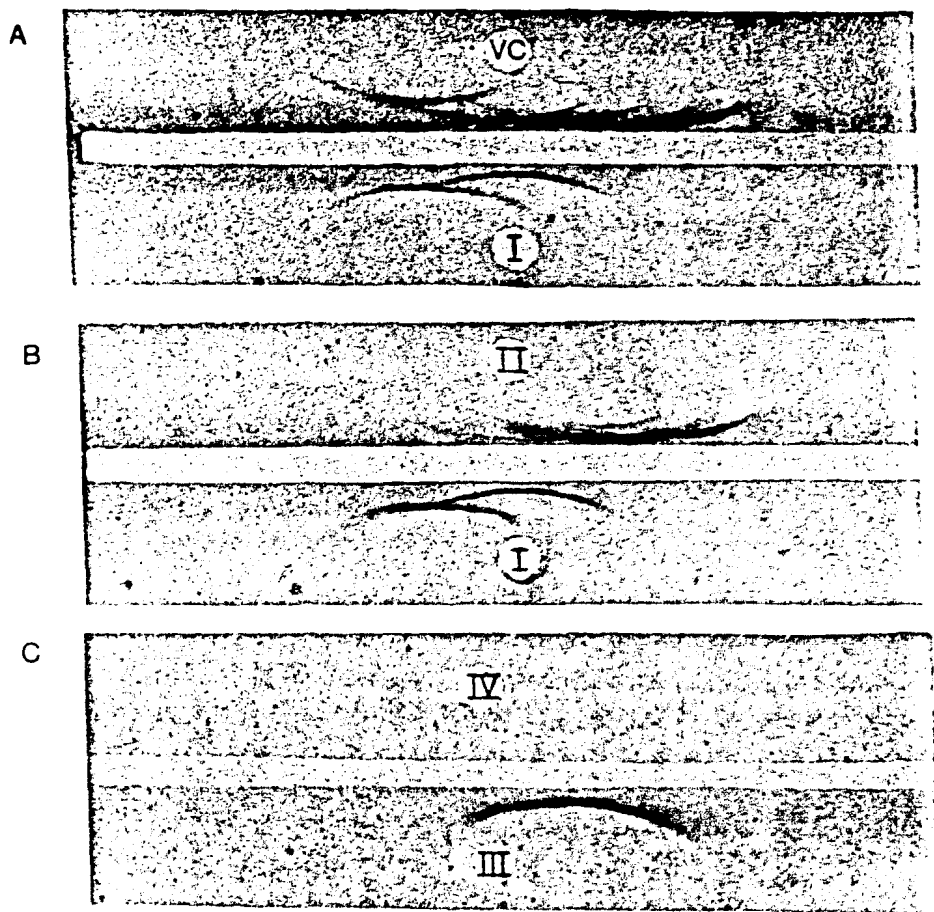


Figura 6. Inmunolectroforesis de veneno completo y sus fracciones obtenidas de Sephadex G-50 M contra suero anti-veneno completo de C. limpidus limpidus.

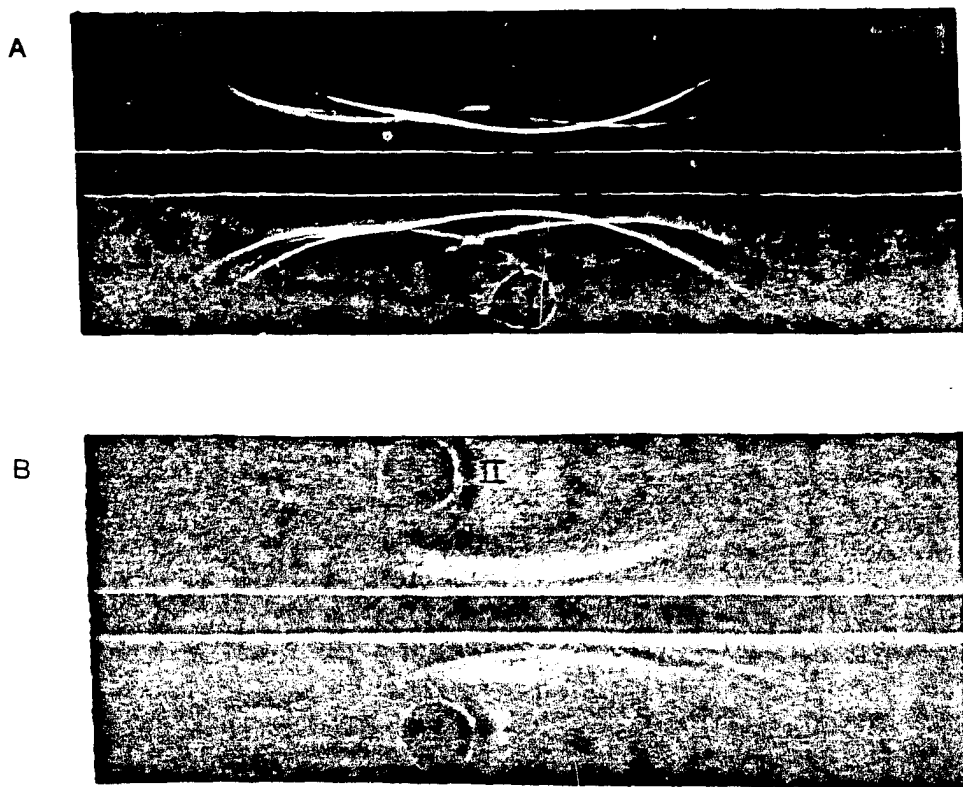


Figura 7. Inmunoelectroforesis de veneno completo, pico I y pico II contra suero anti-pico I.

Inmunodifusión.

Las pruebas de inmunodifusión mostraron identidad entre los antígenos de los picos I y II. Cuando el pico II se probó con suero anti-pico I, formó 5 bandas de precipitación que mostraron líneas de identidad con la banda formada por pico I y a la vez ésta última con las 5 bandas de precipitación producidas por veneno completo (Fig. 8).

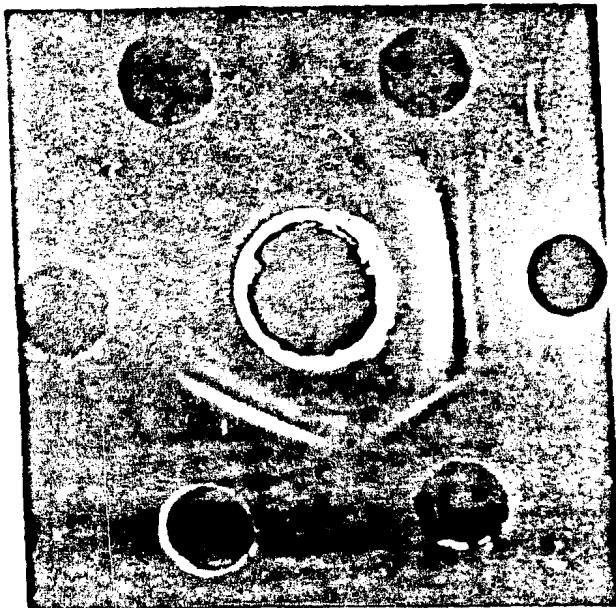


Figura 8. Inmunodifusión de picos I, II y veneno completo contra suero anti-pico I.

Pruebas de Inmunidad y Cuadro Clínico de Envenenamiento.

Los resultados de los experimentos que se realizaron con veneno completo o sus componentes modificados con glutaraldehído no aparecen en este trabajo ya que la inmunidad inducida por ellos fué muy baja o nula en algunos casos

Los resultados más satisfactorios en función de inmunogenicidad, se obtuvieron en animales inoculados con material de pico I incluído en adyuvante. Por lo que se diseñó un experimento para conocer la respuesta a la dosis inmunizante, para esto, se inocularon 3 grupos de 16 ratones cada uno con 25, 50 y 100 μg de proteínas de pico I. Se administraron 3 dosis, una cada semana. Siete días después de la última inmunización, los ratones se desafiaron con 19.6 μg de veneno de C. limpidus limpidus equivalentes a 1 DL₅₀ para ratones de 20 gr. Se incluyeron controles inoculados con adyuvante. Los resultados aparecen en la Tabla 2. El cuadro clínico de envenenamiento se caracterizó por la siguiente signología en orden de aparición: irritabilidad, parestesias faciales, taquicardia, hiperpnea, pilo-erECCIÓN, sialorrea, mioclonías, convulsiones, bipedestación con caída hacia atrás, desórdenes de la marcha, bradipnea, exoftalmos, prostración y finalmente paro respiratorio y muerte. Todos los ratones controles presentaron las manifestaciones típicas de envenenamiento, las cuales se observaron pocos minutos después de la inoculación del veneno. La taquicardia y las convulsiones prevalecieron durante

todo el tiempo de observación. Las convulsiones tonoclonicas aparecieron 30 min después del desafío en todos los animales controles y persistieron hasta los 90 min; sin embargo, a los 120 min sólo el 31% seguía presentando convulsiones, las cuales fueron disminuyendo de intensidad. La bipedestación con caída hacia atrás se observó entre los 60 y 90 min en 33% de los controles. Tres ratones en este grupo presentaron paro respiratorio y muerte, uno a los 90 min y los otros 2 a los 120 min.

En los ratones inmunizados con 25 y 50 μg de pico I, la taquicardia e hiperpnea fueron tan intensas como en los animales controles. Sin embargo, las convulsiones se observaron sólo en 25 y 19% de estos grupos respectivamente entre los 30 y 60 min; a los 150 min este signo había desaparecido mientras que el 15% de los ratones controles todavía los presentaba. La bipedestación con caída hacia atrás se observó en 19% de cada uno de estos grupos a los 60 min. A los 90 min, 19% de los animales inmunizados con 50 μg de pico I empezaron a caer en postración y más tarde, el 20% de los inmunizados con 25 μg ; estos porcentajes fueron incrementándose hasta alcanzar 79 y 93% respectivamente. Sin embargo, en estos animales la postración fué más ligera que la observada en los ratones controles. Uno de los ratones inmunizados con 25 μg murió a los 60 min y otro de los de 50 μg a los 90 min. En ninguno de los ratones inmunizados con 100 μg de pico I se observaron

Tabla 2. Signos clínicos en ratones inmunizados con 3 dosis de 25, 50 y 100 μg de proteínas de pico I y desafiados con 19.2 μg de veneno de C. limpidus limpidus.

Minutos después del desaffo	Signos Clínicos	Controles	25 μg	50 μg	100 μg
		%	%	%	%
30	Taquicardia	100	100	100	0
	Hiperpnea	100	100	100	0
	Convulsiones	100	25	19	0
60	Taquicardia	100	100	100	0
	Hiperpnea	100	100	100	0
	Convulsiones	100	25	19	0
	Bipedestación	33	19	19	0
	Muerte	0	6	0	0
90	Taquicardia	100	100	100	6
	Hiperpnea	100	100	100	6
	Convulsiones	100	13	13	0
	Bipedestación	33	0	0	0
	Postración	19	0	19	0
	Muerte acumulada	6	6	6	0
120	Taquicardia	100	100	86	13*
	Hiperpnea	100	100	86	13*
	Convulsiones	31	13	7	0
	Postración	77	20	43	13*
	Muerte acumulada	19	6	6	0
150	Taquicardia	100	100	86	13*
	Hiperpnea	100	100	86	13*
	Convulsiones	15	0	0	0
	Postración	38	80*	33	13*
180	Taquicardia	100	100	86	13*
	Hiperpnea	100	100	86	13*
	Postración	23	93*	79*	13*
410	Taquicardia	100	100	86	13*
	Hiperpnea	100	100	86	13*
	Postración	15	64*	64*	13*

*Los signos en estos animales fueron más ligeros que los observados en los animales controles.

manifestaciones de envenenamiento durante los primeros 60 min. Sin embargo, aparecieron taquicardia e hiperpnea ligeras en 6% de estos animales a los 90 min, este porcentaje se incrementó hasta 13% a los 120 min. En estos mismos animales se observó postración ligera a partir de los 120 min. Catorce ratones de este grupo (87%) no tuvieron manifestaciones de envenenamiento y se mantuvieron aparentemente normales durante todo el tiempo de observación. Estos resultados son una evidencia clara de que proteínas del pico I indujeron inmunidad en ratones contra el desafío del veneno de C. limpidus limpidus.

Basándonos en estos resultados, se realizó otro experimento para estudiar el grado de inmunidad inducida por proteínas de pico I dializado en membranas de Spectrapor 4 contra el desafío de 2 DL₅₀ de veneno completo. Para lo cual, se inmunizaron 14 ratones con 100 µg de pico I incluido en Melox 2:1 por vía subcutánea, con 3 dosis, una cada semana. Siete días después de la última inmunización, se desafiaron con 39.2 µg de veneno completo. Se incluyeron controles inoculados con adyuvante. Los resultados se muestran en la Fig. 9. Todos los animales desarrollaron el cuadro clínico de envenenamiento, sin embargo fué más grave en los animales controles. Las convulsiones, hiperpnea, taquicardia y sialorrea se observaron desde los 7 min en el 100% de los ratones controles mientras que en los animales inmunizados las convulsiones, taquicardia e hiperpnea aparecieron hasta los 25 min. Los animales controles empezaron

a morir desde los 19 min después del desafío, falleciendo el último a los 88 min. En cambio, sólo un animal inmunizado (7%) murió a los 75 min. después del desafío y 12 hrs más tarde el 93% de estos animales se habían recuperado completamente.

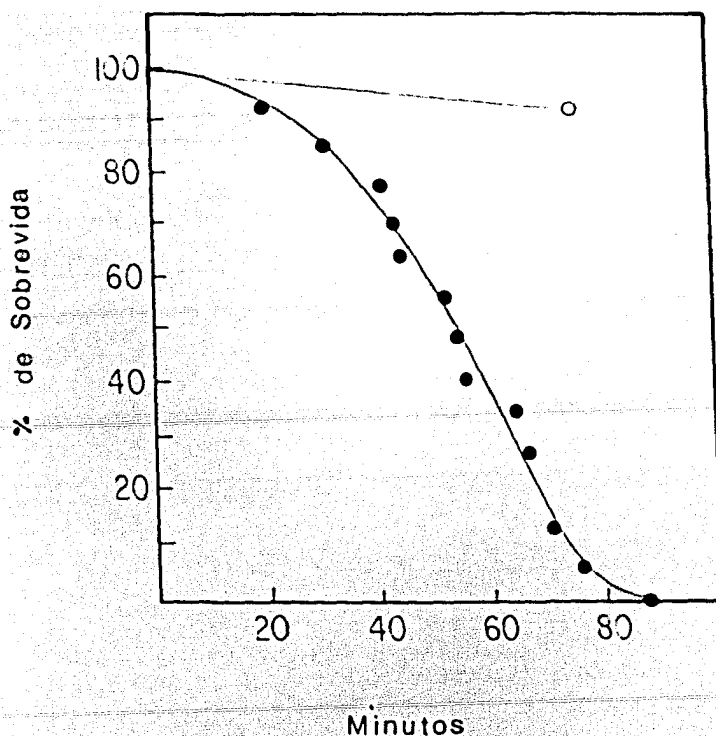


Figura 9. Porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con 100 µg de proteínas de pico I y desafiados con 39.2 µg de veneno de C. limpidus limpidus (○). Ratones controles (●). $p < .001$

DISCUSION

Es trascendental haber aislado un complejo de proteínas no tóxicas a partir del veneno de Centruroides limpidus limpidus (alacrán de Guerrero) capaz de inducir inmunidad en ratones contra el mismo veneno. Puesto que, el objetivo fundamental del presente trabajo es la consecución de un producto biológico, en este caso, una vacuna antiveneno de alacrán que pueda ser usada en poblaciones humanas afectadas por el escorpionismo.

Por ultrafiltración a través de Sephadex G-50, el veneno se fraccionó en 4 picos. El material del primero se analizó por electroforesis en presencia de SDS y se observó que estaba formado por, al menos, 12 proteínas, con pesos moleculares entre 9,800 y 162,000 daltones. Se observó que estas proteínas tienen ciertas características muy importantes: indujeron en ratones un alto grado de inmunidad contra el desafío de 39.2 μ g de veneno (2 DL₅₀ para ratones de 20 gr) ya que el 93% de los ratones inmunizados con este complejo de proteínas sobrevivieron mientras que todos los animales controles murieron en un lapso de 88 min. A pesar de que todos los animales inmunizados desarrollaron el cuadro clínico de envenenamiento, éste fué más ligero que el observado en los ratones controles. Más aún, los animales que sobrevivieron se recuperaron completamente a las 12 hr después del desafío. Este resultado tuvo una alta significancia estadística ($p < .001$). Simultáneamente, al ser estudiado este material por electroforesis se advirtió que la proteína más pequeña de pico I no sólo permaneció dentro de la membrana de diálisis.

sis sino que migró menos distancia que las proteínas de pico II (Fig. 5). Estos resultados deben evitar cualquier duda acerca de que las proteínas de pico I estén contaminadas con las de pico II. En este sentido, se puede decir que el Sephadex G-50 fué capaz de separar muy bien proteínas tóxicas de las que no lo son.

Cuando los ratones fueron inmunizados con 100 μ g de este complejo inmunogénico y desafiados después con 19.2 μ g de veneno, el 87% de estos animales no presentaron ningún signo de envenenamiento, solo el 13% restante desarrolló taquicardia e hiperpnea ligeras; mientras que en todos los animales controles, el cuadro clínico de envenenamiento fué grave, muriendo el 19% de ellos. Otra característica de este complejo protéico fué su inocuidad, ya que no mostró actividad tóxica aún a dosis de 200 μ g/ratón.

Las evidencias inmunológicas que se presentan en este trabajo explican la inmunidad inducida por estas proteínas contra el veneno de alacrán. En este sentido, las pruebas de inmunodifusión revelaron identidad entre las proteínas de los picos I y II cuando se probaron contra suero anti-pico I (Fig. 8); los anticuerpos inducidos por las proteínas de pico I, reaccionaron y formaron bandas de precipitación con proteínas de pico II, las cuales formaron líneas de identidad con aquellas producidas por proteínas de pico I. Este resultado sugiere que algunas proteínas de pico I deben tener homologías estructurales con proteínas de pico II.

Desde otro punto de vista, si pico I hubiera tenido protef-

nas de pico II, estos contaminantes hubieran inducido anticuerpos, los cuales hubieran reaccionado con proteínas de pico II, y producido el fenómeno de identidad sólo con sus antígenos respectivos contenidos en pico I. Además, las proteínas de pico I deberían haber formado bandas de precipitación sólo con sus respectivos anticuerpos.

En otras palabras, si hubiera diferencias inmunológicas entre las proteínas de los picos I y II; entonces, las proteínas de pico I deberían haber producido bandas de precipitación contra su propio antisuero, sin formar bandas de identidad con aquellas formadas por proteínas de pico II; pero produciendo bandas de identidad con sus antígenos respectivos contenidos en el veneno completo.

De hecho, se observaron bandas de identidad entre proteínas de pico I y veneno completo, así como entre proteínas de los picos I y II, como se puede ver en la Fig. 8. Estos resultados son evidencias de que las proteínas de pico I deben tener homologías estructurales con proteínas de pico II. Es más, Ruíz Castañeda (1933) al titular suero antialacránico encontró que una dilución 1/500 era capaz de neutralizar 1 dosis mínima mortal (D.M.M.) para cobayo, sin embargo una dilución 2/500 no neutralizaba 2 D.M.M. hasta que aumentaba el suero a 8/500. De estos resultados, el Dr. Ruíz Castañeda infirió que el veneno de alacrán debía estar formado por proteí-

nas tóxicas y no tóxicas, y que éstas últimas parecían fijar anticuerpos por fenómenos de inmunidad cruzada. Inferencias que concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo; ya que al cromatografiar el veneno en Sephadex G-50, se obtuvieron proteínas tóxicas y no tóxicas; las segundas indujeron en conejo, anticuerpos que formaron líneas de identidad con proteínas tóxicas del píco II, más aún indujeron en ratón un alto grado de inmunidad contra el desafío de veneno completo.

Todo esto pudiera explicar la gran heterogeneidad que se encuentra en la literatura respecto a la composición de algunos venenos de alacranes. Por otro lado, del análisis de estos resultados, surge la siguiente hipótesis: "Las neurotoxinas del veneno de alacrán deben provenir de cadenas polipeptídicas más largas y sin actividad tóxica. Por lo tanto, los alacranes deben estar sintetizando cadenas polipeptídicas (proneurotoxinas), las cuales por algún mecanismo deben ser cortadas en moléculas más pequeñas con actividad tóxica".

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró obtener del veneno de Centruroides limpidus limpidus componentes tóxicos y no tóxicos. Las proteínas no tóxicas fueron capaces de inducir inmunidad en ratones contra el desafío de 2 DL₅₀ del veneno completo.

Los resultados de inmunodifusión sugieren homologías en función de la estructura primaria entre las proteínas de pico I y las de pico II.

Los resultados de inmunidad pueden ser la base para la producción de una vacuna antialacrán para uso humano, esto implica que el objetivo de este trabajo ha sido alcanzado.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BABIN, D.R., WATT, D.D., GOSS, S.M. and MLEJNEK, E.V., (1974) Amino acid sequences of neurotoxins protein variants from the venom of Centruroides sculpturatus Ewing. Arch. Biochem. Biophys., 164, 694-706.
- 2) BRAVO-BECHERELLE, M.A. y MAZZOTTI, L., (1961) Distribución geográfica de la mortalidad por picadura de alacrán en México. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (México), XXI, 129-140.
- 3) CERVERA, E., (1936) Suero Antialacránico. Boletín Oficina Sanitaria Panamericana (México), 15, 2, 142-149.
- 4) CLAUSEN, J., (1971) Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules, in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", North Holland Publishing Co., Amsterdam, 447-463, 519-523.
- 5) GOMEZ, M.V., and DINIZ, C.R., (1966) Separation of toxic components from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus venom. Mem. Inst. Butantan. (Brazil), 33, 899-902.
- 6) HOFFMAN, C.C., (1932) Monografías para la Entomología Médica de México, Monografía No. 2. Los escorpiones de México I. Anales del Instituto de Biología, U.N.A.M. (México), 11, 316-324.
- 7) HOFFMAN, C., y VARGAS, L., (1935) Contribución al conocimiento de los venenos de los alacranes mexicanos. Bol. Instit. Higiene. (México), 2da. época, 11, 4, 182-186.

- 8) MAZZOTTI, L., y BRAVO-BECHERELLE, M.A., (1961) Escorpionismo en la República Mexicana. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop., (México) XXI, 3-19.
- 9) MIRANDA, F., KUPEYAN, C., ROCHAT, H., ROCHAT, C., and LISSITZKY, S., (1970) Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions Androctonus australis Hector, Buthus occitanus and Leiurus quinquestriatus. Eur. J. Biochem., 16, 514-523.
- 10) MOLINARI, J.L., TATO, P., YEPEZ, L., y GOMEZ, M.A., (1979) Inmunidad natural contra el veneno de Centruroides limpidus limpidus (alacrán de Guerrero) en pobladores de Huitzucó, Gro. (En prensa).
- 11) POSSANI, D.L., ALAGON, A.C., FLETCHER, P.L., and ERICKSON, B., (1977) Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpions Tityus serrulatus Lutz and Mello. Arch. Biochem. and Biophys., 180, 394-403.
- 12) RAPPAPORT, R.S., BONDE, G., McCANN, T., RUBIN, B.A., and TINT, H., (1974) Preparation of a stable, antigenic toxoid by reaction of purified toxin with glutaraldehyde. Infect. Immun., 9, 304-317.
- 13) REED, L.J., and MUENCH, H., (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. Ann. J. Hygiene., 27, 493-497.
- 14) ROCHAT, H., ROCHAT, C., MIRANDA, F., LISSITZKY, S., and EDMAN, P., (1970) The amino acid sequence of neurotoxin I of Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem., 17, 262-264.

- 15) RUIZ CASTAÑEDA, M., (1933) Preparación del suero antialacrán y su titulación. Bol. Instit. Higiene (México), 6, 199-208.
- 16) TATO, P., GAVILANES, M., MUÑOZ, L., FLETCHER, P., and MOLINARI, J.L., (1978) Epidemiological aspects of scorpionism in Mexico I. Purification of neurotoxins from Centruroides limpidus limpidus. Venom Toxins: Animal, Plant, and Microbial (Proceedings of the Fifth International Symposium) Pergamon Press, Oxford, 639-646.
- 17) VARELA, G., y SANCHEZ POSADA, E., (1938) Anapozzoñas del veneno del alacrán de Guerrero (Centruroides limpidus limpidus Karsch). Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas., Instituto Politécnico Nacional (México), 1, 135-138.
- 18) VEGA, F.L., y LIA, J.M., (1966) Consideraciones epidemiológicas sobre la picadura por alacrán en la ciudad de Durango. Rev. Invest. Salud Públ., XXVI, 7-21.
- 19) WARBURG, O., and CHRISTIAN, W., (1957) Protein estimation by ultraviolet absorption, in "Methods in Enzymology" Academic Press Inc., New York, Vol. III, 451.
- 20) WEBER, K., and OSBORN, M., (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol.Chem., 16, 4406-4412.