

207  
1817

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



PURIFICACION DE TOXINAS DEL VENENO DEL ALACRAN  
CENTRUROIDES NOXIUS HOFFMANN 1932, POR  
MEDIO DE INMUNOADSORBENTES

**T E S I S      P R O F E S I O N A L**

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

MARIA DEL ROCIO SANCHEZ GARCIA

MEXICO, D. F.

1986



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 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

I.- RESUMEN	-----	1
II.- ANTECEDENTES		
A.- Generalidades sobre alacranes	-----	4
1.- Importancia Médica	-----	14
2.- Sintomatología y Dosis letal	-----	15
3.- Composición del veneno	-----	17
4.- Purificación de toxinas	-----	19
5.- Caracterización Química y estructural de las toxinas	-----	20
6.- Caracterización Biológica y mecanismo de acción de las toxinas	-----	24
7.- El alacrán de Nayarit	-----	26
B.- Cromatografía de Afinidad		
1.- Consideraciones generales	-----	31
2.- Selección de la Matriz	-----	34
3.- Selección del Ligando	-----	36
4.- Métodos de acoplamiento	-----	37
5.- Condiciones de adsorción y elución	-----	40
C.- Inmunoadsorbentes		
1.- Consideraciones generales	-----	42
2.- Principios Básicos	-----	43
3.- Anticuerpos Policlonales vs Anticuerpos Monoclonales	-----	46
D.- Anticuerpos Monoclonales		
1.- Generalidades	-----	48
2.- Aplicación	-----	51
III.- MATERIAL Y METODOS		
A.- Fuente del veneno	-----	53
B.- Fuente del material	-----	53
C.- Purificación de la NTX	-----	55
1.- Métodos cromatográficos	-----	55
2.- Electroforesis	-----	56
3.- Cuantificación de proteína	-----	56
4.- Análisis de aminoácidos	-----	57

D.- Purificación de anticuerpos anti-NTX	
1.- Purificación de Ab. policlonales	57
a.- Ensayo Inmunoenzimatico	60
b.- Inmunodifusión	63
2.- Purificación de Ab. monoclonales	64
a.- Electroforesis	65
b.- Determinación de Clase	68
E.- Inmunoadsorbentes	
1.- Inmunoadsorbente con Ab. policlonal	69
a.- Purificación de la NTX a partir de Fracción II	69
2.- Inmunoadsorbente con Ab. monoclonal	70
b.- Purificación de la NTX a partir de veneno total	72
IV.- RESULTADOS	
A.- Purificación de la NTX	74
B.- Purificación de Ab. anti-NTX	
1.- Purificación de Ab. policlonales	76
2.- Purificación de Ab. monoclonales	77
C.- Inmunoadsorbentes	
1.- Inmunoadsorbente con Ab. policlonal	101
2.- Inmunoadsorbente con Ab. monoclonal	103
V.- DISCUSION DE RESULTADOS	116
VI.- CONCLUSIONES	128
VII.- PERSPECTIVAS FUTURAS	130
VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	

## GLOSARIO

<u>C. noxius</u>	<u>Centruroides noxius</u>
NTX	Noxiustoxina
Seph 4B	Sepharosa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
DEAE	Diethylaminoetilcelulosa
CMC	Carboximetilcelulosa
ELISA	Ensayo Inmunoenzimatico
Prot A-POD	Proteína A-Peroxidasa
Ab.	Anticuerpo
PBS.	Amortiguador de fosfatos salino
T.A.	Temperatura ambiente
Gly	Glicina
L.A.	Líquido de Ascitis
rpm	revoluciones por minuto
D.O.	Densidad óptica
F. II	Fracción II del veneno de <u>C. noxius</u>
DL50	Dosis letal media
a.a.	Aminoácido
Pristán	Sustancia inductora de tumor
A	Alanina

C	<i>Cisteína</i>
D	<i>Aspártico</i>
E	<i>Glutámico</i>
F	<i>Fenilalanina</i>
G	<i>Glicina</i>
H	<i>Histidina</i>
I	<i>Isoleucina</i>
K	<i>Lisina</i>
L	<i>Leucina</i>
M	<i>Metionina</i>
N	<i>Asparagina</i>
P	<i>Prolina</i>
Q	<i>Glutamina</i>
R	<i>Arginina</i>
S	<i>Serina</i>
T	<i>Treonina</i>
V	<i>Valina</i>
W	<i>Triptofano</i>
Y	<i>Tirosina</i>

## INTRODUCCION

Los alacranes son organismos muy antiguos que siempre han tenido relación con el hombre.

El hombre por el gran temor que siempre ha sentido por estos animales, los ha hecho intérpretes principales de mitos y leyendas.

De esta manera han sido objeto de estudio ya que ciertas especies de alacranes son muy nocivas al hombre.

En épocas pasadas los estudios sobre el veneno de alacrán era básicamente sobre el tratamiento y la sintomatología del piquete.

Recientemente uno de los aspectos de mayor interés es el uso de toxinas purificadas para el estudio de mecanismos moleculares y su acción sobre membranas excitables y para el aislamiento de canales iónicos.

Dentro de la gran variedad de toxinas de alacrán conocidas actualmente destaca un grupo de ellas, que

cobra gran interés por ser polipéptidos que actúan específicamente sobre el canal de potasio.

Esta importancia radica en el hecho de que hasta hace poco tiempo no se tenía conocimiento de péptidos que tuvieran dicha función.

De esta manera este trabajo de tesis intenta dar nueva información a una de las líneas de investigación existentes en el laboratorio del Dr. Possani.

Para la realización de todos los estudios sobre las toxinas de alacranes se requieren de toxinas puras.

Y ya que la purificación de toxinas requiere de una metodología un tanto laboriosa, se pensó en la manera de obtener toxinas en forma pura en menos pasos cromatográficos que los involucrados en la metodología tradicional.

Por lo que el objetivo de esta tesis es el de diseñar una nueva estrategia de purificación de toxinas, en la que los pasos a seguir sean menos que los requeridos en la metodología tradicional.



## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue el de diseñar una nueva estrategia de purificación de toxinas del veneno del alacrán Centruroides noxius, que permitiese obtener toxinas en forma pura con menos pasos cromatográficos que los involucrados en la metodología tradicional.

Va que esta metodología incluye al menos tres pasos cromatográficos, se pensó en utilizar una nueva técnica en la que la purificación fuera más rápida pero al mismo tiempo se lograra un buen rendimiento, de esta manera se eligió a la cromatografía de afinidad como una nueva estrategia de purificación.

Se purificó a la Noxiustoxina (NTX) por el método tradicional, con el objeto de desarrollar dos líneas de experimentación: a) sintetizar una columna de afinidad acoplando NTX a Sepharosa 4B, para purificar anticuerpos policlonales anti-NTX de plasma equino anti-alacrán; y b) diseñar un esquema de inmunización en ratones para la obtención de anticuerpos monoclonales anti-NTX, para posteriormente sintetizar una colum

na de afinidad con los anticuerpos monoclonales puros.

Se purificaron anticuerpos policlonales anti-NTX del plasma equino antialacrán (S.S.A.) por medio de la columna de afinidad Sepharosa 4B-NTX. Los cuales se utilizaron para la síntesis de una nueva columna de afinidad Sepharosa 4B-Ig, para la purificación directa de la NTX a partir de Fracción II del veneno de C. noxius.

También se obtuvieron seis clonas de anticuerpos monoclonales anti-NTX. De estas seis clonas se produjo líquido de ascitis, del cual se purificaron los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales purificados de la clona BNTX 4, fueron utilizados para sintetizar una columna de afinidad Affi-gel-ab. monoclonal BNTX 4, para purificar a la NTX a partir de veneno total.

Con el inmoadsorbente sintetizado con anticuerpos policlonales (Sepharosa 4B-Ig) no se logró obtener a la NTX de forma pura ya que la muestra contenía una gran cantidad de glicina, debido a que esta columna fue eluida con un amortiguador de Gly-HCl, lo cual

interferió para poder corroborar la composición de aminoácidos de la NTX. Sin embargo se sabe que se trataba de la NTX por su patrón de corrimiento electroforético y por su toxicidad.

Con respecto al inmunoadsorbente con anticuerpo monoclonal (Affi-gel-Ab. monoclonal BNTX 4), no se logró obtener a la NTX esperada; sin embargo, los resultados obtenidos fueron muy alentadores ya que posiblemente se obtuvo una toxina análoga a la NTX la cual se encuentra reportada en la literatura

Esta toxina al igual que la NTX, se encuentra dentro de la familia de toxinas que bloquean al canal de potasio.

## ANTECEDENTES

Los escorpiones, han sido temidos por el hombre desde tiempos muy antiguos y frecuentemente jugaban un papel maligno en las fábulas y leyendas. El respeto griego por los escorpiones dio origen al nombre de la constelación Scorpio, un signo del zodiaco.

Los escorpiones son arácnidos primitivos que se caracterizan por tener un abdomen largo y segmentado, el cual se puede dividir en dos partes principales: el cefalotorax (cabeza y torax) y abdomen.

El cefalotorax está cubierto con una estructura dura (coraza) que lleva un par de ojos medianos y generalmente un grupo de 2 a 5 ojos laterales pequeños a cada lado, el cefalotorax tiene varios pares de apéndices, incluyendo queliceros, pedipalpos y cuatro pares de apéndices en forma de tenazas o pinzas enfrente de la boca, que se utilizan durante la alimentación. Inmediatamente después de los queliceros están los grandes pedipalpos que tienen los dos últimos segmentos alargados formando una fuerte pinza para la captura de sus

presas. Los apéndices locomotores están provistos de ganchos tarsales.

El abdomen, el cual está unido al cefalotorax (también llamado prosoma), consiste de doce segmentos, siete de los cuales componen una región ancha y aplanada (preabdomen) y los cinco restantes segmentos que forman un postabdomen flexible o cola en cuyo extremo presenta una glándula venenosa y un aguijón para inocular el veneno a sus víctimas.

Son animales cuyo tamaño varía de 1.5 a 18 cms. de largo; que habitan en regiones cálidas y templadas del planeta.

Existen unas 800 especies agrupadas en seis familias. Su coloración es amarillenta, parda o negra, son de hábitos nocturnos.

Los alacranes pertenecen al orden Scorpionida, el cual está constituido por cinco familias (Buthidae, Scorpionidae, Diplocentridae, Chactidae, Vejovidae y Bothriuridae).

El alacrán Centruroides noxius pertenece a la fa

milia Buthidae.

Dentro de esta familia se encuentran los géneros más nocivos al hombre y son: Androctonus, Buthus, Centruroides, Leiurus y Tityus.

En México (Mazzoti y Bravo-Becherelle, 1963), Brasil (Bücherl, 1971), Norte de África (Bazolet, 1971) y Medio Oriente (Shulov, 1955), los alacranes han representado un problema médico en la vida del hombre.

En el pasado, en estas regiones del mundo los alacranes de la familia Buthidae, motivaron la investigación médica sobre la naturaleza y composición del veneno como tal y para el desarrollo de antídotos.

Recientemente, el descubrimiento de componentes activos de naturaleza polipeptídica, en el veneno de estos alacranes, ha impulsado un interés científico para el uso potencial de las toxinas de alacrán, como herramientas para estudios neurofisiológicos (Ceccarelli y Clementi, 1979).

Experimentos llevados a cabo en ratón, pollos,

chapulines, larvas de mosca e isópodos (Zlotkin y col., 1978) han sido excelentes bioensayos para el aislamiento de una serie de polipéptidos de bajo peso molecular, llamadas toxinas. De acuerdo con los animales de experimentación utilizados como bioensayos, se han aislado y caracterizado toxinas dirigidas contra mamíferos, insectos y crustáceos (Rochat y col., 1979); lo cual indica que todos los venenos de alacrán contienen polipéptidos tóxicos. Los venenos de los alacranes de la familia Buthidae son tóxicos al hombre, y han sido mejor caracterizados bioquímica y farmacológicamente con respecto a los venenos de las otras cinco familias del subgrupo Chactoíde: familias Chactidae, Scorpionidae, Diplocentridae, Bothriuridae y Vejovidae (Goyffon y Kovoov, 1978).

En la familia Buthidae, se han encontrado dos grupos principales de toxinas: péptidos de 61-70 residuos de a.a. (Miranda y col., 1970; Grishin y col., 1980; Darbon y col., 1982; Possani y col., 1983) y péptidos de 36-39 residuos de a.a. (Zhdanova y col., 1978; Possani y col., 1982). Las toxinas de ambos grupos mantienen una estructura tridimensional compacta por la presencia de tres o cuatro enlaces disulfuro

{Kopeyan y col., 1974; Fontecilla-Camps y col., 1980; Possani y col., 1982}. Sin embargo han sido encontradas excepciones a esta regla {Nair y Kurup, 1975; Toledo y Neves, 1976; Lazarovich y col., 1982a; Lazarovich y Zlotkin, 1982}.

Hasta 1983, se hablan reportado 113 diferentes toxinas de alacrán, aisladas en forma pura, de 23 de ellas se conoce su secuencia de a.a. completas y otras 25 han sido secuenciadas parcialmente en la región N-terminal {Zlotkin y col., 1978; Rochat y col., 1979; Catterall, 1980; Chhatwal y Haser mann, 1981; Darbon y col., 1982; Griene y col., 1982; Grishin y col., 1978, 1979, 1980, 1981, 1982; Hagag y col., 1983; Lazarovich y Zlotkin, 1982; Lazarovich y col., 1982a; Kopeyan y col., 1979; Nair y Kurup, 1975; Possani y col., 1978, 1981a, 1981c, 1981d, 1982; Rosso y Rochat, 1982; Vargas y col., 1982; Watt y Simard, 1978; Watt y col., 1978; Zhdanova y col., 1978; Zlotkin y col., 1982}.

El estudio de los venenos del alacrán y de sus toxinas purificadas ha ayudado en el pasado, especialmente a través de la seroterapia, a resolver problemas médicos, y en el presente ha sido utilizado para obtener vacunas {Possani y col., 1981b}.



El aspecto de mayor interés, es el uso de toxinas purificadas para el estudio de mecanismos moleculares y su acción sobre membranas excitables y para el aislamiento de canales iónicos (Catterall, 1980).

Las toxinas de alacrán se han clasificado en cuatro grupos: el primero compuesto por toxinas dirigidas a mamíferos, que actúan específicamente sobre el canal de sodio; el segundo, por toxinas a mamíferos pero que actúan específicamente sobre el canal de potasio; el tercero por toxinas dirigidas a insectos y el cuarto grupo por toxinas dirigidas a crustáceos.

En las toxinas a mamíferos que constituyen el primero y más grande grupo de toxinas de alacrán, hay muchas similitudes en su estructura primaria, longitud de la cadena polipeptídica y enrollamiento y estabilización de su estructura tridimensional, la cual de alguna manera garantiza el reconocimiento de un sitio de unión específica a membranas excitables de mamíferos (canales de sodio); sin embargo, modificaciones, subsituciones, deleciones o inserciones de nuevos aminoácidos en la correspondiente estructura primaria puede producir inactivación de toxinas o un diferente tipo de modulación de

la función de estas toxinas a nivel molecular.

El segundo grupo está compuesto por un nuevo tipo de toxinas de alacrán que actúan específicamente sobre el canal de potasio (Cahalan, 1975; Carbone y col., 1982). Este grupo está compuesto por la noxiustoxina y toxina II.9A de Tityus serrulatus (Possani y col., 1982).

En la tabla Ia, se compara la secuencia N-terminal de estas tres toxinas. Su acción biológica es muy similar. En axón gigante de calamar (in vitro), estas toxinas decremantan la permeabilidad del canal de potasio, reversiblemente e independiente de la polarización de la membrana, sin afectar las propiedades del canal de sodio (Carbone y col., 1982, 1983; Possani y col., 1982).

Este tipo de péptidos pueden estar presentes en venenos de alacranes americanos, tales como Centruroides limpidus limpidus, C. elegans y, en menor proporción, en C. suffusus suffusus y C. limpidus tecomanus (Carbone y col., 1983).

El descubrimiento de nuevos tipos de toxinas de

Tabla Ia

Comparación de toxinas que bloquean el canal de K<sup>+</sup>

	1	5	10	15
II.9	Val-Phe-Ile-Asn-Ala-Lys-Cys-Arg-Gly-Ser-Pro-			--Glu-Cys-Leu-
NIX	Thr-Ile-Ile-Asn-Val-Lys-Cys-		-Thr-Ser-Pro-Lys-Gln-Cys-Ser-	
II.10.2	Thr-Phe-Ile-Asp-Val-Lys-Cys-		-Gly-Ser-Ser-Lys-Glu-Cys-Xxx-	
		20	25	30
II.9		-Pro-Lys-Cys-Lys-Glu-Ala-Xxx-Gly-Lys-Ala-Ala-Gly-		-Lys-
NIX	Lys-Pro-	-Cys-Lys-Glu-Leu-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ala-Gly-Ala-Lys-		
II.10.2	-Pro-			
II.9	Cys-Xxx-Asn-			
NIX	Cys-Met-Asn-			

II.9 toxina de Tityus serpulatus, II.10.2 y NIX toxinas de Centruroides noxius (Adaptado por Possani y col., 1982).

diferentes especificidades de acción es un estímulo constante para la investigación en este campo (Lazarovich y col., 1982a; Carbone y col., 1982).

En México desde 1944 el grupo del Dr. Del Pozo, empezó a caracterizar fisiológicamente el efecto de algunos venenos de alacranes mexicanos (Del Pozo, 1948a, 1948b, 1949a, 1949b, 1968; Del Pozo y Anguiano 1946, 1947; Del Pozo y col., 1944, 1945).

Entre los alacranes estudiados están el Centruroides suffusus suffusus, C. limpidus limpidus, C. limpidus tecomanus y C. noxius. Estos autores estudiaron sobre todo la acción ejercida sobre músculo (contracción, fibrilación, etc.) y su relación con la inervación periférica y/o central.

Mazzotti y Bravo-Bacherelle en 1963 publicaron una importante revisión sobre el escorpionismo en México.

Desde 1977 el grupo del Dr. Possani ha publicado una serie de artículos sobre la caracterización bioquímica del veneno de alacranes del género Tityus de Brasil (Alagón y col., 1978; Possani y col., 1977, 1981 c)

y del género Centruroides de México (Dent y col., 1980; Possani y col., 1978, 1980, 1981a, 1981d, 1985; Carbone y col., 1982).

## IMPORTANCIA MEDICA

En México, a pesar de que la picadura de alacrán ha representado una de las causas principales de mortalidad por intoxicación debido a animales ponzoñosos, los datos estadísticos al respecto son muy escasos. Un estudio realizado por Bravo-Becherelle y Mazzotti (1961) sobre las tasas medias anuales de defunciones por cada 100 000 habitantes entre los años de 1940-1949 y de 1957-1958, mostraron que los estados con mayor índice son: Colima, Nayarit, Guerrero y Morelos con una tasa de 83.7, 41.6, 41.5 y 13.3 respectivamente e indican que más de 20 000 personas murieron por picadura de alacrán. Debido a que el veneno del alacrán tiene un valor antigénico muy bajo y la inmunización en caballos requiere al menos de ocho meses para llevarse a cabo, no se puede obtener un suero de alto poder neutralizante. Sin embargo, su aplicación ha repercutido ampliamente en la disminución de la mortalidad por picadura de alacrán (Del Pozo, 1962).

Datos más recientes de López Acuña y Alagón indican que en la República Mexicana ocurren más de 100 000 accidentes anuales por picadura de alacranes, de los cuales entre 700 y 800 son fatales (López Acuña y Alagón, 1979); más del 90% de los casos de defunción ocurren con niños

menores de 2 años de edad.

## SINTOMATOLOGIA Y DOSIS LETAL

A pesar de que la toxicidad del veneno de los alacranes difiere ampliamente de una especie a otra, existe una gran semejanza entre la sintomatología de envenenamiento producido por la picadura de estos organismos.

El efecto tóxico de este veneno sobre la víctima depende de varios factores: de la especie del alacrán, de la dosis del veneno inyectada, del volumen y del lugar del piquete (Hoffmann, 1938).

En general la sintomatología que se presenta es la siguiente: hiperestesia y dolor local intenso e inmediato, aunque no se produce ningún efecto visible sobre el sitio de inyección, entumecimiento de la lengua y la garganta, que produce dificultades para tragar, hiperexcitabilidad que con el tiempo puede conducir a una sensación de angustia, salivación y diaforesis excesiva, lagrimeo, midriasis y en casos severos es frecuente que se produzca exoftalmia, fotofobia y distensión gástrica. El pulso

se incrementa y se vuelve arritmico, la presión arterial se incrementa al principio y decrece por debajo de lo normal después. Se producen convulsiones y contracciones musculares, parálisis flácida con tetanización de los miembros inferiores en los casos graves, dificultades para respirar. La muerte se origina por una parálisis respiratoria que puede ocurrir de unos cuantos minutos a varias horas después de la picadura (Flores, 1963; Bazolet, 1971; Zlotkin, 1978).

Las diferencias atribuidas a los venenos de los ala cranes radica en la variedad de los componentes constitutivos del veneno. Una forma de verificar estas diferencias es a través de las dosis letales medias (DL<sub>50</sub>) atribuidas a cada una de las especies. Estas varían dependiendo de la especie estudiada y de su distribución geográfica. Sin embargo, también existen diferencias de DL<sub>50</sub> por la cepa de ratones estudiados (Guzmán, 1984), la ruta de inyección y la manipulación de los datos. Guzmán (1984) reporta una DL<sub>50</sub> de 2.78 mg/kg para la cepa BALB/c (albina); 3.31 para BALB/k (albina); 3.30 para CD1 (albina); 1.20 para ambas cepas CD1 (negra) y DBA (parda); 1.32 para MIH (albina) y de apenas 0.61 para SSA (albina). A pesar de estas diferencias, puede decirse que la potencia letal



de estos venenos tiene un rango entre 0.25 y 3.31 mg/kg y que las especies más potentes son el alacrán africano Leiurus quinquestratus y el mexicano Centruroides noxius.

#### COMPOSICION DEL VENENO

El veneno de los alacranes se compone principalmente de proteínas y péptidos de diferentes pesos moleculares. También encontramos de forma general la presencia de aminoácidos libres, sales inorgánicas, nucleótidos y lípidos. El veneno de los alacranes peligrosos al hombre es muy pobre o no contiene enzimas del tipo de las proteasas y fosfolipasas, pero posee una cantidad considerable de actividad hialuronidásica. La presencia de hialuronidasa parece ser una constante en el veneno de todas las especies de alacranes. En las especies no peligrosas al hombre se ha demostrado la presencia de ciertas enzimas hidrolíticas con actividad dirigida en contra de enlaces amidas y ésteres. El veneno obtenido por estimulación eléctrica del telson de los alacranes contiene una cantidad no despreciable de un material gelatinoso y altamente higroscópico que se puede eliminar por centrifugación. Este material constituye cerca del 30 al 50% del peso total seco

del veneno. Se ha podido demostrar por microscopía electrónica que en este tipo de veneno existe una porción importante de membranas envolviendo a un material denso granuloso. Sin embargo, la proporción más importante de las sustancias del veneno de los alacranes está constituida por varias familias de polipéptidos básicos con peso molecular de alrededor de 7 000 y con actividades neurotóxicas.

Existen toxinas con distintas actividades biológicas. Unas reconocen e interfieren con fenómenos de membranas de animales superiores, son las llamadas neurotoxinas a mamíferos, sobre las cuales nos ocuparemos especialmente enseguida. También existen toxinas que reconocen solamente a tejidos excitables de insectos o de crustáceos. En cada una de estas tres categorías de toxinas existe una variedad de diferentes moléculas. De esta forma hay por lo menos tres familias distintas de polipéptidos, cada una representada por un número variable de moléculas diferentes con el mismo tipo de actividad biológica.

El efecto específico de especie parece no presentar reacción cruzada; así, las toxinas a insectos y crustáceos no afectan al hombre (Rathmayer y Col., 1978) y viceversa, ciertas toxinas a mamíferos no afectan a insectos (Darbon

y col., 1981).

## PURIFICACION DE TOXINAS

La purificación de los polipéptidos tóxicos que constituyen el veneno de los alacranes implica una cierta dificultad. Esto se debe a la presencia de distintas moléculas con peso molecular muy semejante y con propiedades físicoquímicas parecidas. En el laboratorio del Dr. Possani, se ha desarrollado una estrategia que involucra básicamente tres pasos, primero: obtención del material soluble por centrifugación; segundo: separación del veneno soluble por cromatografía de filtración por peso molecular en columnas de Sephadex G-50 y finalmente purificación de las toxinas por intercambio iónico en columnas de carboximetilcelulosa, Aminex A-5 o Bio-Rex-70.

La homogeneidad de las toxinas es verificada por el comportamiento cromatográfico (simetría de los picos del cromatograma), por electroforesis en geles de acrilamida en el sistema de [Reisfield y col., 1962] y por secuenciación automatizada de los aminoácidos de la porción N-terminal.

## CARACTERIZACION QUIMICA Y ESTRUCTURAL DE LAS TOXINAS

Todas las toxinas obtenidas de forma homogénea son analizadas en relación a la composición de aminoácidos. La tabla I muestra el resultado del análisis del hidrolizado de la mayoría de las toxinas que se han purificado de los alacranes Latino-Americanos. Como se observa en la tabla la composición de aminoácidos de las toxinas revela la presencia de 39 a 65 residuos de aminoácidos (Dent y col., 1981; Possani y col., 1977, 1978, 1980, 1981a, 1982). Estos valores están dentro de lo reportado en la literatura para toxinas de otros alacranes, cuya composición varía entre 36 a 70 residuos de aminoácidos (Babín y col., 1975; Miranda y col., 1970; Rochat y col., 1970, 1979; Zlotkin, 1978).

De forma general las toxinas de alacrán son moléculas muy compactas y termoestables.

En la tabla II se muestra la secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal de las toxinas de los alacranes Latino-Americanos. Se puede observar que existe un cierto grado de homología en las secuencias de aminoácidos de toxinas provenientes del mismo alacrán y que afecta al mismo tipo de tejido.

Tabla I

## Composición de Aminoácidos de Toxinas de alacranes Latino-Americanos

Alacrán	C. noxius		C. elegans					C. l. tecomanus		C. l. limpidus	
	II.9.2.2	II.10	II.11	II.13	II.14	III.3	II.4	II.9.3	II.6	II.9	
Ac. Aspártico	6	4	4	6	7	5	5	5	5	8	
Treonina	2	4	2	2	3	3	2	3	3	3	
Serina	1	3	4	2	4	2	5	2	2	2	
Glutámico	7	6	2	4	2	8	5	7	8	4	
Prolina	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	
Glicina	7	7	3	8	8	8	6	8	9	8	
Alanina	4	3	2	4	1	3	4	3	3	2	
Valina	2	1	1	2	1	3	2	3	2	1	
Metionina	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
Isoleucina	1	1	2	1	0	0	1	1	0	0	
Leucina	6	4	1	4	4	4-5	3	4	5	3	
Tirosina	6	5	2	6	6	6	5	6	9	6	
Fenilalanina	1	2	0	1	1	2	1	2	1	1	
Histidina	1	1	0	1	1	2	2	2	2	1	
Lisina	8	7	7	7	7	6	4	6	6	8	
Arginina	2	2	0	2	3	2	2	2	1	2	
Cisteína	8	8	6	8	8	n.d.	4-5	8	n.d.	n.d.	
Triptófano	1	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	n.d.	n.d.	

Tabla I

## Composición de Aminoácidos de Toxinas de alacranes Latino-Americanos

Aminoácido	T. serrulatus				
	II.11	toxinas III.8	III.10	IV.5	Υ
Ac. Aspartico	4	5	4	10	4
Treonina	1	2	1	2	1
Serina	4	3	4	3	4
Ac. Glutámico	3	2	3	2	3
Prolina	3	3	3	3	3
Glicina	8	6	8	4	8
Alanina	3	6	3	3	3
Valina	2	2	2	2	2
Metionina	1	1	1	0	1
Isoleucina	2	2	2	2	2
Leucina	3	1	3	3	3
Tirosina	5	5	5	8	5
Fenilalanina	1	3	1	0	1
Histidina	1	3	1	1	1
Lisina	6	7	6	7	7
Arginina	3	1	3	0	3
Cisteína	8	6-8	6-8	6-8	8
Triptofano	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3

n.d. No determinado T. serrulatus= Tityus serrulatus, C. noxius= Centruroides noxius,  
 C. elegans= Centruroides elegans, C. l. tecomanus= Centruroides limpidus tecomanus, C.l.  
 limpidus= Centruroides limpidus limpidus.

Tabla II

## Secuencias de Aminoácidos de Toxinas de alacranes Latino-Americanos

<u>C. noxius</u>	
II.9.2.2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKGGAGGYCYAFACWC...
II.10	KEGYLVN...
II.10.2	TFIDVKCGSSKECKP...
III.11	TIINVKCTSPQKCSKPKELYGSSAGAKOMNGKCKCYBN
II.13	KEGYIVCYHDGCKYXCYKLGDN DY...
II.14	KDGYLVDAKGCKKNKYKLGKN DYCNRECRMKIRG...
<u>C. elegans</u>	
II.6.3	KZGYLVBHSTGCKYZCFKLGBBBYCLRZCR...
<u>C.1. tecomanus</u>	
II.9.3	KZGXLVBHXTTC...
<u>C.s. suffusus</u>	
II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN
III	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKSSGGYCYAFACWCEALPDHTQVWVWPNKCT
I	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCL...
<u>T. serrulatus</u>	
III.10	KEGYLMCHEGCKLSCFIRPSGYCGREGI KKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC
II.10	KEGYLMCHEGCKLSCFIRPSGYCGREGI KKGSSGYCAWPACYCYG...
♂	KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGREGI KKGSSGYCAWPA...
III.8	KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCGYCKTHLKASSGYCAWP...
IV.6	KDGYPVEYDNCAYICWNUD...

## CARACTERIZACION BIOLÓGICA Y MECANISMO DE ACCION DE LAS TOXINAS

La letalidad de las toxinas se observa por inyección intraperitoneal en ratones albinos. Se ha verificado que para los alacranes Latino-Americanos la dosis letal media varía entre 5 y 27 microgramos por 20 gramos de peso corporal de ratón, siendo el alacrán de Nayarit (C. noxius) el alacrán con veneno más potente en México, con la mínima dosis letal media.

Hasta hace poco se pensaba que todas las toxinas de alacranes a mamíferos actuaban a nivel del canal de sodio y su acción era dependiente de voltaje (polarización) (Catterall, 1980). Se ha demostrado que ciertas toxinas de alacranes se pegan a sitios específicos de la membrana de neuroblastoma (Catterall, 1976; Couraud y col., 1978), a membranas de sinaptosomas de cerebro (Jover y col., 1978; Ray y col., 1978) y a membranas de células cardíacas de embrión de pollo (Couraud, 1980). La afinidad de estas toxinas por los sitios receptores depende del potencial de membrana, cuanto mayor es la polaridad de la membrana mayor es la afinidad (Catterall, 1976; Couraud y col., 1980; Jover y col., 1980b; Ray y col., 1978). En junio de



1981, Couraud (Couraud y col., 1981), presentó evidencias de que la toxina del alacrán de Durango (C. suffusus suffusus) se enlaza a membranas excitables despolarizadas (Jover y col., 1980a). También y de forma general, era aceptado que entre los efectos principales de las toxinas de alacrán estaba un bloqueo de la inactivación del canal de sodio, esto es, el canal de sodio sometido a la acción de las toxinas de alacrán permanece abierto por más tiempo (prolongación del potencial de acción) (Bernard y col., 1977, 1979; Coraboeuf, 1975; Watt y col., 1978 b). En otros experimentos, utilizando anticuerpos marcados con ferritina, se ha podido observar por microscopía electrónica que algunas toxinas del alacrán C. noxius se pegan a sinapsis del sistema nervioso central de la rata (Carabez y Possani, 1982). Se ha verificado también que la (s) toxina (s) del alacrán de Jalisco (C. elegans) afecta (n) la captación de aminoácidos de sinaptosomas obtenidos del sistema nervioso central del ratón (Colomer y col., 1978). Estudios más recientes (Sitges y col., en prensa) han confirmado la acción de la noxioustoxina en relación al canal de potasio de sinaptosomas de cerebro de ratón. De esta forma se ha podido demostrar que las diferencias estructurales presentes en las toxinas de alacranes condicionan una especificidad funcional.

Cada familia de toxinas actúa sobre un dado tipo de receptor, modificando de diferentes maneras su funcionamiento. El estudio bioquímico sistemático de todos los componentes del veneno de un animal puede llevar a descubrir diferencias importantes, como es el caso de la Noxiustoxina uno de los componentes menores (en proporción cercana al 1%) del veneno de *C. noxius*. Es posible que otros hallazgos importantes en el campo de la toxicología, ocurran en el futuro, como toxinas que reconozcan otros ionóforos de membranas excitables, como por ejemplo el canal de calcio.

#### EL ALACRAN DE NAYARIT

Uno de los alacranes más interesantes, por ser el más ponzoñoso citado hasta el momento es la especie *Centruroides noxius*, la descripción de la especie se debe a Hoffmann (1932).

Este alacrán habita en las lomerías y cerros del estado de Nayarit y sur de Sinaloa, es un animal de color moreno rojizo y mide entre 5 y 8 cm. de longitud. Al *C. noxius* se le considera una especie endémica, desligada

del resto de los Centruroides mexicanos, caracterizándose por una toxicidad especial de su veneno, más rápido y más intenso en su acción (Hoffmann y Vargas, 1935; Hoffmann, 1938).

#### COMPOSICION DEL VENENO

El veneno del alacrán C. noxius presenta una DL<sub>50</sub> de 0.26 mg/kg de peso corporal de ratón. Este alacrán se caracteriza por poseer el veneno de menor DL<sub>50</sub> en México.

Este veneno es estable, recupera su estructura tridimensional así como su toxicidad, después de hervirse por 5 min. (Possani y col., 1981a).

En forma particular, contiene proteínas con actividad del tipo hialuronidasa (Dent y col., 1980).

El veneno soluble se ha caracterizado por cromatografía de filtración en gel, en columnas de Sephadex G50 seguida por dos pasos de separación por intercambio iónico en diferentes sistemas de amortiguadores. Se obtienen

tres fracciones: la fracción I presenta actividad de hialuronidasa, la fracción II es tóxica para mamíferos y la fracción III se compone de péptidos de menor peso molecular no tóxicos a mamíferos.

La fracción II ó tóxica, está constituida por 14 -- toxinas, 9 de ellas específicas para mamíferos y una para crustáceos (Dent y col., 1982). Las toxinas más estudiadas son: la II.9.2.2, II.10, II.11, II.13 y II.14 (Possani y col., 1980; Dent y col., 1980; Possani y col., 1985). A la toxina II.11 se le ha denominado Noxiustoxina y su composición de aminoácidos revela la presencia de 39 a.a. Esta es la primera toxina descrita de cadena corta que afecta a mamíferos.

La Noxiustoxina cuya región N-terminal es Tre-Ile-Ile-Asn-Val. es completamente diferente a las demás toxinas descritas como se puede ver en la tabla II.

Se ha obtenido información sobre la estructura secundaria y terciaria, por técnicas de dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear (Possani y col., 1981d). Por medio de estas medidas se pudo evidenciar que la toxí-

na II.9.2.2 contiene aproximadamente 11% de estructura alfa-hélice y 22% de estructura plegada tipo beta (Watters y col., 1982).

El mecanismo de acción de algunas toxinas es como sigue:

1. Utilizando axones gigantes de calamar en experimentos de "voltaje-sostenido" se ha demostrado que en el veneno del alacrán de Nayarit (*C. noxius*) existe un componente, denominado II.10 (Carbone y col., 1982), que actúa como bloqueador específico del canal de sodio, afectando exclusivamente la entrada del sodio (influxo), en forma semejante al efecto de la tetrodotoxina. Esta es una diferencia importante con relación al veneno de los alacranes Norte-Africanos que actúan a nivel de la inactivación del canal. El efecto del componente II.10 es reversible. Esto también es una novedad.

2. Se encontró que la Noxiustoxina, componente II.11 del veneno del alacrán *C. noxius* afecta selectivamente al canal de potasio bloqueándolo de manera reversible e independiente del voltaje (Carbone y col., 1982). Esta es la primera toxina de naturaleza protéica descrita en

la literatura que bloquea de forma selectiva al canal de potasio.

3. También se ha descubierto que el componente 11.6 del mismo veneno es una potente toxina a crustáceos paralizando de forma reversible a acóviles y cangrejos (Possani y col., 1981a).

## CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

### CONSIDERACIONES GENERALES

Los métodos convencionales para la purificación de proteínas se basan generalmente en diferencias importantes existentes en relación al peso molecular o a los grupos laterales ionizables de los aminoácidos que constituyen la secuencia polipeptídica de las moléculas proteicas. Estos métodos frecuentemente son laboriosos e incompletos y su rendimiento es bajo.

Por el tiempo que se requiere para obtener componentes relativamente puros y con un insatisfactorio rendimiento, con los métodos convencionales se desarrolló un método de aislamiento llamado Cromatografía de Afinidad. El logro de esta técnica deriva de la única y específica propiedad de las macromoléculas; que es su función biológica.

Generalmente se acopla covalentemente a un soporte sólido, un análogo del sustrato de una enzima o un ligando específico de una molécula receptora.

En el campo de la Inmunología el método se relaciona con el uso de inmunoabsorbentes, introducidos como materiales químicos definidos para la separación cromatográfica de anticuerpos [Campbell y col., 1951].

La cromatografía de afinidad explota el fenómeno de la interacción de la especificidad biológica, en una gran variedad de sistemas de proteína-ligando.

Una solución que contenga a la macromolécula a ser purificada es pasada a través de una columna compuesta de un polímero insoluble o gel el cual tiene un ligando que ha sido unido covalentemente.

Las proteínas que no muestran una apreciable afinidad por el ligando pasan por la columna sin ser retenidas, mientras que las que sí lo reconocen (ligando) pueden ser retenidas en proporción a su afinidad, bajo las condiciones experimentales. La proteína específicamente adsorbida puede ser eluida alterando la composición del solvente o medio para que la disociación se efectúe.

En principio, pueden usarse adsorbentes específicos para purificar enzimas, anticuerpos, ácidos nucleí-



cos, cofactores o proteínas unidas a vitaminas, proteínas represoras, proteínas de transporte, drogas, etc.

Las ventajas inherentes de este método de purificación son la rapidez y la facilidad de hacerlo en un solo paso, la rápida separación de inhibidores o contaminantes destructivos como proteasas, y la protección a la desnaturalización durante la purificación se debe a la estabilización ligando-sitio activo de proteínas en su estado nativo.

Debe hacerse una cuidadosa planeación antes de que los procedimientos específicos sean llevados a cabo. Las más importantes consideraciones son: 1) el tipo de matriz, 2) la naturaleza del ligando, 3) las condiciones usadas para adsorber y eluir la proteína de la columna.

Las condiciones específicas para la purificación de una proteína en particular, deben ser altamente individualizadas puesto que ello refleja la única propiedad de especificidad biológica en una interacción selectiva con un ligando dado.

## SELECCION DE LA MATRIZ

La propia selección de la matriz o soporte de los ligandos tiene una gran importancia para la aplicación exitosa de la adsorción estereoespecífica. La matriz ideal debe reunir las siguientes características:

1. Insoluble.
2. Suficientemente permeable
3. Nula capacidad de adsorción.
4. Estabilidad química y mecánica en un amplio rango de pH, fuerza iónica y concentraciones de desnaturalizantes.
5. Disponibilidad de un gran número de grupos químicos capaces de ser activados para introducir ligandos y espaciadores.
6. Debe formar una malla porosa y laxa, la cual permita una entrada y salida uniforme de las macromoléculas.
7. Las partículas deben ser uniformes, esféricas y rígidas.
8. Alto grado de porosidad.
9. Resistencia al ataque microbiano.

Existen tres medios que pueden ser considerados,

potencialmente útiles en las técnicas de cromatografía de afinidad: 1) agarosa, 2) poliacrilamida y 3) lechos de vidrio de poro controlado. De estos tres, los lechos de agarosa son por mucho los más frecuentemente utilizados, por poseer todas las características deseables.

La única desventaja de la agarosa es su susceptibilidad a la contracción cuando se utilizan soluciones desnaturalizantes para la elución. Los lechos de poliacrilamida reúnen muchos de los criterios deseados. La mayoría poseen un gran número de grupos carboxamidas modificables permitiendo así la preparación de una matriz altamente sustituida. Desafortunadamente estos lechos carecen de una buena porosidad, la cual además es disminuida por su sustitución,

Un medio que puede incrementar su uso en el futuro, es el constituido por los lechos de vidrio de poro controlado. Las grandes ventajas de este medio son su estabilidad mecánica y química, la cual permite un buen flujo bajo una amplia variedad de condiciones. Los más serios problemas encontrados con los lechos de vidrio, son que como medio tienen un alto grado de adsorción no específica de proteínas y carece de un gran número de

grupos funcionales fácilmente activables. Además la sílica no es estable a pH alcalino.

La Sepharosa 4B es un derivado de la agarosa y es la que se utiliza con mayor frecuencia, por ser más porosa que el derivado 6B y tener mayor capacidad de sustitución que la 2B.

### SELECCION DEL LIGANDO

La selección del ligando a ser usado en la construcción de una columna de afinidad, requiere de cuidadosas consideraciones. Los candidatos posibles son: sustratos análogos, efectores, cofactores de enzimas y bajo ciertas circunstancias el propio sustrato de la enzima. Cuando se utiliza un sustrato, las condiciones pueden arreglarse de tal suerte que la enzima no tenga una función catalítica.

Dos criterios deben cumplirse para la selección del mejor ligando. Primero, debe hacer una fuerte interacción entre el ligando y la proteína deseada. En la práctica los ligandos con una constante de disociación de

alrededor de 5 nM en solución son pobres candidatos. Por otro lado también la alta afinidad entre el ligando y la proteína puede ser perjudicial si las condiciones requeridas para la disociación del complejo, pueden ser irreversiblemente dañinas a la proteína. Segundo, las moléculas pequeñas a ser unidas deben tener grupos funcionales que pueden ser modificados para formar el enlace covalente con el soporte o matriz. Igualmente importante es la modificación del enlace, para que no se deteriore la unión del ligando a la proteína deseada.

Por lo tanto el parámetro más importante es la efectiva afinidad observada entre el ligando insolubilizado y la proteína deseada.

#### MÉTODOS DE ACOPLAMIENTO

Los procedimientos utilizados para acoplar covalentemente el ligando al soporte involucran dos pasos:

- 1) activación de los grupos funcionales de la matriz y
- 2) acoplamiento del ligando a estos grupos activados.

Las reacciones químicas utilizadas para llevar a

cabo estos enlaces, deben ser moderadas, para ser toleradas por ambos, ligando y matriz.

Después del acoplamiento el soporte debe ser exhaustivamente lavado para remover cualquier remanente del ligando no pegado y la cantidad de ligando unido debe ser determinada. Esta determinación generalmente se expresa en términos de capacidad por mililitro de matriz hidratada, en vez de expresarse en términos de su peso seco.

Existen un gran número de métodos para unir ligandos a soportes insolubles. Uno de los más ampliamente usados es el proceso de activación con bromuro de cianógeno.

La mayoría de los métodos para inmovilizar proteínas se basan en el acoplamiento de los grupos amino.

#### ACOPLAMIENTO CON BROMURO DE CIANOGENO

El bromuro de cianógeno en solución alcalina puede formar cianamidas con aminas. Polímeros sólidos con-

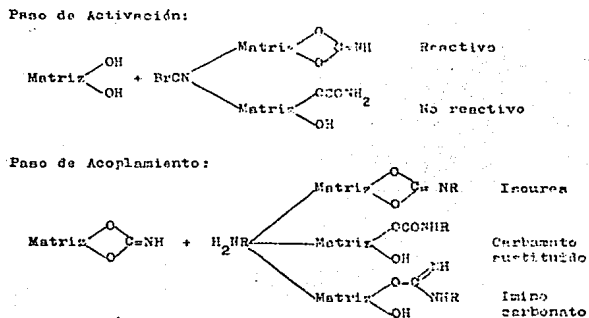
teniendo grupos aminos pueden por lo tanto ser activados con bromuro de cianógeno, puesto que los grupos cianamidas pueden ser utilizados como intermediarios para acoplamiento con amins, las cuales reaccionan para formar guanidinas sustituidas.

Al utilizar bromuro de cianógeno en este modo, se encontró que los polímeros hidroxílicos por sí mismos pueden ser activados y que los polímeros reactivos contienen grupos éster imino carbonados (Axén y col., 1967; Porath, 1968).

Los grupos diol 1,2 son especialmente propensos a reaccionar con haluros de cianógeno para formar imino carbonados cíclicos.

En el paso de acoplamiento una sustancia conteniendo grupos amino puede formar cualquiera de estos tres productos, probablemente a través del isocianato, como un intermediario inestable. Estos incluyen el derivado imino carbonato, carbamato sustituido e isourea (Fig. 1).

Las especies reactivas formadas en el paso de activación tienen diferentes grados de estabilidad.



**Fig. 1** Método de Activación por Bromuro de Cianógeno

## CONDICIONES DE ADSORCIÓN Y ELUCIÓN DE LAS PROTEINAS

Las condiciones específicas para la adsorción se dan dependiendo de las propiedades específicas de la proteína a ser purificada.

La bioespecificidad en la cromatografía de afinidad es realizada frecuentemente en dos pasos: 1) adsorción por contacto de la muestra con el adsorbente en un medio adecuado y 2) desadsorción en un solo paso por cam



bio del medio.

La desadsorción puede llevarse a cabo por competencia con sustratos o análogos del ligando de la matriz sólida, por la alteración del pH, fuerza iónica, agentes desnaturalizantes como urea o cloruro de guanidina. La proteína eluída puede ser neutralizada, diluída o dializada para permitir su pronta recunstitución a su forma nativa.

Debido a las condiciones no ideales de adsorción y de desadsorción bajo estas circunstancias, la separación incompleta de contaminantes es probable que suceda. Puede obtenerse una mejor separación utilizando un gradiente de elución.

La elución completa de sustratos, inhibidores o efectores, pueden ser generalmente afectadas por cambios en el pH o por la concentración de sal. Sin embargo en el caso de la inmuoadsorción el pegado del antígeno al anticuerpo puede ser tan fuerte que en ocasiones es necesario establecer condiciones drásticas de elución.

Los iones caotropicos tales como el tricloraacetato o perclorato pueden ser probados.

Al disminuir la polaridad del solvente, por ejemplo con glicerol, puede tenerse un efecto beneficioso, cuando el enlace hidrofóbico contribuye significativamente a la formación del complejo.

La selectividad en la purificación puede ser incrementada mediante el uso de sustratos o análogos del ligando, tanto para la adsorción como para la desadsorción. La desadsorción puede efectuarse añadiendo en el eluyente especies que compitan por el ligando.

#### INMUNOADSORBENTES

Un adsorbente específico para cualquier enzima o proteína, es un anticuerpo levantado contra esa proteína y unido a una matriz insoluble. Los anticuerpos son altamente específicos y tienen una muy alta afinidad por las proteínas contra las que fueron levantados. Consecuentemente una existosa columna de anticuerpo tiene características que son generalmente más selectivas que otras clases de adsorbentes de afinidad, los inmunoadsorbentes son tipos especializados de los adsorbentes bioespecíficos.

Debido a que el levantamiento de anticuerpos es un proceso complejo, las columnas de inmunoabsorbentes, no han sido ampliamente utilizadas aún. Pero la nueva técnica de producción de anticuerpos monoclonales puede revolucionar este aspecto de purificación de proteínas.

A continuación se describen las técnicas y problemas asociados con los anticuerpos policlonales convencionales, enseguida y en términos generales se describen los pasos en los cuales la mayoría de estos problemas pueden ser resueltos.

#### Principios básicos:

1. Purificación de la proteína (antígeno), por técnicas convencionales, utilizando una especie diferente del animal a inmunizar.
2. Levantamiento de anticuerpos contra la proteína (antígeno), usando técnicas convencionales de inmunización.
3. Purificación parcial del anticuerpo por precipitación con sulfato de amonio.

4. Acoplamiento del anticuerpo al adsorbente, por ejemplo, con bromuro de cianógeno a una Sepharosa activa da.

5. Aplicación de una muestra cruda o parcialmente pu rificada conteniendo la proteína (contra la que se levan taron los anticuerpos, a través de una columna de anti-cuerpo. Lavado de la columna.

6. Elución de la columna.

Los pasos más difíciles son generalmente el 1 y el 6. Podemos asumir que el paso 1, ha sido efectuado al menos hasta una purificación parcial. Desde 50  $\mu$ g de pro teína pura, son suficientes para levantar buenos anticuerpos. Pero se debe tomar en cuenta que algunas proteínas son más antigénicas que otras. Existen varias técnicas para hacer que una proteína débilmente antigénica, pueda inducir una buena formación de anticuerpos.

El paso final, la elución de la columna, se ha visto que es el paso más crítico en todo el proceso.

Característicamente las interacciones antígeno-

anticuerpo tienen constantes de disociación del orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  M. El reducir la interacción específica no es simple. Aunque las inmunoglobulinas son moléculas muy estables y pueden soportar muchas condiciones extremas suficientes para romper interacciones específicas, no se puede decir lo mismo de la proteína que está siendo eluida. De modo que un pH de 2-3 desplazará al antígeno, dejando al anticuerpo activo en la columna, capaz de ser reutilizado.

Algo similar sucede con altas concentraciones de urea o solventes orgánicos para minimizar los enlaces de hidrógeno y las fuerzas hidrofóbicas respectivamente. Altas concentraciones de sales pueden tener éxito si la interacción parece ser principalmente electrostática, pero contrariamente fortalecerá cualquier enlace hidrofóbico. Las sales caotrópicas tales como tiocianato, bromuro de litio, cloruro de magnesio y los amortiguadores deformantes, tales como el citrato de imidazol han sido usados con algún éxito, pero de nuevo la concentración necesaria puede causar la desnaturalización de la proteína una vez eluida.

## ANTICUERPOS MONOCLONALES VS ANTICUERPOS POLICLONALES

Cuando se trabaja con anticuerpos policlonaes se tienen ciertas desventajas como: 1) Para la producción convencional de anticuerpos policlonaes, el inmúngeno debe estar altamente purificado y aún de esta manera es común encontrar anticuerpos levantados contra ciertos contaminantes, 2) La fracción de inmunoglobulinas de un antisuero policlonaal es heterogénea; los inmún-genos que inducen la producción de una población de anticuerpos contienen subpoblaciones de anticuerpos que reconocen diferentes porciones del inmúngeno y (o) la misma porción del inmúngeno pero con diferentes afinidades, 3) las reacciones cruzadas y reacciones no específicas están frecuentemente asociadas a los antisueros policlonaes.

Estos problemas que se encuentran cuando se utilizan anticuerpos policlonaes pueden ser evitados con la nueva tecnología de producción de anticuerpos monoclonales (Dale y col., 1981).

Las ventajas sobre los anticuerpos policlonaes para sintetizar inmunoabsorbentes son:

1) La preparación de la proteína a utilizar, no tiene que estar pura, aquí el 1% de pureza puede ser suficiente.

2) Como generalmente se utilizan ratones, se requiere de una cantidad de antígeno muy pequeña, un total de 50  $\mu$ g puede ser suficiente.

3) Muchas diferentes clonas de tipos de anticuerpos contra la proteína deseada pueden ser encontradas y dirigidas contra diferentes determinantes antigénicos.

4) Una vez que se encuentra una clona conveniente se almacena en nitrógeno líquido, proporcionando una fuente indefinida del anticuerpo obtenido, aquí la fuente no se termina cuando el animal muere.

5) Como el anticuerpo monoclonal es puro, todas las inmunoglobulinas acopladas al adsorbente son específicas a la proteína deseada, la capacidad del inmunoadsorbente es generalmente al menos 10 veces mayor.

## ANTICUERPOS MONOCLONALES

La derivación de las líneas celulares capaces de producir permanentemente anticuerpos específicos contra un inmunógeno predefinido fue descrito en 1975 (Köhler y Milstein, 1975). Este método se basó en la fusión entre células de mieloma y células de bazo de animales previamente inmunizados. Las células de bazo mueren en un corto tiempo, bajo condiciones ordinarias de cultivo de tejidos. Las células del mieloma están adaptadas a crecer permanentemente en cultivo. De aquí fueron aisladas mutantes que carecían de enzimas como la hipoxantina guanina ribosiltransferasa (azoguanidina-resistente) o timidina cinasa (bromodesoxiuridina-resistente). Tales mutantes pueden crecer en medio conteniendo aminopterina y suplementado con hipoxantina y timidina (medio HAT), por lo que ellas son incapaces de utilizar el medio silvestre. Híbridos entre tales células y células de bazo pueden ser seleccionados de los componentes parentales como simples células que se multiplican activamente en un medio selectivo HAT.

Del crecimiento de los híbridos, clonas individuales pueden ser seleccionadas, que secreten los anti-



cuerpos deseados. Tales anticuerpos son además de origen monoclonal. Las clonas seleccionadas, como líneas ordinarias de mieloma, pueden ser mantenidas indefinidamente. (Fig. 2)

La metodología básica ha sido usada para preparar anticuerpos contra una gran variedad de antígenos. Estos incluyen anticuerpos a haptenos, pequeños productos naturales con actividad biológica, tales como neuropéptidos y péptidos hormonales, enzimas y otras proteínas, polisacáridos, etc.

Los resultados justifican la idea de que la producción de cualquier anticuerpo sintetizado por animales inmunizados, pueden ser inmortalizados por métodos de fusión celular.

La derivación de líneas permanentes de células híbridas produciendo anticuerpos monoclonales, exhiben ciertas propiedades deseadas. Las propiedades deseadas incluyen no sólo el reconocimiento de un antígeno; otras propiedades no menos críticas, son la fina especificidad del anticuerpo, avidéz y parámetros cinéticos importantes para radioinmunoensayos, propiedades citotóxicas ne-

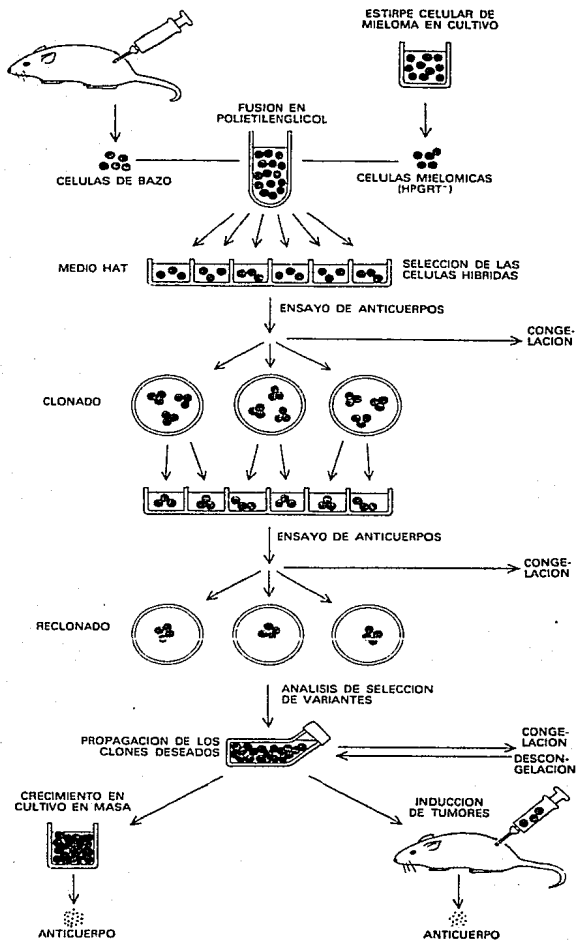


Fig. 2 Método para la obtención de Anticuerpos Monoclonales.

cesarias para dirigir la lisis dependiente de complemento, etc.

Estas células híbridas pueden manipularse mediante las técnicas aplicables a los cultivos permanentes de células animales. Cada célula híbrida puede clonarse, y cada clona produce grandes cantidades de anticuerpo específico para un solo determinante antigénico. A su vez los clones pueden conservarse indefinidamente y en cualquier momento pueden tomarse muestras de ellos para hacer cultivo o inyectarse en animales a fin de obtener anticuerpos monoclonales a gran escala. Los anticuerpos altamente específicos producidos por este método general han resultado ser herramientas de notable versatilidad en muchas áreas de la investigación biológica y la clínica médica.

#### APLICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La técnica original desarrollada por Köhler y Milstein en 1975, para la biosíntesis de anticuerpos monoclonales ha sido grandemente extendida durante los últimos años y un enorme número de anticuerpos monoclonales murí-

nos han sido preparados. Es ahora posible preparar anticuerpos monoclonales los cuales pueden estar dirigidos a diferentes sitios antigénicos, uniéndose a ellos con diferentes constantes de unión.

No es de asombrarse que el uso de anticuerpos monoclonales se haya expandido rápidamente en diagnóstico como en la cromatografía de afinidad.

Lerner describió este notable hallazgo, que cadenas cortas de aminoácidos sintetizados en el laboratorio puedan mimetizar un sitio sobre la superficie de una proteína viral y pueda entonces levantar anticuerpos de especificidad predeterminada que confieren inmunidad contra el virus.

Puesto que péptidos de bajo peso molecular sintéticos o nativos pueden adoptar diferentes estructuras conformacionales en solución, es un tanto sorprendente entender que tales péptidos puedan inducir la formación de anticuerpos a segmentos de proteínas, las cuales poseen una cierta movilidad dentro de la estructura tridimensional de la proteína.

## MATERIAL

### Fuente del veneno

Se colectaron aproximadamente 10 000 alacranes vivos, Centruroides noxius, en la población de Pantanal, Nayarit a 10 km. de la ciudad de Tepic. Los cuales fueron determinados por el Profesor Juliá.

Los alacranes fueron anestesiados con bióxido de carbono y el veneno se les extrajo por estimulación eléctrica del telson, colectándose en cajas de Petri.

Se recuperó el veneno con agua bidestilada, se centrifugó a 18 000 x g por 10 min y el sobrenadante se liofilizó y se congeló hasta su uso.

### Fuente del material

Las resinas cromatográficas provinieron de Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia (Sephadex G-50 medio y Sephadex G-10 fino), de Whatman Inc., Clifton, New Jersey (Carboximetil-celulosa y Dietilaminoetil-celulosa),

Affi-gel G-10 de Bio Rad Laboratories, Richmond, California.

El Bromuro de Cianógeno fue de E. Merck, Darmstadt, Alemania.

El Plasma equino antialacrán fue donado por el Instituto Nacional de Higiene.

Los sueros anticlase de inmunoglobulinas fueron de Laboratorios Meloy, U.S.A.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

## MÉTODOS

### 1) PURIFICACION DE LA NTX

#### Métodos cromatográficos:

Para las cromatografías de Filtración en gel se utilizaron dos tipos de resinas: Sephadex G-50 medio y Sephadex G-10 fino. Estas resinas se prepararon de acuerdo a las instrucciones de las compañías proveedoras. Los detalles cromatográficos se dan en la sección de resultados.

Para la cromatografía de Intercambio iónico se utilizó una resina catiónica de Carbocimetil-celulosa.

Esta resina se preparó de la siguiente manera:

1) Se pesaron 5 grs. de resina y se puso a hidratar en 100 ml. de una solución 1 M de NaOH (hidróxido de sodio) de 2 a 3 min.; 2) se colocó la resina en un filtro Büchner con papel Whatman #1; 3) se removió el NaOH por succión; 4) se lavó la resina con 150 ml. de agua bidestilada; 5) se volvió a resuspender en 100 ml.

de una solución 1 M de HCl (ácido clorhídrico) de 2 a 3 min.; 6) pasado este tiempo se vuelve a lavar con agua bidestilada; 7) la resina se vierte en el amortiguador de elución y se le remueven las partículas finas por succión. Las condiciones cromatográficas se especifican en la sección de resultados.

#### Electroforesis:

Para verificar la homogeneidad de las fracciones purificadas se montó una electroforesis en geles cilíndricos de acrilamida en el sistema  $\beta$  alanina-urea (Reisfield y col., 1962).

#### Cuantificación de Proteína:

Para propósitos cromatográficos la concentración de proteína se midió espectrofotométricamente, es decir, que la concentración de proteína se midió en base a la absorbencia a 280 nm. Por análisis de aminoácidos de la NTX pura se determinó el coeficiente de absorbencia de la NTX a 280 nm. De esta forma, 1.14 unidades de absorbencia a 280 nm. es una cubeta de cuarzo de 1 cm. de camino óptico es igual a 1 mg/ml de NTX.



## Análisis de Aminoácidos:

La composición de aminoácidos de las proteínas purificadas en este trabajo, fue determinada en la Unidad de Análisis de Aminoácidos y Estructura de Proteínas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

La composición de aminoácidos se determinó en un analizador automático Durrum-D500 en donde las muestras son sometidas a una hidrólisis ácida con HCl (ácido clorhídrico) por 24 ó 48 horas, siguiendo el método de Stanford Moore (Moore, 1963).

## 2) PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-NTX

### 2.1 Purificación de anticuerpos policlonales anti-NTX:

La purificación de estos anticuerpos se llevó a cabo por medio de una cromatografía de afinidad. La cual se sintetizó acoplando NTX a Sepharosa 4B por el método de bromuro de cianógeno (Porath, 1968),

La técnica que se utilizó en este trabajo consis-

te en lo siguiente: 1) se diluyen 30 ml de Sepharosa 4B en igual volumen de agua destilada; 2) se agregan 2.3 grs. de bromuro de cianógeno agitando y manteniendo el pH cercano a 11 con NaOH 4 N; 3) una vez estable el pH se lava la resina por filtración en un embudo Millipore rápidamente, con un amortiguador de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.0; 4) a la resina todavía húmeda se le agrega la proteína (NTX 400 µg) la cual se encuentra re-suspendida en el amortiguador de lavado; esto se deja agitando lentamente por 4 horas a temperatura ambiente y después toda la noche a 4°C; 5) se toma una alícuota del sobrenadante para determinar la cantidad de proteína acoplada a la resina; 6) se monta la columna y se lava con una solución 1 M de NaCl; 7) después se equilibra con los amortiguadores de corrida. La resina se puede almacenar a 4°C con azida de sodio al 0.02%.

#### Purificación de anticuerpos anti-NTX del Plasma equino antialacrán.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas se purificaron del plasma de caballos inmunizados con toxinas de alacrán. Este plasma se centrifugó a 5 000 rpm por 15 min. para separar la fibrina.

Se hicieron alícuotas de 50 ml y se congelaron para su uso posterior.

Una alícuota de 50 ml de plasma se diluyó en igual volumen de amortiguador de Tris-HCl 0,1 M pH 7,95 para tener una concentración final de 50 mM del mismo amortiguador. Se aplicó a la columna de afinidad Sepharosa 4B-NTX y se lavó con el amortiguador de corrida Tris-HCl 50mM pH 7.95. Para eluir a las inmunoglobulinas se aplicó ácido acético 0,1 M. Con la finalidad de neutralizar el ácido acético se añadieron previamente 200  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M pH 7.95 a cada tubo de ensayo, en los cuales se iban a coleccionar las inmunoglobulinas eluidas de la columna.

#### Cuantificación de Inmunoglobulinas purificadas:

Se determinó la concentración de inmunoglobulinas por medio de su densidad óptica a 280 nm asumiendo que  $1 \text{ A} \frac{1 \text{ cm.}}{280 \text{ nm}} = 1,4 \text{ mg/ml}$ ,

#### Electroforesis:

Para verificar la homogeneidad de las inmunoglo-

bulinas purificadas, se montó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% en SDS y en condiciones reductoras (Laemmli, 1970).

#### Ensayo Inmunoenzimático:

Las inmunoglobulinas se titularon por el método de ELISA (ver esquema de la fig. 3).

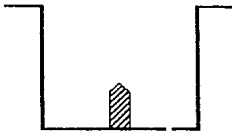
El método consiste en:

1) Se utilizan placas de polivinilo de 96 pozos. Se incuban 100  $\mu$ l/pozo de la fracción II.11 a una concentración de 0.3  $\mu$ g/ml en un amortiguador de bicarbonato de sodio 20 mM pH 9,2, toda la noche a 4° C.

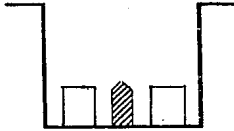
2) Se quita la fracción II.11 y se agregan 150  $\mu$ l/pozo de una solución de albúmina bovina al 1% en PBS y se deja de 3 a 4 horas a temperatura ambiente.

3) Se lava la placa cinco veces, con una solución de PBS, Tween 20 0.05%.

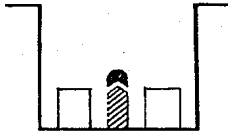
4) Se colocan las inmunoglobulinas a diferentes



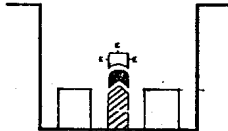
1.- Antígeno adsorbido a la fase sólida



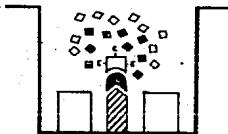
2.- Proteína adsorbida a los sitios no ocupados por el antígeno



3.- Unión del anticuerpo presente en la muestra con el antígeno.



4.- Adición de un segundo anticuerpo acoplado con una enzima.



5.- Adición del sustrato.

Fig. 3 Fundamento del método de ELISA para la detección de anticuerpos.

concentraciones (10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 µg/ml.) en PBS, Tween 20 0.05%, 3% de albúmina bovina. Esto se deja toda la noche a 4° C.

5) Se lava la placa cinco veces con la solución antes mencionada.

6) Se agrega el segundo anticuerpo, en este caso se utilizó Protelna A de Staphylococcus aureus acoplada a Peroxidasa, en una dilución de 1:10, en una solución de PBS, Tween 20 0.05%, 3% de albúmina bovina y se deja de 3 a 4 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.

7) Se lava la placa cinco veces.

8) Se revela la placa con una solución de Orto-fenil endiamina (0.4 mg/ml) más una solución de Hidroperoxil de urea (0.2 mg/ml) y se deja por 10 min. en la oscuridad.

9) Se para la reacción con HCl 6 N.

10) Se lee la placa en un lector de ELISA a 490 nm.

## Método de Inmunodifusión Doble de Ouchterlony

Se montó la técnica de Inmunodifusión para probar las inmunoglobulinas purificadas contra veneno total, fracción II y fracción II.11.

Además también para llevar a cabo la determinación de clase de los anticuerpos monoclonales.

El método consiste en:

1) Preparación de las láminas para inmunodifusión. - Las láminas se preparan por medio de dos soluciones:

Solución A: Esta consiste en disolver 0.2 grs. de agar (Noble de DIFCO) en 50 ml. de agua destilada en ebullición a esta solución se le agregan 75  $\mu$ l de glicerol.

Solución B: se disuelven 1 gr. de NaCl, 1 gr. de agar y 3 grs. de Polietilenglicol (PM 6000) en 98 ml. de agua destilada en ebullición, después se le disminuye la temperatura a 45°C y se agrega azida de sodio 0.1% concentración final.

A portaobjetos limpios se les pone solución A para formar una capa muy delgada, se deja solidificar. Después se le agrega a estos mismos portaobjetos solución B a formar una capa de + 2 mm. de espesor se deja solidificar y se conservan a 4°C en atmósfera húmeda.

Para teñir las láminas de inmunodifusión, se colocan en PBs pH 7.8 por 24 horas después se sacan y se les coloca papel filtro sobre el agar y se ponen a secar en una estufa a 37°C, posteriormente se enjuagan con agua destilada y se colocan en el colorante por 2 horas (Amido Black). Se decoloran con ácido acético al 2% el tiempo necesario.

## 2.2 Purificación de Anticuerpos Monoclonales anti-NTX:

La obtención de estos anticuerpos se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Pascal Heriön del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M.

Se obtuvieron seis clones a las que se les dio el nombre de BNTX 4, BNTX 12, BNTX 14, BNTX 16, BNTX 18



y BNTX 21.

Una vez probados los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas y expandidas las clonas, se prepararon seis poblaciones de ratones de la cepa Balb/c de 30 grs. de peso y de ocho semanas de nacidos aproximadamente.

Se les inyectó intraperitoneal 200  $\mu$ l de Pristán un mes antes de inocularles  $\approx 10^6$  células de cada una de las clonas obtenidas; esto se hizo para la producción de un líquido de Ascitis. Cuando los ratones presentaron síntomas de tumor, se cosechó el líquido ascítico por punción en el abdomen, recolectándolo en un tubo de ensayo y dejándolo una hora a temperatura ambiente para que se formara el coágulo de fibrina.

Después de transcurrido este tiempo los tubos se centrifugaron a 830 x g. por 10 min. y se guardaron los sobrenadantes a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se repitió la operación cada tercer día hasta la muerte del animal.

#### Electroforesis:

Se montó una electroforesis en gel de poliacrilamida en Tris-glicina pH 8.9 sin gel concentrador, con la

finalidad de poder detectar los anticuerpos monoclonales de las muestras de líquido de ascitis y poder compararlos de acuerdo a su concentración.

Purificación de anticuerpos monoclonales a partir de líquido de ascitis.

1) El líquido de ascitis se ultracentrifugó a 50 000 x g. durante 30 min. Este paso se efectuó para la eliminación de los lípidos presentes en el líquido ascítico.

2) La muestra una vez libre de lípidos se diluyó cuatro veces con PBS frío. Todo el proceso de purificación se lleva a cabo a 4°C.

3) A esta solución se le agregó un volumen igual de una solución de sulfato de amonio saturada y se dejó con agitación constante por 1 hora.

4) La muestra se centrifugó a 5 000 x g. por 10 min.

5) Se deshechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en un volumen de 10 ml. de un amortigua-

don de Tris-HCl 20 mM pH 7,8 con 20 mM de NaCl. Se le hicieron dos cambios de amortiguador el primero de cuatro horas y el segundo de toda la noche.

7) La muestra de la diálisis se centrifugó a 15 000 x g. por 10 min.

8) Se tomó el sobrenadante y se leyó su densidad óptica para determinar la concentración de proteína.

#### Cromatografía de Intercambio Iónico en DEAE-celulosa:

Para esta cromatografía se utilizó una resina aniónica de Dietilaminoetil-celulosa. Esta resina se preparó de igual manera que la de carboximetil-celulosa, con la única diferencia de que primero se pone en HCl 1 M y después en el NaOH 1 M. Las condiciones cromatográficas de especifican en la sección de resultados.

#### Electroforesis:

Se montó una electroforesis en gel de poliacrilamida en Tris-glicina pH 8.9, para verificar la pureza de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en las mismas condiciones para las seis clonas de anticuerpos monoclonales.

#### Determinación de Clase.

Por medio de la técnica de inmunodifusión se determinó la clase de los anticuerpos monoclonales.

Se utilizaron sueros anticlase: anti-IgG, anti-IgG<sub>1</sub>, anti-IgG<sub>2</sub>, anti-IgG<sub>2a</sub>, anti-IgG<sub>2b</sub>, anti-IgA y anti-IgM.

Estos sueros se diluyeron en un volumen equivalente de suero de caballo-fetal bovino (75:25). Se dejaron a temperatura ambiente por 3 horas, se centrifugaron 15 min. a 830 x g y se guardaron los sobrenadantes.

Para llevar a cabo la inmunodifusión se usó medio de cultivo con anticuerpos concentrados. Esto se consigue liofilizando 1 ml. de muestra y resuspendiendo en 140  $\mu$ l de agua destilada. Se colocaron 10  $\mu$ l de cada una de las muestras en los pozos de las placas de inmunodifusión contra 10  $\mu$ l de cada uno de los sueros anticlase.

### 3) INMUNOADSORBENTES

#### 3.1 Inmunoadsorbente con Ab. policlonal: Sepharosa 4B-Ig.

Las inmunoglobulinas purificadas por medio de la columna de afinidad Sepharosa 4B-NTX, fueron acopladas a Sepharosa 4B por el método de bromuro de cianógeno (descrito anteriormente). Se acoplaron 16.8 mg. de inmunoglobulinas.

##### 3.1.1 Purificación de la NTX a partir de Fracción II.

Se aplicaron 30 mg. de fracción II del veneno de Centruroides noxius a la columna de afinidad Sepharosa 4B-Ig y se lavó con un amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 7.3.

Para eluir la proteína se aplicó un amortiguador de glicina-HCl 50 mM pH 2.9, para neutralizar el pH del amortiguador de elución se añadieron previamente 200  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M pH 7.3 a cada tubo de ensayo en los cuales se iban a coleccionar la NTX eluida de la columna.

El pico eluido de esta cromatografía, se liofilizó y se resuspendió en 1 ml. de agua tetradestilada y se aplicó a una columna de Sephadex G-10 de dimensiones 0.9 x 65 cms. con la finalidad de eliminar la glicina de la muestra.

Del tubo que contenía al pico de proteína, se corrió una electroforesis en geles de acrilamida en acetato-urea, para verificar su homogeneidad,

Del mismo tubo se probó toxicidad en ratones de la cepa CD1 de 20 grs. de peso. Se inyectaron 200  $\mu$ l aproximadamente 38.2  $\mu$ g de proteína.

Del mismo tubo se tomaron 12.4  $\mu$ g de proteína para un análisis de aminoácidos.

### 3.2 Inmunoadsorbente con Ab. monoclonal: Affi-gel-Ab. monoclonal BNTX 4

De los anticuerpos monoclonales purificados como ya se describió anteriormente, se tomaron 27.4  $\mu$ g. de anticuerpo monoclonal puro de la clona BNTX 4 y se acoplaron a 5 ml. de Affi-gel G-10.

El método se describe a continuación:

1) Se toma el volumen deseado de Affi-gel G-10 (5 ml.) y se coloca en un filtro Büchner, se lava con tres volúmenes de resina, primero con isopropanol y después con agua destilada fría.

2) La resina filtrada húmeda se transfiere al vial donde se encuentra el anticuerpo monoclonal diluido en un amortiguador de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.0.

3) Esto se deja agitando por 1 hora a T.A. ó 4 horas a 4°C.

4) Después se le agrega 1 ml, de una solución de glicina-mida-HCl 1 M pH 8.0 y se deja toda la noche.

5) Se monta la columna y se lava con una solución de NaCl 1 M (uno o dos volúmenes de columna), después se equilibra con los amortiguadores de corrida.

### 3.2.2 Purificación de la NTX a partir de veneno total.

Se aplicaron 60 mg. de veneno total de Centruroides noxius a la columna de afinidad Affi-gel-ab. monoclonal BNTX 4; se lavó con un amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 7.8 y se eluyó la proteína con ácido acético 0.1 M; se neutralizaron los tubos con Tris-HCl 1 M pH 7.8.

Se corrió una electroforesis en gel de acrilamida en acetato-urea, del tubo que contenía el pico de los eluidos.

De este mismo tubo se probó toxicidad inyectando a un ratón con 300  $\mu$ l.

Recromatografía en una columna de Intercambio Iónico en CM-celulosa.

El pico eluido con ácido acético 0.1 M, se recromatografió en una columna de carboximetil-celulosa de dimensiones 0.9 x 27 cm., en un amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 6.0 y con un gradiente de 0 a 0.5 M de NaCl.



De esta recromatografía se tomaron muestras de los picos principales del cromatograma, para una electroforesis en geles de acrilamida en acetato-urea.

De estos mismos picos se probó toxicidad y se separaron muestras para análisis de aminoácidos.

## RESULTADOS

### PURIFICACION DE LA NTX

*Si bien que la estrategia original para la purificación de la NTX ya habia sido publicada anteriormente (Possani y col., 1981a), para la realización de esta tesis se repitió el procedimiento obteniéndose los siguientes resultados confirmatorios.*

*Del veneno soluble cromatografiado en Sephadex G-50 se obtuvieron tres fracciones, de las cuales la fracción II es tóxica. Esta fracción al ser cromatografiada en una columna de intercambio iónico de CM-celulosa, se separó en 14 subfracciones de las cuales la fracción II.11 es la que nos interesa (Fig. 4a y b).*

*Al recromatografiar la fracción II.11 en CM-celulosa se obtuvo a la NTX (noxiustoxina), la cual mostró una sola banda en geles de acrilamida en acetato-urea.*

*Esta toxina migra con el colorante indicador de la movilidad electroforética. El análisis de aminoácidos corroboró la composición de esta toxina. Los rendi-*

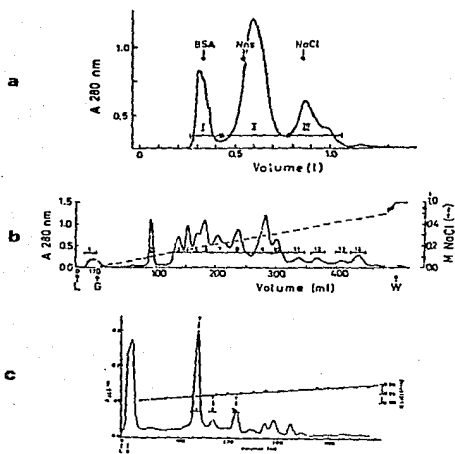


Fig.4.- Perfil Cromatográfico de veneno del alacrán *Centruroides noxius*. a) Columna de Sephadex G-50 (2.9 x 170 cm) a la cual se le aplicó 500 mg de veneno soluble. La columna fue eluida con amortiguador de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 a un flujo de 50 ml/hr (tubos de 10 ml). Tres fracciones (I, II y III) correspondientes a 17%, 63% y 20% respectivamente fueron colectadas. BSA y Nns corresponden a la posición de elución de marcadores de pesos moleculares, albúmina bovina (66 200) y alfa toxina de *Naja naja siamensis* (8000) b) La fracción tóxica fue recromatografiada en una columna de Carboximetilcelulosa (0.9 x 27cm). Se aplicó 95 mg de fracción II en el mismo amortiguador de (a), y la elución se hizo con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M. Fracciones de 14 fueron colectadas a un flujo de 30 ml/hr. Se obtuvieron 14 fracciones, de las cuales de la 9 a la 14 son tóxicas a mamíferos y la 6 es tóxica a crustáceos. c) La fracción II.11 fue recromatografiada en una columna de carboximetilcelulosa (0.9 x 27cm). Se aplicó 14.2 mg de la fracción II.11 en un amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 6.0 y la elución se hizo de 0 a 0.38 M. L= cargado del material, G= inicio del gradiente, W= lavado con 1 M de NaCl.

mientos de las cromatografías de la figura 4, fueron los esperados (Possani y col., 1981a) esto es, cerca del 1% del veneno total corresponde a la NTX.

Una vez obtenida la NTX pura se diseñaron dos líneas de experimentación, la primera consistió en la síntesis de una columna de afinidad para la purificación de anticuerpos policlonales anti-NTX y la otra un esquema de inmunización de ratones para la obtención de anticuerpos monoclonales.

Con los anticuerpos anti-NTX obtenidos de los dos procedimientos anteriores se planteó la posibilidad de la síntesis de inmunoadsorbentes para la purificación directa de la NTX a partir de fracción II y veneno total.

A continuación se describen los resultados alcanzados hasta el momento.

#### PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-NTX

##### a) Purificación de Ab. policlonales anti-NTX.

Con la columna de afinidad Sepharosa 4B-NTX sin

tizada como se mencionó en materiales y métodos se realizaron los siguientes experimentos:

1) Se purificaron en tres corridas un total de 26.8 mg. de inmunoglobulinas del plasma de caballo poli valente (Fig. 5).

2) Se verificó su corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 12.5% en SDS y en condiciones reductoras (Fig. 6).

3) Estos anticuerpos se titularon por el método de ELISA dando positivo a partir de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  a 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 7).

4) También se probaron por inmunodifusión. Sin embargo en las condiciones experimentales no se observaron anticuerpos precipitantes (Fig. 8).

#### b) Purificación de Ab. monoclonales anti-NTX

Como se mencionó en materiales y métodos obtuvimos en colaboración con el Dr. Pascal Heriön seis clones de hibridomas positivos en contra de la NTX.

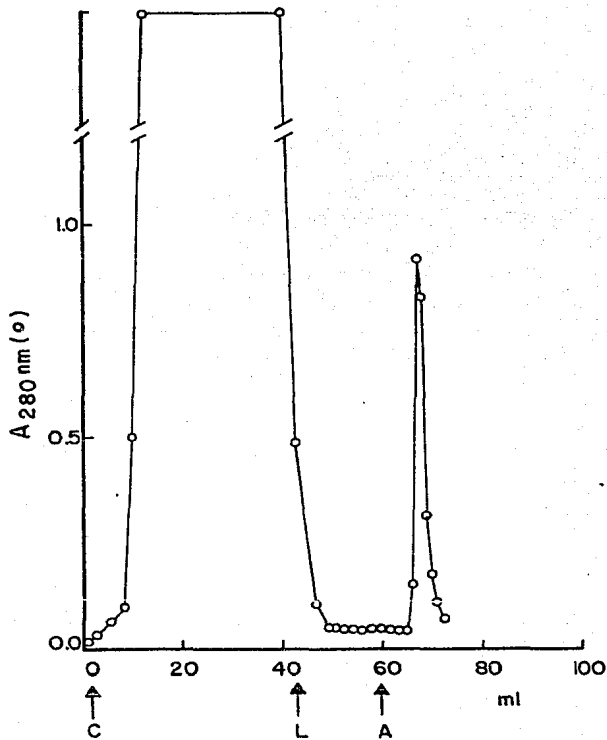


Fig. 5.- Purificación de Ig de caballo anti-NTX, por cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-NTX. En una columna de dimensiones 2.0 x 9 cm. Se aplicaron 50 ml de Plasma antialacrán (S.S.A.). Se lavó la columna con Tris-HCl 50 mM pH 7.95 a un flujo de 30 ml/hr. Se eluyó con ácido acético 0.1 M. Las fracciones eluidas se neutralizaron con Tris-HCl 1 M pH 7.95. Las inmunoglobulinas obtenidas con ácido acético 0.1 M corresponde a cerca de 0.17% de la proteína en el plasma antialacrán. C= aplicación de la muestra, L= lavado, A= elución con ácido acético.

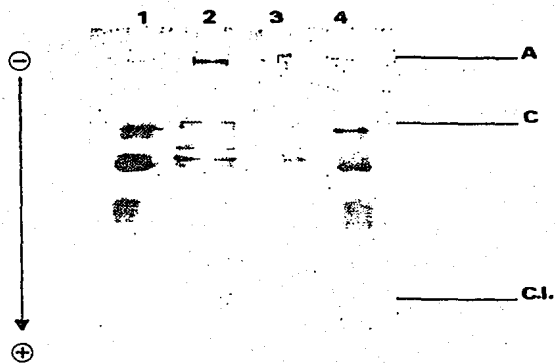


Fig. 6.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (12.5%) en SDS y en presencia de mercaptoetanol (Laemmli, 1970). Carril 1.- Inmunoglobulinas de caballo(SIGMA) 10 $\mu$ g, Carril 2.- Inmunoglobulinas purificadas con Seph.4B-NEX (26.6 $\mu$ g), Carril3.- Inmunoglobulinas purificadas con Seph.4B-NEX (13.3 $\mu$ g), Carril 4.- Inmunoglobulinas de caballo (SIGMA) 10 $\mu$ g. La protefina migró hacia el polo positivo. A= punto de aplicación, C= gel de corrimiento, C.I.=colorante indicador.

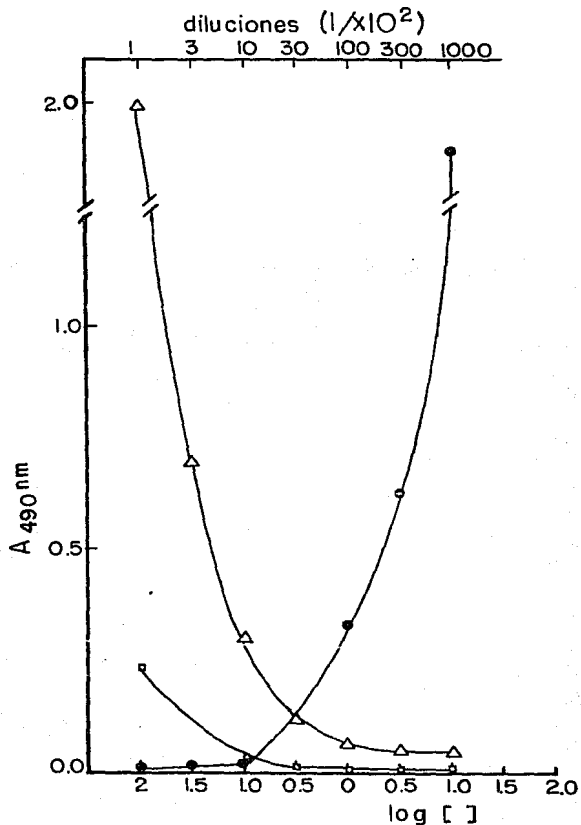
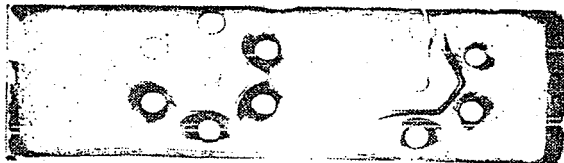


Fig. 7.- Titulación de Ig anti-NTX por el método de ELISA. Se utilizaron concentraciones de Ig (●) 10,3,1,0.3,0.1,0.03, 0.01 y 0  $\mu$ g/ml. Como antígeno se usó fracción II.11 a una concentración de 0.3  $\mu$ g/ml. Como segundo anticuerpo se utilizó Proteína A-Peroxidasa en una dilución 1:10. Control negativo suero normal de caballo (■) y control positivo Plasma equino antialacrán (▲) en diluciones de 1/100, 1/300, 1/1000, 1/3000, 1/10 000, 1/30 000, 1/100 000 y 0.





a

b



c

d

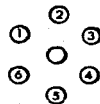


Fig. 8.- Immunodifusión de las Inmunoglobulinas obtenidas por inmunoadsorción con Seph.4B-NIX, en contra de Veneno Total, Fracción II y Fracción II.11.  
 a) Pozos 1 y 2 PBS, 3,4,5 y 6 Plasma antialacrán, Pozo central Fracción:II .  
 b) Pozos 1 y 6 PBS, 3,4 y 5 plasma antialacrán Veneno total. c) y d) Pozos 1,2 y 3 Inmunoglobulinas purificadas con Seph 4B-NIX, diluciones 1, 1:3, 1:10 respectivamente, Pozos 4 y 5 Plasma antialacrán, Pozo 6 PBS y Pozo central Fracción II.11.

Todos los resultados que se describen a continuación fueron obtenidos dentro del marco de la presente tesis.

Con las células híbridas expandidas en cultivo de tejido inyectamos a una población importante de ratones para la obtención de líquido de ascitis. El líquido de ascitis se obtuvo en ratones de la cepa Balb/c.

Se cosecharon cantidades variables de líquido de ascitis (Tabla III).

De cada clona se corrieron electroforesis en gel de poliacrilamida en Tris-glicina pH 8.9 para verificar la presencia de inmunoglobulinas (Fig. 9a - h). Los anticuerpos monoclonales migraron en la zona correspondiente a las inmunoglobulinas de ratón (ver indicación en la fig. 9a, como ejemplo).

Los líquidos de ascitis provenientes de distintos ratones que poseían inmunoglobulinas monoclonales en concentración adecuada y que pertenecían a la misma clona, se mezclaron.

Cada una de estas clonas se trató por separado,

como se mencionó en materiales y métodos. La figura 10 a-c representa el perfil cromatográfico de cada una de las seis clonas cuando se aplicaron a una columna de DEAE-celulosa.

Como se observa en la figura 10 a-c el comportamiento del líquido de ascitis se mostró un poco diferente según la clona tratada, pero de forma general se pudo separar la fracción correspondiente a las inmunoglobulinas.

Esto se comprobó por electroforesis en gel de poli-acrilamida (Fig. 11).

Al correr los geles en Tris-glicina pH 8.9 se comprobó la pureza de los anticuerpos monoclonales, además de que se pudo observar su comportamiento electroforético.

La movilidad electroforética de las clonas BNTX 4, BNTX 12 y BNTX 16, en los carriles 7, 8 y 10 respectivamente, son muy similares, mientras que las clonas BNTX 14, BNTX 18 y BNTX 21 son todas diferentes entre sí (carriles 9, 11 y 12) y distintas de las tres anteriores (ver

Fig. 11).

Con respecto a la determinación de clase, como se mencionó en materiales y métodos se llevó a cabo por inmunodifusión con sueros anti-clase IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgM e IgA de ratón y con sobrenadante de cultivo concentrado de cada una de las seis clonas de anticuerpos monoclonales obtenidas.

Como se puede ver en la fig. 12a todas las clonas reconocen al suero anti-IgG (pozos 1,2,3,4,7 y 8) por lo que se infiere que todas las clonas de anticuerpos monoclonales pertenecen a la clase IgG.

Las clonas BNTX 4, BNTX 12, BNTX 14 y BNTX 16 presentaron banda de precipitación con el suero anti-clase IgG<sub>1</sub> por lo que estos anticuerpos monoclonales son de la clase IgG y de la subclase IgG<sub>1</sub> (Fig. 12a, pozos 1,2,3,4,7 y 8, y fig. 12b, pozos 1,2, 3 y 4).

Con respecto a la clona BNTX 18 no se le pudo determinar la subclase a la que pertenecía pues presentó banda de precipitación con todos los sueros anti-subclase; IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub> (Fig. 12 b,c,d y e; pozo 7),

además de que esta clona presentó reacción cruzada con el suero normal de caballo (control negativo) y con la clona BNTX 21. Sin embargo en otro experimento (datos no presentados), se pudo determinar su subclase ( $IgG_2$ ).

En este otro experimento lo que se hizo fue poner a la clona BNTX 18 a neutralizarse con suero normal de caballo, para poder eliminar las bandas de precipitación que se presentaban en la inmunodifusión cuando se ponía clona BNTX 18 y suero de caballo (Fig. 12 a-g; pozo 7), en este experimento al hacer la inmunodifusión después de la neutralización sí se pudo observar más claramente la banda de precipitación con el suero anti-clase  $IgG_2$ .

A la clona BNTX 21 sí se le pudo determinar la subclase a la que pertenecía pues presentó banda de precipitación con el suero anti-clase  $IgG_{2a}$  (Fig. 12d; pozo 8).

además de que esta clona presentó reacción cruzada con el suero normal de caballo (control negativo) y con la clona BNTX 21. Sin embargo en otro experimento (datos no presentados), se pudo determinar su subclase ( $IgG_2$ ).

En este otro experimento lo que se hizo fue poner a la clona BNTX 18 a neutralizarse con suero normal de caballo, para poder eliminar las bandas de precipitación que se presentaban en la inmunodifusión cuando se ponía clona BNTX 18 y suero de caballo (Fig. 12 a-g; pozo 7), en este experimento al hacer la inmunodifusión después de la neutralización sí se pudo observar más claramente la banda de precipitación con el suero anti-clase  $IgG_2$ .

A la clona BNTX 21 sí se le pudo determinar la subclase a la que pertenecía pues presentó banda de precipitación con el suero anti-clase  $IgG_{2a}$  (Fig. 12d; pozo 8).

Tabla III

## Producción de Líquido de Ascítis

CLONA	NUMERO DE RATONES	VOLUMEN OBTENIDO
BNTX 4	16	70 ml
BNTX 12	4	26 ml
BNTX 14	8	44 ml
BNTX 16	5	9.8 ml
BNTX 18	8	13.4 ml
BNTX 21	8	45 ml

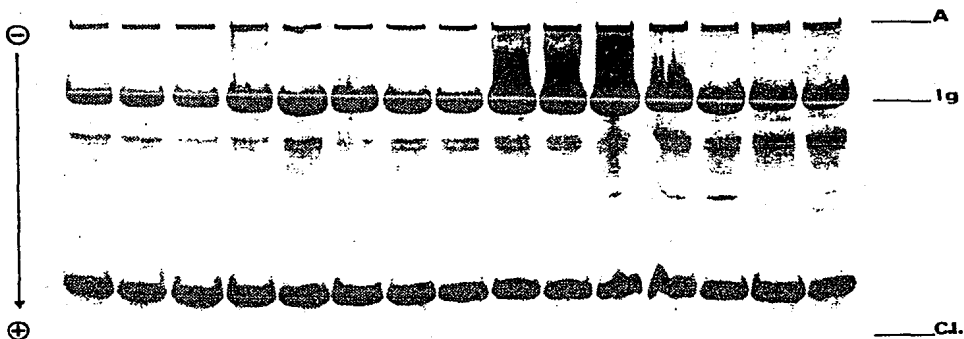


Fig. 9a.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquidos de ascitis obtenidos de ratón por punción abdominal. Todos los carriles corresponden a la clona BNTX 4, cada carril corresponde a líquido de ascitis obtenido de un ratón. La cantidad de muestra aplicada en cada carril es de 14  $\mu$ l de muestra conteniendo aproximadamente de 50-100  $\mu$ g de protefna. A= punto de aplicación; C.I.= colorante indicador; Ig= representa la posición aproximada de la migración de las inmunoglobulinas obtenidas de líquido de ascitis.



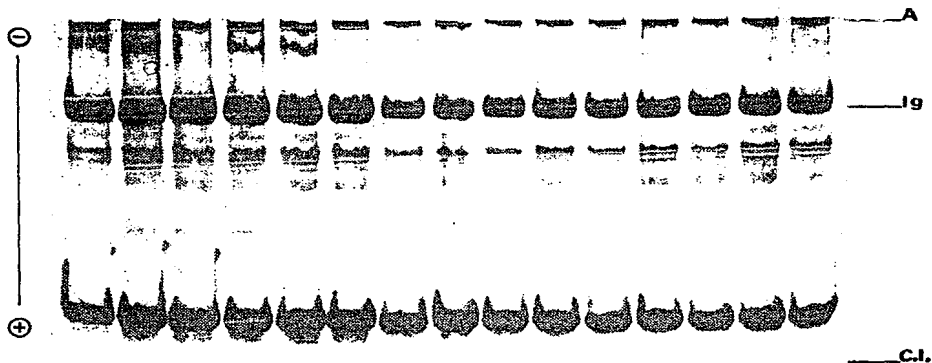


Fig. 9b.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquidos de ascítis obtenidos de ratón por punción abdominal. Demás observaciones como en la fig. 9a.

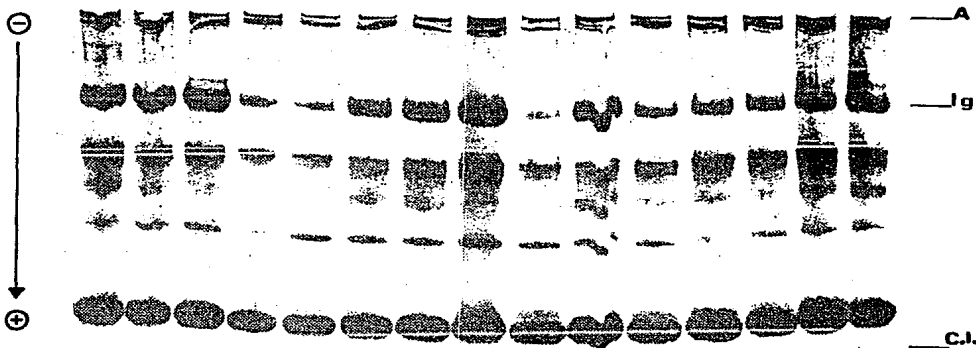


Fig. 9c.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquidos de ascitis obtenidos de ratón por punción abdominal. Todos los carriles corresponden a la clona BNTX 14. Demás observaciones como en la fig. 9a.

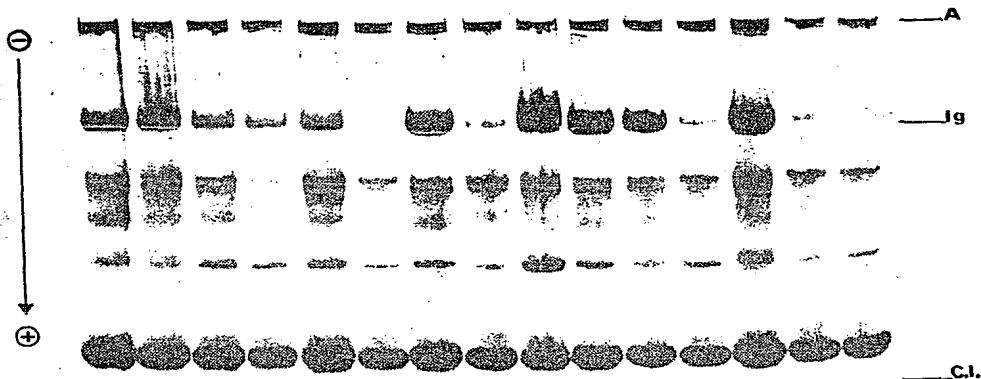


Fig. 9d.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquido de ascítis obtenidos de ratón por punción abdominal. Demás observaciones como en la fig. 9c.

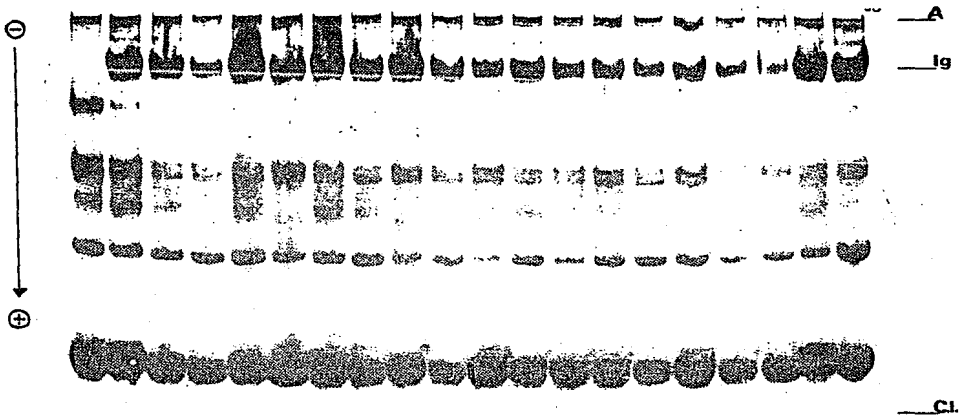


Fig. 9e.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquidos de ascitis obtenidos de ratón por punción abdominal. Todos los carriles corresponden a la clona BNTX 21. Demás observaciones como en la fig. 9a.

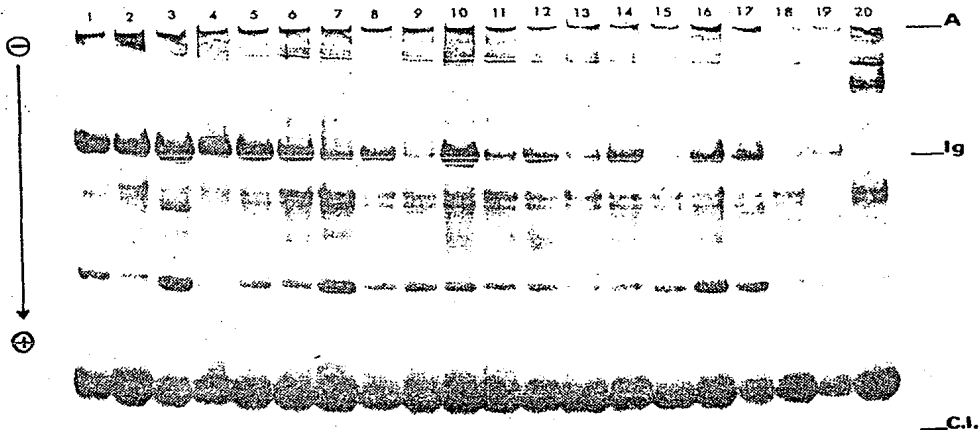


Fig. 9f.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquidos de ascitis obtenidos de ratón por punción abdominal. Carriles 1 a 8 corresponden a la clona BNTX 12, Carriles 9 a 19 clona BNTX 16, Carril 20 clona 18. Demás observaciones como en la fig. 9a.

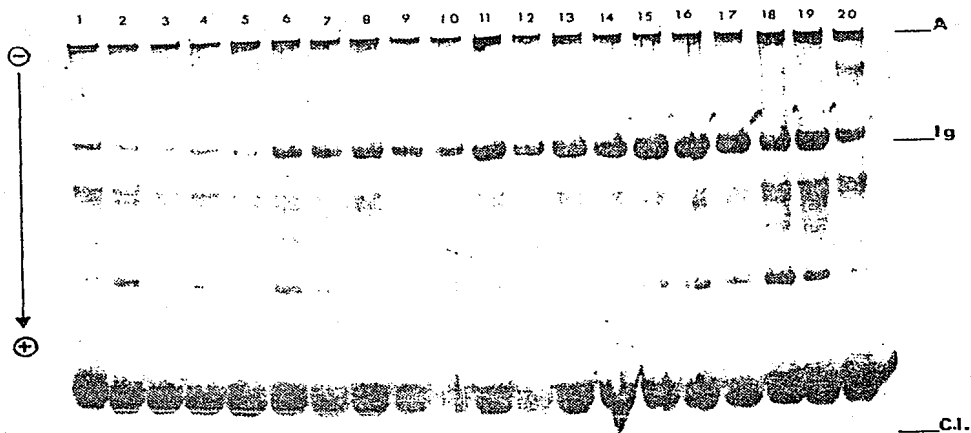


Fig. 9g.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquidos de ascítis obtenidos de ratón por punción abdominal. Carriles 1 a 11 clona BNTX 16, Carriles 12 a 19 BNTX 12, Carril 20 clona BNTX 18. Demás observaciones como en la fig. 9a.

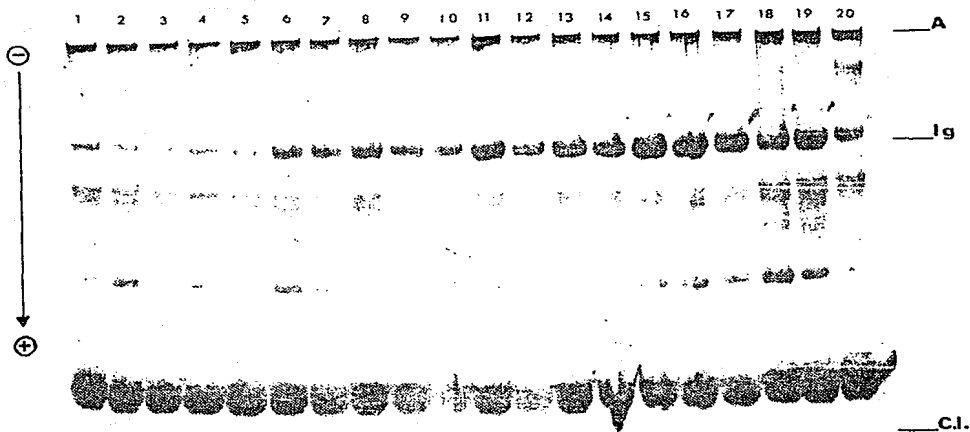


Fig. 9g.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquidos de ascitis obtenidos de ratón por punción abdominal. Carriles 1 a 11 clona BNTX 16, Carriles 12 a 19 BNTX 12, Carril 20 clona BNTX 18. Demás observaciones como en la fig. 9a.

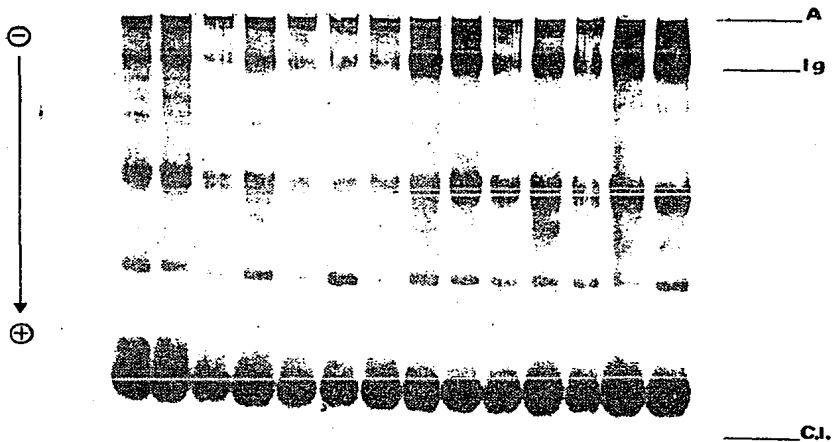


Fig. 9h.- Electroforesis en gel de Tris-glicina pH 8.9 de los líquidos de ascitis obtenidos de ratón por punción abdominal. Todos los carriles pertenecen a la clona BNIX 18. Demás observaciones como en la fig. 9a.



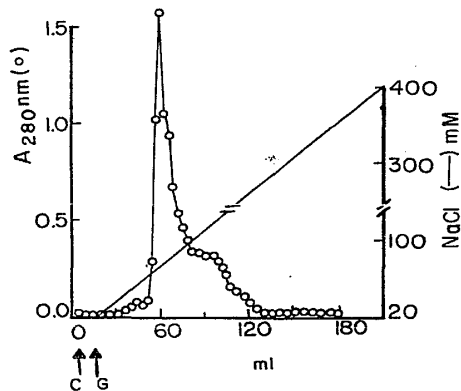
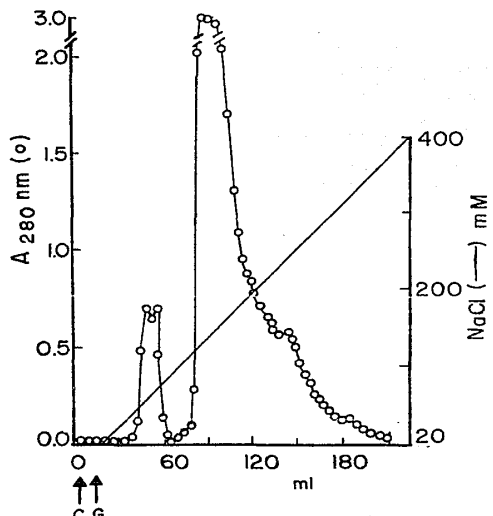


Fig. 10a.- Purificación de los anticuerpos monoclonales por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa). En una columna de dimensiones 1.5 x 20 Cm. La columna fue equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7.8 y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 20 a 400 mM. A un flujo de 25ml/hr colectándose fracciones de 3 ml/tubo. C=aplicación de la muestra y G= gradiente.

- A) Se aplicaron 100 mg de líquido de ascitis de la clona BNTX 4  
 B) Se aplicaron 52 mg de líquido de ascitis de la clona BNTX 12

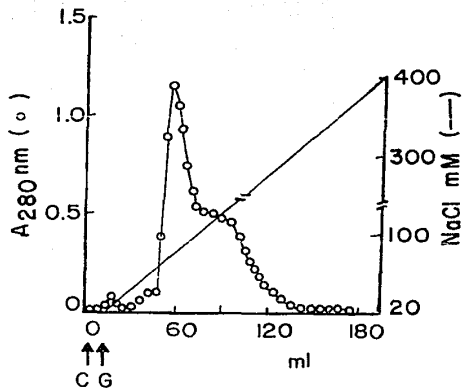
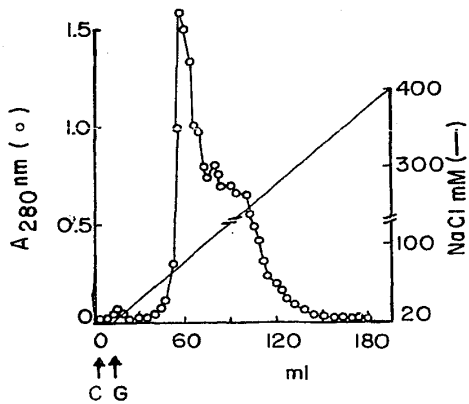


Fig. 10b.- Purificación de los anticuerpos monoclonales por cromatografía en DEAE-celulosa. Mismas observaciones que la fig. 10a.

C) Se aplicaron 80 mg de líquido de ascitis de la clona BNTX 14.

D) Se aplicaron 65 mg de líquido de ascitis de la clona BNTX 16.

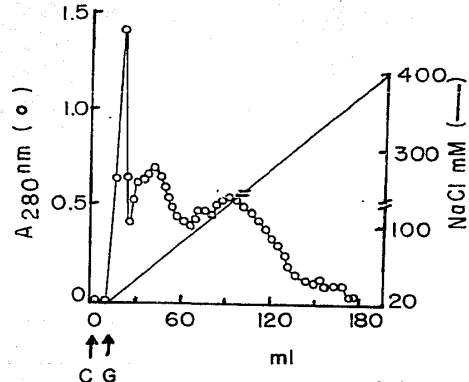
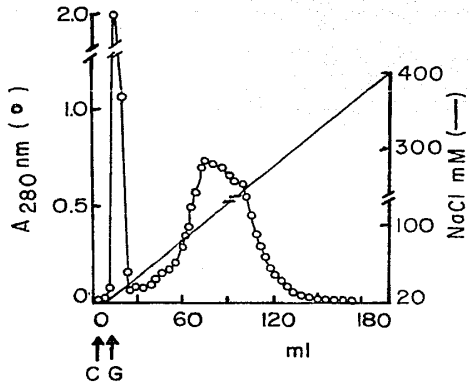


Fig. 10c.- Purificación de los anticuerpos monoclonales por cromatografía en DEAE-celulosa. Mismas observaciones que en la fig. 10a.

E) Se aplicaron 68 mg de líquido de ascitis de la clona BNTX 18

F) Se aplicaron 80 mg de líquido de ascitis de la clona BNTX 21

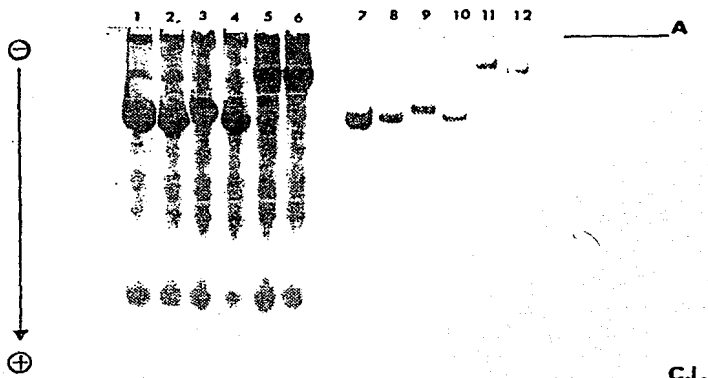
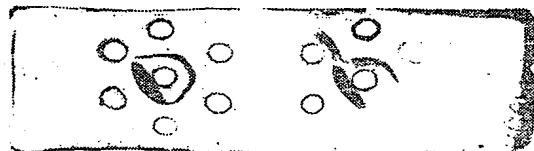
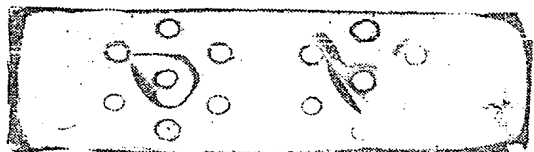


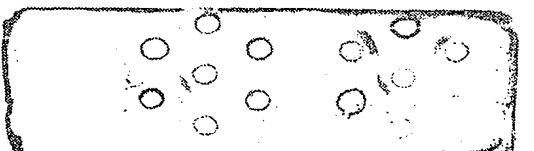
Fig. 11.- Electroforesis de los anticuerpos monoclonales purificados. Se corrió en un gel de poliacrilamida (7.5%) en Tris-glicina pH 8.9. Carriles 1,2,3,4,5 y 6 corresponden a líquido de ascitis precipitado con sulfato de amonio, de las clonas BNTX 4, BNTX 12, BNTX 14, BNTX 16, BNTX 18 y BNTX 21 respectivamente. Los carriles 7,8,9,10,11 y 12 corresponden a los anticuerpos monoclonales purificados de las mismas clonas antes anumeradas. Se aplicó cerca de 10  $\mu$ g de proteína en cada carril. A= punto de aplicación, C.I.= colorante indicador.



a



b



c



Fig. 12.- Determinación de Clase de los anticuerpos monoclonales por inmunodifusión. a) Ambos pozos centrales contienen suero anti-IgG. Pozos laterales contienen sobrenadante de cultivo de 1) clona BNTX 4, 2) BNTX 12, 3) BNTX 14, 4) BNTX 16, 7) BNTX 18 y 8) BNTX 21; Pozos 5 y 11) suero normal de ratón (control positivo); Pozos 6 y 12) suero normal de caballo (control negativo). b) Ambos pozos centrales contienen suero anti-Ig<sub>1</sub>; demás observaciones como en (a). c) Ambos pozos centrales contienen suero anti-Ig<sub>2</sub>; demás observaciones como en (a).

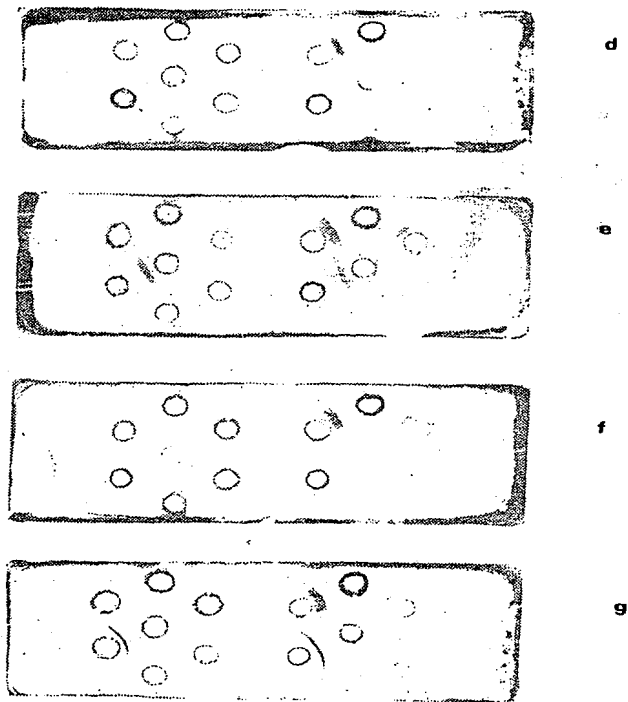


Fig. 12.- Determinación de Clase de los anticuerpos monoclonales, por inmunodifusión. d) Ambos pozos centrales contienen suero anti-IgG<sub>2a</sub>; demás observaciones como en (a), e) Ambos pozos centrales contienen suero anti-IgG<sub>1</sub>; demás observaciones como en (a), f) Ambos pozos centrales contienen suero anti-IgA; demás observaciones como en (a), g) Ambos pozos centrales contienen suero anti-IgM; demás observaciones como en (a).

a) Inmunoadsorbente con Ab. policlonal: Sepharosa 4B-Ig.

Con las inmunoglobulinas policlonales purificadas a partir de suero de caballo se sintetizó un inmunoadsorbente que sirvió de soporte para la purificación de la NTX.

La fracción II (Fig. 4a) aplicada a la columna de afinidad se eluyó con el amortiguador glicina-HCl 50mM pH 2.9 (Fig. 13). En esta figura se observa que la mayor parte de las proteínas de la fracción II, no se pegan a la columna de afinidad, como era de esperarse por la concentración relativa de la NTX en el veneno, sin embargo una pequeña fracción tóxica (letra T en la figura 13) solamente se desprende de la columna mediante desnaturalización parcial por pH (lavado con glicina-HCl pH 2.9).

Esta fracción se volvió a cromatografiar en una columna de Sephadex G-10 para eliminar el Tris que se agrega para neutralizar la muestra eluída y la de exceso de glicina (Fig. 14).

Del tubo de máxima absorbancia de la fracción 2 se tomó una muestra para electroforesis en geles de acrilamida en acetato-urea (Fig. 15) y se tomó también una muestra para análisis de aminoácidos.

En cuanto al gel la proteína migra con el colorante indicador de acuerdo a lo esperado, pero la banda es muy difusa.

Con respecto a la toxicidad, al inyectar al ratón aproximadamente 39.2 µg/20 grs. de peso de esta muestra, el animal presentó síntomas de toxicidad.

Del análisis de aminoácidos sólo se pudieron determinar los primeros cinco aminoácidos, ya que debido al exceso de glicina existente en la muestra se rebasó la sensibilidad del aparato. Apesar de que esta muestra había sido recromatografiada en Sephadex G-10.

Si bien estos experimentos eran alentadores y constituían evidencias plausibles para creer que si se pueden purificar toxinas por inmuoadsorción a inmunoglobulinas polivalentes, no quedamos contentos con ellos y empezamos una nueva estrategia basada en experimentos con



anticuerpos monoclonales purificados.

b) Inmunoadsorbente con Ab. monoclonal: Affi-gel-BNTX 4

Una vez que se obtuvieron los anticuerpos monoclonales puros se diseñó una nueva estrategia para purificar a la NTX.

Se decidió acoplar a estos anticuerpos a una nueva resina Affi-gel G-10. De las seis clonas obtenidas utilizamos para el propósito de esta tesis solamente la clona BNTX 4.

La elección de clona se hizo por orden numérica (arbitraria).

De esta columna se hicieron tres corridas, la primera (Fig. 16) en las condiciones mencionadas en materiales y métodos, en la segunda se decidió que después de lavar la columna con el amortiguador de corrida (Tris HCl 50 mM pH 7.3) y antes de aluirla con ácido acético 0.1 M se la lavaría con alta fuerza iónica (NaCl 0.5 M).

Como se puede observar en la figura 17 el NaCl

eluyó toda la proteína unida al soporte. El despegado con ácido acético no eluyó proteína alguna.

Al cuantificar espectrofotométricamente la proteína eluída con sal se observó que la cantidad de proteína era muy superior a la cantidad de proteína que se había obtenido en la primera corrida. Como estos resultados no fueron satisfactorios ya que no nada más se eluía a la posible NTX sino más proteína desconocida.

Al obtener estos resultados, la tercera cromatografía (datos no presentados) se realizó sin aplicar NaCl, sino en las condiciones ya conocidas de lavado con ácido acético.

Cabe mencionar que de la misma manera que en la figura 15 el componente eluído con sal se mostró tóxico a ratones.

Al correr los geles de acrilamida en acetato-urea de cada uno de los eluidos de las cromatografías anteriores nos dimos cuenta que además del componente que migraba con el colorante indicador se presentaba un pequeño contaminante (Fig. 18).

Con respecto al gel del eluido con NaCl 0.5 M, la banda era muy difusa quizás debido a la cantidad de sal en la muestra por lo que no se pudo tomar fotografía.

Con base a estos resultados se juntaron los tres eluidos obtenidos en esta columna de afinidad. La mezcla fue recromatografiada en una columna de intercambio iónico de CM-celulosa con el objetivo de poder separar el contaminante presente en los geles.

En esta cromatografía se obtuvieron tres componentes principales (Fig. 19) y algunos componentes menores. Obsérvese que la escala de absorbancia está aumentada. Por esta razón solamente se procesaron para análisis los tres componentes mayores, sin embargo, se verificó presencia de toxicidad a lo largo de todo el cromatograma.

Los componentes 2 y 5 fueron definitivamente tóxicos a ratones, los demás no mostraron efecto a las dosis ensayadas.

En la figura 20 se observan los resultados de la

electroforesis en gel de poliacrilamida de los distintos componentes mayores de la figura 10. Los componentes 2 y 5 (Fig. 19) se mostraron puros y corresponden probablemente a los dos componentes mayoritarios observados en la figura 18.

En la tabla IV se indican los resultados del análisis de aminoácidos efectuados con los componentes mayores de la cromatografía en CM-celulosa (Fig. 19).

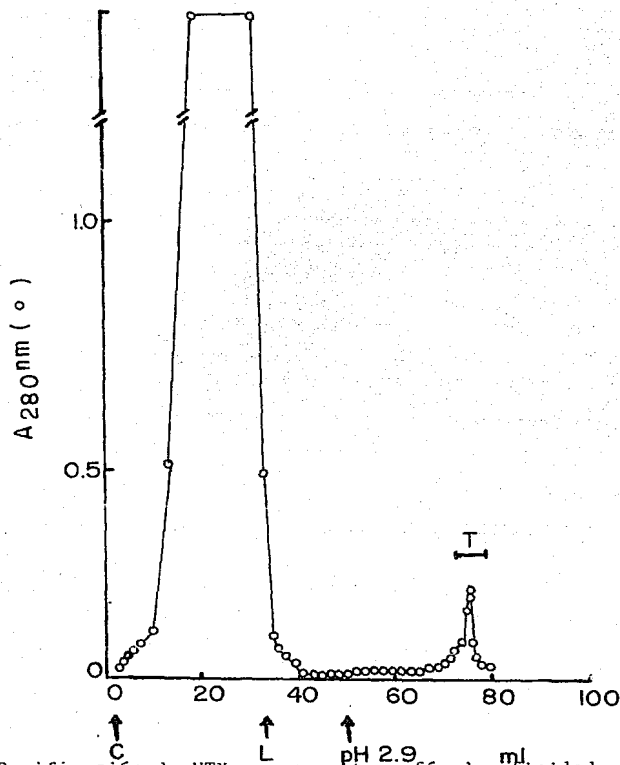


Fig. 13.- Purificación de NTX por cromatografía de afinidad en Seph 4B-Ig de caballo. En una columna de dimensiones 2.0 x 9 cm se aplicaron 30 mg de fracción II. Se lavó la columna con Tris-HCl 50 mM pH 7.3 a un flujo de 30 ml/hr.. Se eluyó con glicina-HCl 50 mM pH 2.9. Las fracciones eluidas corresponde a cerca del 0.88% de la fracción II. C= aplicación de la muestra, L=lavado, T= tubos conteniendo toxina.

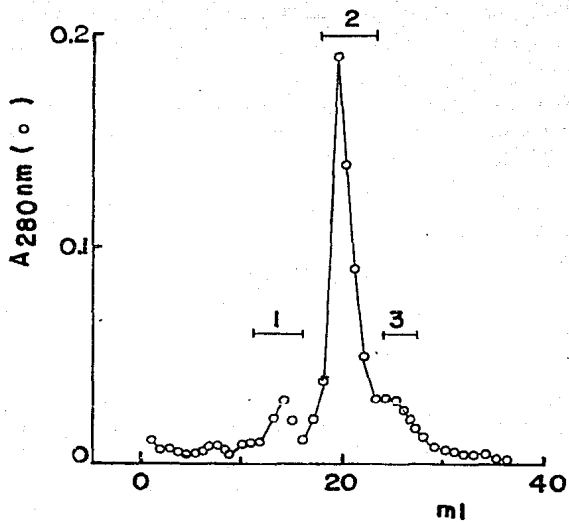


Fig. 14.- Cromatografía en Sephadex G-10 en una columna de dimensiones 0.9 x 65 cm., para eliminar la glicina del pico eluido con glicina HCl 50 mM pH 2.9 de la columna de afinidad Seph 4B-Ig (fig.13). Se eluyó la columna con agua tetradestilada a un flujo de 10 ml/hr. Lqs tubos correspondientes a la barra horizontal encimada por el N<sup>o</sup> 2 corresponde al punto de elución de la NTX.

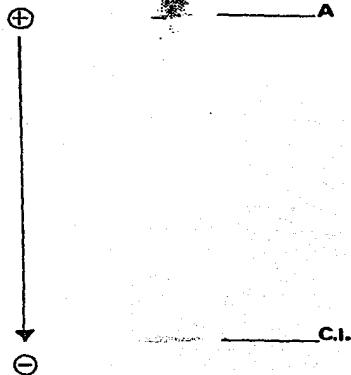


Fig. 15.- Electroforesis de la NTX obtenida de la columna de Sephadex G-10. Se corrió el gel en el sistema  $\beta$ alanina (Reisfield y col., 1962). Se aplicaron 19  $\mu$ g del tubo pico de la corrida de Sephadex G-10 (fig. 14). La proteína migró hacia el polo negativo. A= punto de aplicación, C.I.= colorante indicador.

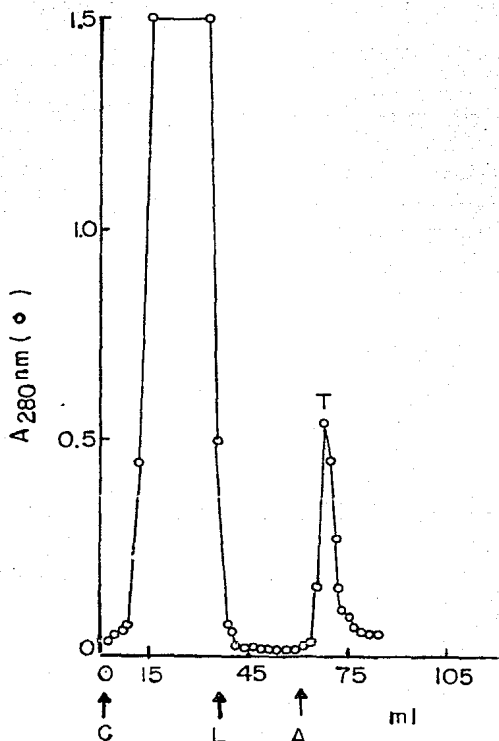


Fig. 16.- Purificación de NTX por cromatografía de afinidad en Affi-gel -Ab momoclonal . En una columna de 1.5 x 6.0 cm se aplicaron 60 mg de veneno total. Se lavó la columna con Tris-HCl 50 mM pH 7.8 a un flujo de 40 ml/hr. Se eluyó con ácido acético 0.1 M las fracciones eluidas se neutralizaron con Tris-HCl 1 M pH 7.8. El pico eluido fue toxico. La NTX obtenida con ácido acético 0.1 M corresponde a cerca del 2% del veneno total. C y L son los mismos que la fig. 13.



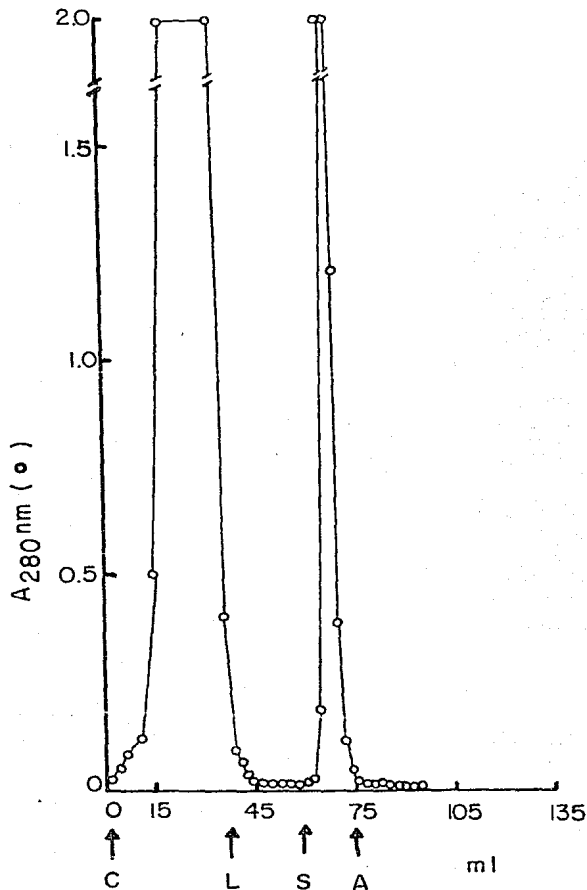


Fig. 17

Purificación de NTX por cromatografía de afinidad en Affi-gel-Ab. monoclonal BNTX 4. En una columna de 1.5 x 6.0 cm se aplicaron 60 mg de veneno total. Se lavó la columna con Tris-HCl 50 mM pH 7.8 a un flujo de 40 ml/hr. Después se lavó con alta fuerza iónica 0.5 M de NaCl y finalmente se eluyó con ácido acético 0.1 M. Las fracciones eluidas se neutralizaron con Tris-HCl 1 M pH 7.8. La proteína eluida con NaCl 0.5 M corresponde a cerca del 19.4 % del veneno total. Las flechas con las letras C y L significan lo mismo que la fig. anterior, S y A significan lavado con NaCl y ácido acético respectivamente.

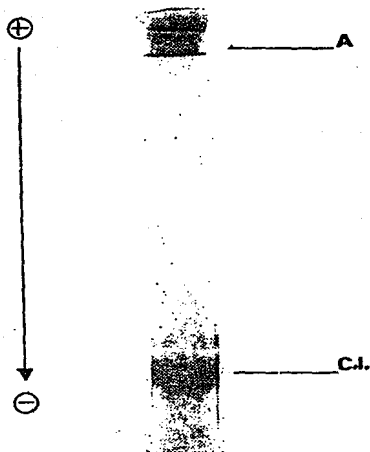


Fig. 18.- Electroforesis del tubo pico eluido con ácido acético 0.1 M de la afinidad Affi-gel-Ab monoclonal BNTX 4 se aplicó 30  $\mu$ g de proteína. Se corrió en un gel cilíndrico en el sistema  $\beta$ alanina (Reisfield y col., 1962). La proteína migró hacia el catodo. A= punto de aplicación, C.I.= colorante indicador.

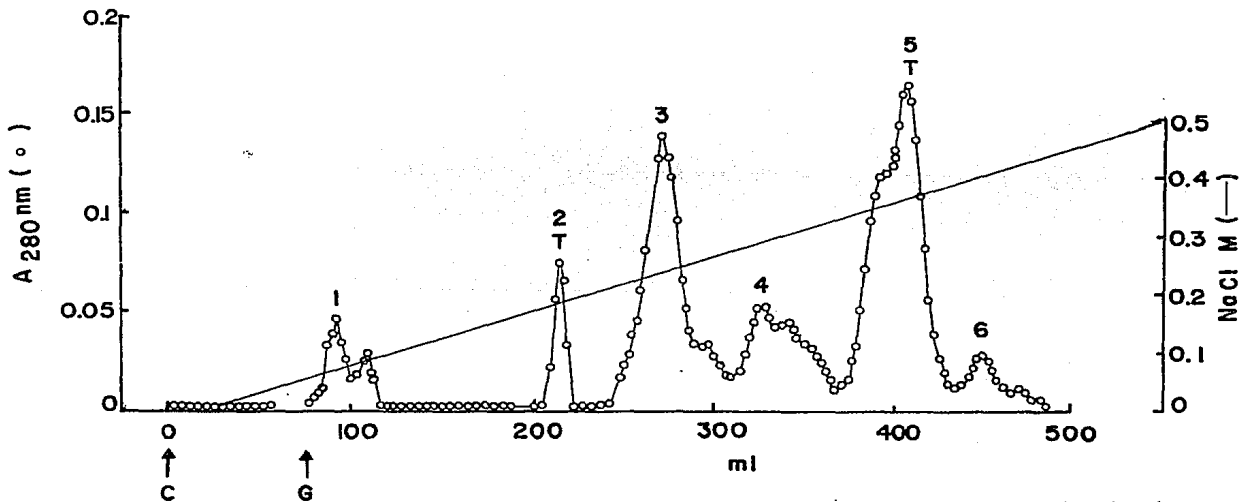


Fig. 19.- Perfil Cromatografico de la columna de CM-celulosa, equilibrada con un amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 6.0, a la cual se le aplicó la mezcla de los eluidos de la afinidad Affi-gel-Ab monoclonal BNTX 4. La columna fue eluida con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 0.5 M a un flujo de 30 ml/hr.. Las fracciones colectadas fueron de 2.5 ml/tubo. Los picos 2 y 5 fueron tóxicos. L= aplicación de la muestra y G= gradiente.

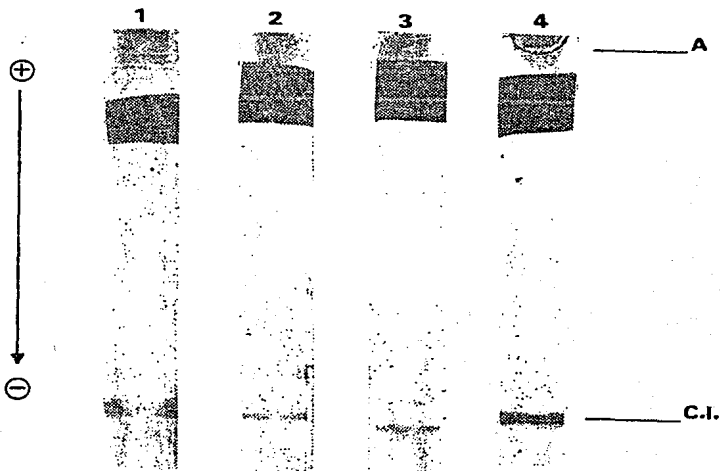


Fig. 20.- Electroforesis de los picos obtenidos en la columna de CM celulosa (Fig.19). Se corrieron en el sistema  $\beta$ alanina (Reisfield y col., 1962). 1.- Pico 2 (3.8  $\mu$ g), 2.- Pico 3 (7.2  $\mu$ g), 3.- Pico 5 subida (5.6  $\mu$ g), 4.- Pico bajada (7  $\mu$ g). A= punto de aplicaci3n, C.I.= colorante indicador.

Tabla IV  
Composición de Aminoácidos.

Aminoácido	NTX	Pico 2	Pico 3	Pico 5 (subida)	Pico 5	Pico 5 (bajada)
Asp	4	4.38	4	4	4	4
Thr	2	2.81	2.56	1.98	1.61	1.68
Ser	4	0.56	0.51	3.82	1.98	2.04
Glu	2	6.84	6.23	2.09	1.11	1.30
Pro	2	2.32	2.11	1.97	4.27 ?	2.32
Gly	3	9.33	8.51	3.26	4.26	4.51
Ala	2	3.58	3.26	1.87	0.872	1.10
Val	1	1.81	1.65	0.46	0.535	0.376
Met	1	0	0	0.20	0.476	0.198
Ile	2	0.16	0.150	1.16	0.238	0.510
Leu	1	5.73	5.22	0.479	2.21	1.83
Tyr	2	6.15	5.61	0.824	3.36	2.62
Phe	0	1.87	1.70	0.536	0.368	0.631
His	0	0	0	0	0.746	0.785
Lys	7	6.77	6.7	7.85	4.75	5.59
Arg	0	2.67	2.43	1.02	1.40	1.70
1/2 Cys	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trp	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

### PURIFICACION DE LA NTX

El método descrito por Possani y col., 1981a, fue repetido en este trabajo obteniéndose en todos los pasos cromatográficos los resultados esperados y de esta manera poder obtener de forma pura a la NTX para la realización de las dos líneas de experimentación diseñadas para esta tesis, las cuales como ya se mencionó en la sección de resultados fueron: la de sintetizar una columna de afinidad para la purificación de anticuerpos policlonales anti-NTX y la otra para la obtención de anticuerpos monoclonales.

### PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-NTX

#### a) Purificación de Ab. policlonales anti-NTX

La columna de afinidad Sepharosa 4B-NTX dio muy buenos resultados, ya que se lograron purificar con un buen rendimiento las inmunoglobulinas presentes en el plasma equino antialacrán.

Además como se puede observar en la figura 6 las inmunoglobulinas purificadas con este método tienen un patrón de corrimiento electroforético igual a las inmunoglobulinas de caballo comercial (SIGMA).

En cuanto al ensayo inmunoenzimático estas inmunoglobulinas sí reconocieron a la fracción II.11, lo cual nos vuelve a corroborar el buen funcionamiento de la columna de afinidad sintetizada con NTX.

Aunque en la inmunodifusión no se pudieron observar anticuerpos precipitantes no quiere decir que estos no lo sean, sino que posiblemente se debió a que no se probaron otras condiciones experimentales como es; ampliar el rango de diluciones de estas inmunoglobulinas o la concentración del antígeno.

Por otro lado, en experimentos realizados en nuestro laboratorio por Geórgina Gurrola (comunicación personal) se ha visto que la NTX es bien difícil para coprecipitar en inmunodifusión, quizás también por tratarse de un péptido relativamente pequeño.

Otras razones también podrían explicar este hecho,

como la falta de ciertos componentes para la formación de malla de precipitación por inmunodifusión, especialmente cuando se trabaja con anticuerpos y antígenos puros.

#### b) Purificación de Ab. monoclonales anti-NTX

En lo que se refiere a la producción de líquido de ascitis los resultados fueron satisfactorios, a pesar de que la cantidad obtenida fuera variable. Esto se debe a que ciertas clonas al ser inyectadas en los ratones fueron más agresivas dando por consecuencia que los animales se murieran en menos tiempo.

En el líquido de ascitis cerca del 40% de proteína corresponde a inmunoglobulinas. En cuanto a la purificación de estos anticuerpos, el rendimiento de purificación fue bastante bueno (cerca del 80%).

En lo que se refiere a la determinación de clase, como se mencionó en la sección de resultados, todas las clonas (BNTX 4, BNTX 12, BNTX 16, BNTX 18, BNTX 14 y BNTX 21) pertenecen a la clase de IgG y las clonas BNTX 4, BNTX 12, BNTX 14 y BNTX 15 son de la subclase IgG<sub>1</sub>,



la clona BNTX 21 pertenece a la subclase  $IgG_{2a}$ .

En lo referente a la clona BNTX 18 no se le pudo determinar la subclase a la que pertenecía ya que presentó reacción cruzada con el suero de caballo y con la clona BNTX 21, además daba bandas de precipitación con todos los sueros anti-subclases. Sin embargo como ya se mencionó en la sección de resultados se hizo otro experimento en el cual se puso a incubar la clona BNTX 18 con suero normal de caballo con el propósito de neutralizar los anticuerpos anti-suero de caballo presentes en el sobrenadante de cultivo de la clona BNTX 18, y de esta manera poder eliminar las bandas de precipitación con el suero normal de caballo.

Los resultados que se obtuvieron con este nuevo experimento fueron más aceptables ya que en efecto se pudieron eliminar gran parte de estas bandas de precipitación que se encontraban en el primer experimento (fig. 12 a-g; pozo 7) y de esta manera se pudo determinar con más claridad que esta clona pertenecía a la subclase  $IgG_2$ .

a) Inmunoadsorbente con Ab. policlonal: Sepharosa 4B-1g

Como ya se mencionó anteriormente uno de los objetivos de esta tesis fue el de diseñar una nueva estrategia de purificación de toxinas, que nos permitiese obtener toxinas puras en menos pasos cromatográficos de los que se involucran en la metodología tradicional (Possani y col., 1981a).

Por esto se pensó en sintetizar columnas de afinidad que tuvieran como ligando a inmunoglobulinas dirigidas contra la toxina a purificar.

De esta manera se sintetizó una columna de afinidad con inmunoglobulinas anti-NTX acopladas a Sepharosa 4B.

Como se pudo observar en los resultados de esta columna de afinidad se tuvieron ciertos problemas para corroborar la composición de la NTX. Entre ellos se puede mencionar la dificultad de poder eliminar el exceso de glicina que contenía la muestra, no obstante la cro-

matografía de filtración en gel por peso molecular (Sephadex G-10).

El hecho de la contaminación persistente de una muestra con aminoácidos añadidos como amortiguadores (glicina en este caso) aún después de la introducción de pasos cromatográficos, es bien conocido en nuestro laboratorio (Possani comunicación personal).

Una entre muchas explicaciones posibles es la presencia de interacciones iónicas entre polipéptidos cargados de aminoácidos libres, especialmente los de cadena lateral corta. Posiblemente el uso de la cromatografía líquida de alta presión en presencia de solventes orgánicos pudiera constituirse en una sugerencia para resolver este problema.

b) Inmunoadsorbente con Ab. monoclonal: Affi-gel-BNTX 4

La utilización de anticuerpos monoclonales purificados se pensó como alternativa para los problemas anteriores. De este modo se preparó una nueva resina de afinidad, en la que se utilizarían anticuerpos monoclonales.

También decidimos que el eluyente ya no sería glicina-HCl como se había utilizado en la columna de afinidad con anticuerpos policlonales, sino que se utilizaría ácido acético para la elución de la columna.

Esta nueva columna funcionó muy bien, aunque ahora nos encontramos con otro problema.

Como se observó en los resultados se utilizaron dos tipos de condiciones para la elución de la columna, una con un previo lavado con alta fuerza iónica antes de eluir con ácido acético y otra sin lavar con alta fuerza iónica.

Cuando la corrida se llevaba a cabo sin aplicación de NaCl 0.5 M (alta fuerza iónica), se obtenía con ácido acético un pico de proteína que al correrse en geles de acetato-urea nos daban dos bandas una que migraba con el colorante indicador (corrimiento característico de la NTX) y otra que migraba después de ésta, lo cual nos indica que nuestra NTX estaba contaminada o que había en el veneno más de una proteína cuyos epítopes son similares y son capaces de ser reconocidos por los anticuerpos monoclonales de la clona BNTX 4.

Se decidió entonces aplicar NaCl 0.5 M con el objetivo de despegar la proteína unida inespecíficamente al soporte y poder eluir a la NTX pura con el ácido acético.

Este raciocinio se basaba en el supuesto de que la NTX pudiera estar ligeramente contaminada (ver fig. 18) con otra toxina, a través de interacciones iónicas no específicas. Sabemos que todas las toxinas de este veneno son polipéptidos altamente cargados.

Sin embargo, el NaCl 0.5 M eluyó toda la proteína unida al soporte y no solamente a la proteína que se eluía con ácido acético, sino que se eluyó mucha más proteína de la que se esperaba.

Lo primero que se pensó era que posiblemente se habían despegado anticuerpos monoclonales unidos al soporte, por lo que se montó una electroforesis en Tris-glicina pH 8.9 para ver si la proteína eluida contenía anticuerpos monoclonales (datos no presentados) pero en el gel no se vio banda alguna que correspondiera al patrón de corrimiento de los anticuerpos monoclonales.

Se decidió entonces juntar los eluidos obtenidos con alta fuerza iónica y con ácido acético y recromatografiarlos en una columna de intercambio iónico de CM- celulosa con el fin de poder eliminar los contaminantes de la muestra y así poder obtener a la NTX pura.

En este momento también discutíamos en el laboratorio la posibilidad de la existencia de eptotopes muy semejantes (con diferentes constantes de afinidad) a los anticuerpos monoclonales de la clona BNTX 4, que en un dado momento se pudieran eluir diferencialmente con alta sal y/o ácido.

La hipótesis verdadera todavía no la conocemos, pero podemos verificar (Fig. 19) que por lo menos dos componentes iónicos existen en el veneno de C. noxius que se pegan a la columna de afinidad con la clona BNTX 4.

Como se puede observar en el cromatograma de esta figura se obtuvieron seis picos principales, de los cuales a tres de ellos se les corrió una electroforesis en geles de acetato-urea, se tomaron muestras para análisis de aminoácidos y se probó toxicidad.

En cuanto a los geles el pico 2 presentó una sola banda, la cual no migraba con el colorante indicador, lo que nos indicaba que no era la NTX, además al ser inyectada al ratón fue muy tóxica pues lo mató en pocos minutos. Esto fue otro indicio que nos hizo descartar al pico 2 de la posibilidad de que fuera la NTX ya que esta toxina (NTX) cuando se inyecta a las concentraciones experimentales utilizadas en esta tesis no mata a los ratones sólo presentan síntomas de toxicidad.

El pico 3 en el gel presentó dos bandas una que migraba con el colorante indicador y otra que migraba después de él. Este pico al ser inyectado en el ratón no fue tóxico por lo cual descartaba la posibilidad de que contuviera NTX u otra toxina.

Del pico 5 se tomaron dos muestras para geles, una que correspondía a la subida del pico y la otra que correspondía a la bajada. Los dos geles presentaron una sola banda la cual sí migró con el colorante indicador.

Este pico al ser inyectado en el ratón fue tóxico pero no mató al ratón en nuestras condiciones experimentales, lo que nos hizo pensar que este pico podría corres

ponder a la NTX.

Con respecto al análisis de aminoácidos de estas muestras como se observa en la tabla IV, el pico 2 se descartó definitivamente ya que su composición de aminoácidos no se parecía a la NTX. Del pico 3 la composición de aminoácidos tampoco correspondió, además de que como ya mencionamos anteriormente este pico estaba contaminado.

La composición de aminoácidos del pico 5 fue la que más se pareció a la de la NTX. Sin embargo la presencia de pequeñas cantidades de fenilalanina y de histidina en la fracción 5 apuntan a la presencia de una NTX diferente a la esperada. Esto no es sorprendente puesto que en nuestro laboratorio (Possani y col., 1982) se ha demostrado por secuencia directa de aminoácidos, la presencia de varias toxinas bloqueadoras del canal de potasio con composición y secuencia de aminoácidos semejantes pero no iguales.

De esta forma el hallazgo puesto en evidencia en esta tesis confirma lo anterior y nos lleva a pensar que el epítotope reconocido por la clona BNTX 4 es el



mismo, pero es capaz de purificar dos o más formas químicamente diferentes de un mismo tipo de toxinas.

Esta es probablemente la contribución más original de esta tesis, que lejos de estar determinada, ha marcado el inicio de una serie de experimentos importantes que se llevan a cabo en este momento en el laboratorio.

Entre estos resultados que todavía necesitan experimentación están:

1) La afinidad BNTX 4 está copurificando toxinas verdaderamente diferentes (ver figura 19 y 20) ¿o son las formas ya reportadas?

2) ¿Es una de las formas un precursor de la otra?

3) ¿Qué pasa con las demás clonas BNTX 12, BNTX 14, BNTX 16, BNTX 18 y BNTX 21 y cuál es su comportamiento?

Estas son apenas algunas de las preguntas que todavía se pretende responder en el laboratorio dentro del cuadro de esta tesis.

## CONCLUSIONES

- Se purificó a la noxiustoxina (NTX) de forma homogénea por el método tradicional, para llevar a cabo las dos líneas de experimentación diseñadas para este trabajo: 1) sintetizar una columna de afinidad acoplando NTX a Sepharosa 4B, para purificar anticuerpos policlonales anti-NTX de plasma equino antialacrán; y 2) diseñar un esquema de inmunización en ratones para la obtención de anticuerpos monoclonales anti-NTX, para posteriormente sintetizar una columna de afinidad con los anticuerpos monoclonales puros.

- Los anticuerpos policlonales purificados con la columna de afinidad Sepharosa 4B-NTX, fueron inmunoglobulinas que reconocen a la NTX por el criterio del método de ELISA (ensayo inmunoenzimático). Estos anticuerpos fueron probados por el mismo método, encontrándose una titulación positiva en el rango de 0.1 µg/ml a 10 µg/ml.

- Los anticuerpos monoclonales de las seis clonas obtenidas en el laboratorio, se purificaron con un rendimiento cercano al 80%.

- Con el inmunoadsorbente Sepharosa 4B-Ig no se logró obtener de forma pura a la NTX.

- Con el inmunoadsorbente Affi-gel-BNTX 4 se obtuvo una toxina análoga a la NTX. Sin embargo, son necesarios más estudios para la caracterización de esta toxina.

- El anticuerpo monoclonal utilizado (BNTX 4) muy posiblemente reconoce diferentes determinantes antigénicos de la NTX.

- Falta por realizar este mismo experimento para la caracterización de los anticuerpos monoclonales de las demás clonas.

La obtención de anticuerpos monoclonales abre la posibilidad de ampliar el conocimiento sobre los determinantes antigénicos de la NTX. Pues se piensa en tener un banco de péptidos (dipéptidos, tripéptidos, etc.) los cuales con el método de ELISA por medio de competencias con los anticuerpos monoclonales se pueda determinar los determinantes antigénicos de la NTX o de otras toxinas seleccionadas.

Esto es de suma importancia ya que estos estudios contribuyen a una de las líneas de investigación del laboratorio del Dr. Possani, la cual consiste en elaborar una vacuna sintética contra la picadura del alacrán, por medio de péptidos sintéticos.

## B I B L I O G R A F I A

1. Alagón, A. C., Possani, L.D., Erickson, B.W., 1978. Isolation and characterization of several proteins from Tityus serrulatus scorpion venom. En: P. Rosenberg (Ed.) *Toxins, Animal, Plant and Microbial Pergamon*, New York, p.p. 609-618.
2. Axén, R., Porath, J., and Ernback, S., 1967. *Nature (London)* 214, 1302.
3. Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M., and Mlejnek, R. V., 1975. Amino acid sequence of neurotoxin I from Centruroides sculpturatus Ewing. *Arch. Biochem. Biophys.* 166:125-134.
4. Bazolet, L. 1971. Scorpionism in the old world. In *venomous Animals and Their Venoms, Vol. III*, W. Bücherl and E. Buchley (Eds.). Academic Press, New York, pp. 349-371.
5. Bernard, P., Couraud, F. 1979. *Electrophysiological*

studies on embryonic heart cells in culture. Scorpion toxin as a tool to reveal latent fast sodium channel. *Biochim. Biophys. Acta* 533: 154-168.

6. Bernard, P., Couraud, F., Lissitzky, S., 1977. Effects of a scorpion toxin from Androctonus australis venom on action potential of neuroblastoma cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:782-788.
7. Bücherl, W. 1971. Classification, biology, and venom extraction of scorpions. In *Venomous Animals and Their Venoms*, Vol. III, W. Bucherl and E.E. Buckel (Eds.). Academic Press, New York, pp. 317-347.
8. Campbell, D.H., Leuscher E., and Lermann, L.S., 1951. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 37,575.
9. Carabes, A.T., and Possani, L.D., 1982. Electron microscopic evidence for scorpion toxin binding to synapses of rat brain cortex. *Neurosci. Lett.* 32:103-108.
10. Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. and Maelicke, A., 1982. Selective blockage of voltage-dependent  $K^+$  channels by a novel scorpion toxin.

296:90-91.

11. Catterall, W., 1976. Purification of a toxin protein from scorpion venom which activates the action potential  $\text{Na}^+$  ionophore. *J. Biol. Chem.* 251:5528-5536.
12. Catterall, W.A., 1979. Neurotoxins as allosteric modifiers of voltage-sensitive sodium channels. *Adv. Cytopharmacol.* 3:305-316.
13. Catterall, W., 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20:15-43.
14. Ceccarelli, B., and Clementi, F. (Eds.). 1979. *Advances in Cytopharmacology, Vol. III, Neurotoxins: Tools in Neurobiology*, Raven Press, New York.
15. Chatwal, G.S., and Habermann, E., 1981. Neurotoxin, protease inhibitors and histamine releasers in the venom of the Indian red scorpion (*Buthus tamulus*): Isolation and partial characterization. *Toxicon* 19:807-823.

16. Colomer, V., Tapia, R., Possani, L.D., 1978. Acción del veneno del alacrán Centruroides elegans sobre la captación de aminoácidos neurotransmisores en sinaptosomas. Presentado en la XII Reunión de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, San Luis Potosí, Octubre, p. 46.
17. Coraboeuf, E., Deroubaix, E., Tazieff-Depierre, F., 1975. Effect of toxin II isolated from scorpion venom on action potential and contraction of mammalian heart. *J. Mol. Cardiol.* 7:643-653.
18. Cooper, T.G., 1977. *The Tools of Biochemistry*, John Wiley and Sons, U.S.A., pp. 234-243.
19. Couraud, F., Jover, E., Dubois, J.M., Rochat, H., 1981. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. Presentado en el 4th. Eur. Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. Marseille, Francia, p. 27.
20. Couraud, F., Rochat, H., and Lissitzky, S., 1980. Binding of scorpion neurotoxins to chick embryonic heart cells in culture and relationship to calcium



uptake and membrane potential. *Biochem.* 19:457-462.

21. Couraud, F., Rochat, H., Lissitzky, 1978. Binding of scorpion and sea anemone neurotoxin to a common site related to the action potential  $\text{Na}^+$  inophore in neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83:1525-1530.
22. Cuatrecasas, P., and Anfinsen, C.B. Affinity Chromatography, in *Methods of Enzymology*, vol. 22.
23. Cuatrecasas, P. Affinity Chromatography of Macromolecules, in *Advances in Enzymology*, vol. 36.
24. Darbo, H., Rochat, H., Hopyan, C., Van Rietschoten, J., Zlotkin, E., 1981. Covalent structure of the insect toxin of Androctonus australis Hector. Presentado en el 4th. Eur. Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. Marseille, Francia, p. 28.
25. Del Pozo, E., 1948a. Los efectos musculares del veneno de escorpiones mexicanos. *Bol. Inst. Est. Med. Biol.* 6:59-69.

26. Del Pozo, E.C., 1948b. The action of the venom of a mexican scorpion (Centruroides noxius, Hoffmann) on cholinesterases. Br. J. Pharmacol. 3:219-222.
27. Del Pozo, E.C., 1949 a. Relaciones entre la actividad anticolinesterasica, las propiedades de activación muscular y la toxicidad de los venenos de diversos alacranes de México. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 10:203-213.
28. Del Pozo, E. C., 1949b. Ressemblances et differences dans les actions physiologiques des venins des scorpions. Arch. Inst. Pasteur Alger. 27:35-38.
29. Del Pozo, E. C., 1962. Estudios experimentales sobre las acciones del veneno del alacrán, Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx). 22 (3-4): 173-178.
30. Del Pozo, E.C., 1968. Farmacología de los venenos de los Centruroides mexicanos. Rev. Invest. Salud Pública, 28:51-66.
31. Del Pozo, E.C., Anguiano, L.G., 1946. Physiological

acción of scorpion venom. Fed. Proc. 5: 1.

32. Del Pozo, E.C., Anguiano, L.G., 1947. Acciones del veneno de alacrán sobre la actividad motora de músculo estriado. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (México) 8:231-263.
33. Del Pozo, E.C., Anguiano, L.G., González, J., 1944. Acciones del veneno de alacrán sobre el sistema vasomotor. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 5:227-240.
34. Del Pozo, E.C., González, J., Méndez, T.H., 1945. Acciones del veneno de alacrán sobre el aparato respiratorio. R. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 6:77-84.
35. Dent, M.A.R., Possani, L.D., Ramírez, G.A., Fletcher, Jr. P.L., 1980. Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Toxicon, 18: 343-350.
36. Dent, M.A.R., 1982. Aislamiento y caracterización química de diversas toxinas del veneno del alacrán

Centruroides Noxius Hoffmann. Tesis de M.en C.  
Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

37. Diamond, B.A., Yelton, D.E., Scharff, M.D., 1981. Monoclonal Antibodies, New England Journal of Medicine, 1344-1348.
38. Eisenbarth, G.S., 1981. Application of monoclonal antibody techniques to biochemical research, Anal. Biochem. III, 1-16.
39. Flores, R., 1963. Observaciones sobre la sintomatología y tratamiento de la intoxicación por picadura de alacrán. Rev. Inst. Sal. Enf. Trpo. (Méx) 23 (3-4): 175-178.
40. Fontecilla-Camps, J.C., Alamassy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D. and Bugg, C.E., 1980. Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6496-6500.
41. Galfré, G. and Milstein, C., 1981. Antibodies Monoclonals, in Methods in Enzymology vol. 73.

42. Geyffon, M., and Kovcor, J., 1978. Chactoid venoms. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 48, *Arthropod Venoms*, S. Bettini (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 395-418.
43. Griene, L., Kopeyan, C., and Rochat, H., 1982. Purification and characterization of neurotoxin of Buthacus arenicola and Mosobuthus gibbosus. *Toxicon* 20:68-69.
44. Grishin, E.V., Soldatov, N.M., Soldatova, L.N., and Ovchinnikov, Y.A., 1978. Isolation and characterization of toxins from the venom of Middle-Asian scorpion Buthus eupeus. *Toxicon* 5:419.
45. Grishin, E.V., Soldatov, N.M., Soldatova, L.N., and Ovchinnikov, Y.A., 1979. Studies of the toxins from Buthus eupeus scorpion venom. *Toxicon* 17 (Suppl. 1): 60.
46. Grishin, E.V., Soldatova, L.N., Kostetslii, P.V. and Ovchinnikov, Y.A., 1980. Amino acid sequence of insectotoxin 1-2 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus. *Sov. J. Bioorg. Chem. (Engl. transl. Bioorg. Khim.)* 5(9):949-956.

47. Grishin, E.V., Soldatova, L.N., Shakhparonov, M.I., and Kazakov, V.K., 1981. The amino-acid sequence of neurotoxin M-10 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus. Sov. J. Bioorg. Chem. [Engl. transl. Bioorg. Khim.] 6(5):390-398.
48. Grishin, E.V., Volkova, T.M., and Soldatova, L.N., 1982. Toxic components from the venom of caucasus USSR subspecies of scorpion Buthus eupeus. Bioorg. Khim. 8:155-164.
49. Guzmán, H.S., 1984. Purificación y caracterización bioquímica de toxinas del veneno del alacrán Centruroides limpidus limpidus. Tesis licenciatura. UN.A.M. México, D.F.
50. Hagag, M., Tu, A.T., and El-Asmar, F., 1983. Isolation of minax toxins from the venom of the scorpion Buthus minax and their metabolic effects. A ch. Biochem. Biophys. 220:459-466.
51. Hoffmann, C.C., 1932. Monografía para la entomología médica de México. Monografía No. 2. Los escorpiones de México 2a. parte: Buthidae. Anales. Inst. Biol. 9(1,2): 318-337.

52. Hoffmann, C.C., Vargas, R., 1935. Contribuciones al conocimiento de los venenos de los alacranes mexicanos. *Inst. Hig.* 2 (4):182-193.
53. Hoffmann, C.C., 1938. Nuevas consideraciones acerca de los alacranes mexicanos. *An. Inst. Biol.* 9 (1-2):318-337.
54. Jover, E., Martin-Moutot, N., Couraud, F., Rochat, H., 1978. Scorpion Toxin: specific binding to rat synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:377-382.
55. Jover, E., Couraud, F., and Rochat, H., 1980a. Two types of scorpion sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95:1607-1614.
56. Jover, E., Martin-Moutot, N., Couraud, F., and Rochat, H., 1980b. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomes fraction. Effects of membrane potential, inos, and other neurotoxins. *Biochemistry* 19:463-467.
57. Köhler, G., and Milstein, C., 1975. *Nature (London)* 256, 495.

58. Kopeyan, C., Martínez, G., Lissitzky, S., Miranda, F., and Rochat, H., 1974. Disulfide bonds of toxin II of the scorpion Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 47:483-489.
59. Kopeyan, C., Martínez, G., and Rochat, H., 1979. Amino acid sequence of neurotoxin III of the scorpion Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 94:609-615.
60. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
61. Lazarovich, P., and Zlotkin, E., 1982. A mammal toxin derived from the venom of a chactoid scorpion. Comp. Biochem. Physiol. (C) 71:177-181.
62. Lazarovich, P., Yanai, P., Pelhate, M., and Zlotkin, E., 1982a. Insect toxic components from the venom of a chactoid scorpion, Scorpio maurus palmatus (Scorpionidae). J. Biol. Chem. 257:8397-8404.
63. Livingstone, D.M., 1974, Immunoaffinity chromatography of proteins, Meth. Enzymology 34:723-731.



64. López-Acuña, Alagón., 1979. Comunicado durante la sesión técnica de la Sociedad Mexicana de Salud Pública. México, D. F.
65. Mazzotti, Li., and Bravo-Becherelle, M.A., 1963. Scorpionisms in the Mexican Republic. In *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Area*. H.L. Keegan and W.V. MacFarlane (Eds.). Pergamon Press, London, pp. 119-131.
66. Milstein, C., 1980. *Investigación y Ciencia* (Barcelona) 51, 39.
67. Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H., and Lissitzky, S., 1970. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpions Androctonus australis Hector, Buthus occitanus tunetanus and Leiurus quinquestratus quinquestratus Eur. J. Biochem. 16:514-523.
68. Moore, S., 1963. J. Biol. Chem. 238, 235-237.
69. Nair, B.R., and Kurup, P.A., 1975. Investigations on the venom of the South Indian scorpion Heterometrus scaber. Biochim. Biophys. Acta 381:165-174.

70. Porath, H., 1968. *Nature*, (London) 218, 834.
71. Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, Jr., P.L., and Erichson, B.W., 1977. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys.* 180:394-403.
72. Possani, L.D., Ramírez, G.A., Fletcher, Jr., P.L., and Gurrola, M. A.H., 1978. Isolation of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides elegans (Thorell). *FEBS Lett.* 91:261-264.
73. Possani, L.D., Fletcher, Jr., P.L., Alagón, A.B.C., Alagón A., C., and Julia J.Z. 1980. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. *Toxicon* 18:175-183.
74. Possani, L.D., Dent, M.A.R., Martin, B.M., Maelicke, A., and Svendsen I., 1981a. The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. *Calsberg Res. Commun.* 46:207-214.

75. Possani, L.D., Fernández de Castro, J., and Juliá, J.Z., 1981b. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (Centruroides noxius Hoffmann) venom. *Toxicon* 19:323-329.
76. Possani, L.D., Martín, B.M., Mochca-Morales, J., and Svendsen, U., 1981c. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. *Calsberg Res. Commun.* 46:195-205.
77. Possani, L.D., Steinmetz, W.E., Dent, M.A.R., Alagón, A.C. and Wuthrich, J., 1981d. Preliminary spectroscopy, characterization of six toxins from the Latin American scorpions. *Biochim. Biophys. Acta* 669:183-192.
78. Possani, L.D., Martín, B.M., and Svendsen, I., 1982. The primary structure of Noxiustoxin: A K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann. *Calsberg Res. Commun.* 47:295-289.
79. Possani, L.D., Martín, B.M., Svendsen, I., Rode, G.S., and Erickson, B.W., 1985. Toxins from the Brazilian

scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello: Primary structure and sequence comparison by metric analysis. Biochem. J.

80. Ray, R., Morrow, C.S., Catterall, W.A., 1978. Binding of scorpion toxin to receptor site associated with voltage-sensitive sodium channel in synaptic nerve endings particles. J. Biol. Chem. 253:7307-7313.
81. Rathmayer, W., Ruhland, M., Tintpolver, M., Walther, C., and Zlotkin, E., 1978. The effect of toxins derived from the venom of the scorpion Androctonus australis Hector on neuromuscular transmission. In: Toxins: Animal, Plant and Microbial, P. Rosenberg (Ed.). Pergamon Press, Oxford, pp. 629-637.
82. Reisfield, R.A., Lewis, U.J., and Williams, D.E., 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature (London) 195:281-283.
83. Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S., and Edman, P., 1970a. The amino acid sequence of neurotoxin I of Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 17: 262-266.

84. Rochat, H., Bernard, P., and Couraud, F., 1979. Scorpion toxins: Chemistry and mode of action. In *Advances in Cytopharmacology*, Vol. 3B. Ceccarelli and F. Clementi; (eds.) Raven Press, New York, pp. 325-334.
85. Rosso, J.P., and Rochat, H., 1982. Characterization from the venom of Androctonus mauretanicus mauretanicus, of ten proteins including six neurotoxins. *Toxicon* 20:76-77.
86. Scopes, R., 1982. *Protein Purification, principles and practice*, Springer-Verlag, New York, 282p.
87. Sevier, E.D., David, G.S., Martinis, J., Desmond, W.J., Bartholomew, R.M., Wang, R., 1981. *Monoclonal Antibodies in Clinical Immunology*, Clin. Chem. 27/11.1797-1806.
88. Sitges, M., Possani, L.D., Bayón, A., Noxiustoxin a short chain toxin from the mexican scorpion Centruroides noxius, induces transmitter release by blocking  $K^+$  permeability. (en prensa).
89. Shulov, A., 1958. On the poison scorpions in Israel. *Harefuah* 49:1-3.

90. Toledo, D., and Neves, A.G.A., 1976. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion Tityus serrulatus. *Comp. Biochem. Physiol.* 55B:249-253.
91. Van Regenmortel, M.H., 1986. Which structural features determine protein antigenicity? *TIBSS* 11 36-39.
92. Vargas, O., Gregoire, J., Martin, M.F., Bechis, and Rochat, H., 1982. Neurotoxins from the venoms of two scorpions: Buthus occitanus tunetanus and Buthus occitanus mardochei. *Toxicon* 20:79.
93. Watt, D.D., Simard, J.M., Babin, D.R., and Mlejnek, R.V., 1978b. Physiological characterization of toxins isolated from scorpion venom. In: *Toxins: Animal, Plant and Microbial*, P. Rosenberg (Ed.) Pergamon Press, Oxford, pp. 647-660.
94. Watters, J.J., Possani, L.D., Mochca-Morales, J., and Hess, B., 1982. Determination of alpha-helix and beta-sheet structure in toxins purified from the venoms of Latin American scorpions. *Toxicon* 20:81.

95. Zhdanova, L.N., Adamovich, T.B., Nazimov, I.V., Grishin, E.V., and Ovchinnikov, V.A., 1978. Amino-acid sequence of insectotoxin I-1 from the venom of the Central Asian scorpion *Buthus eupeus*. *Sov. J. Bioorg. Chem.* (Engl. transl. *Bioorg. Khim.*) 3(4):366-372.
96. Zlotkin, E., Miranda, F., and Rochat, H., 1978. Chemistry and Pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 48, Arthropod Venoms*, S. Pettini (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 317-369.
97. Zlotkin, E., Lester, D., Lazarovich, P., and Pelhate, M., 1982. The chemistry and axonal action of two insect toxins derived from the venom of the scorpion *Buthotus judaicus*. *Toxicon* 20:323-331.