

00562  
4  
15

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS CORRESPONDIENTES A  
SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE TOXINAS DE ALACRAN  
Y SUS PROPIEDADES.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;  
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS  
(BIOQUIMICA)

GEORGINA GURROLA BRIONES

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## RESUMEN

El veneno del alacrán de Nayarit *C. noxius* Hoffmann ha sido estudiado desde hace algún tiempo en nuestro laboratorio, habiéndose purificado y caracterizado químicamente la mayoría de sus toxinas (Possani y col. 1981). Debido a que algunas de estas toxinas tienen acción sobre canales iónicos, se decidió hacer síntesis química de regiones análogas a secuencias de aminoácidos de estos péptidos y estudiar sus propiedades tóxicas e inmunogénicas.

Se sintetizaron los péptidos correspondientes a la secuencia amino terminal de las toxinas II-11 (un nonapéptido  $\text{Tre}_1\text{-Ser}_9$  y un péptido de veinte aminoácidos  $\text{Tre}_1\text{-Leu}_{20}$ ) y II-9.2.2 (un decapeptido  $\text{Lis}_1\text{-Tre}_{10}$ ).

De la porción carboxilo terminal de la toxina II-11 se sintetizó la correspondiente a los aminoácidos  $\text{Met}_{30}\text{-Asn}_{39}$ ,  $\text{Tir}_{21}\text{-Asn}_{39}$  (la mitad de la toxina),  $\text{Lis}_{11}\text{-Asn}_{39}$  y la toxina completa  $\text{Tre}_1\text{-Asn}_{39}$ . La síntesis se realizó siguiendo el método de fase sólida descrito por Merrifield y col., 1963.

Todos los péptidos se pasaron por cromatografía líquida de alta resolución usando una columna de exclusión molecular I-125 Whatman.

Los péptidos correspondientes a las regiones amino terminal de ambas toxinas solos y acoplados a albumina de ratón, resultaron ser tóxicos en ratones.

Se probó la inmunogenicidad de todos los péptidos en ratones de la cepa -- BALB/c, obteniendo anticuerpos en todos los casos, que fueron detectados por inmunodifusión.

Se estudió el reconocimiento de estos anticuerpos anti-péptido sobre la -- toxina nativa, por radioinmunoanálisis y por inmunoensayo enzimático, encontrando que solo los anticuerpos anti-toxina sintética completa, fueron capaces de reconocer a la toxina nativa, por ambos métodos.

Se hicieron estudios de competencia de anticuerpos anti-toxina nativa por la toxina nativa marcada con  $^{125}\text{I}$  y los diferentes péptidos sin marcar, observando que solo la toxina sintética completa es capaz de desplazar a la toxina nativa y en menor grado la secuencia correspondiente a las tres cuartas partes de la toxina ( $\text{Lis}_{11}\text{-Asn}_{39}$ ).

Los mismos resultados de competencia se obtuvieron por el método de inmunoensayo enzimático, adhiriendo la fracción II-11 del veneno de *C. noxius* a la fase sólida.

El análisis de hidrofiliicidad indica que una de las regiones más expuestas es la comprendida entre  $\text{Val}_5$  y  $\text{Glu}_{19}$ .

## A B S T R A C T

We have purified to homogeneity several toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann (Possani et. al., 1981). These toxins have shown that they interfere with ionic channels in neurons.

Our laboratory is concerned with the elucidation and characterization of the antigenic and toxic sites of these toxins.

We have synthesized, by the solid phase procedure (Merrifield et. al., 1965) six peptides. They mimic amino and carboxi terminal regions of toxin II-11 of the scorpion C. noxius (Thr<sub>1</sub>-Ser<sub>9</sub>, Thr<sub>1</sub>-Leu<sub>20</sub>, Met<sub>30</sub>-Asn<sub>39</sub>, Tyr<sub>21</sub>-Asn<sub>39</sub>, Lys<sub>11</sub>-Asn<sub>39</sub> and the whole toxin Thr<sub>1</sub>-Asn<sub>39</sub>) and one peptide Lys<sub>1</sub>-Thr<sub>10</sub> from toxin II-9-2.2.

All the peptides were separated by High Performance Liquid Chromatography on a gel filtration column (1-125 Whatman).

Of all peptide tested, only Thr<sub>1</sub>-Ser<sub>9</sub> and Thr<sub>1</sub>-Leu<sub>20</sub> were found toxic in mice.

All peptides were antigenic in mice. Only the antiserum raised again whole synthetic toxin recognized to native toxin.

We have shown that the synthetic replic of the Noxiustoxin was recognized by antiserum raised again native toxin.

In order to find the point of greated local hydrophilicity the primary structure was analyzed by the Hopp and Woods method, and it was located within residues Val<sub>5</sub>-Glu<sub>9</sub>.

## C O N T E N I D O

### I. INTRODUCCION.

1. Toxinas del Veneno de Alacrán.
  - A. El Alacrán C. noxius.
2. Estrategias para Estudio de Estructura-Función de Proteínas.
  - A. Efecto de la Sustitución de Aminoácidos.
  - B. Síntesis de Péptidos.

### II. OBJETIVOS.

### III. MATERIAL Y METODOS.

1. Síntesis de Péptidos en Fase Sólida.
  - A. Síntesis de Boc-aminoácido-Pam-Resina.
    - a. Preparación de la sal de cesio de Boc-asparagina.
    - b. Acoplamiento del Boc-aminoácido con el bromuro de fenacil ester.
    - c. Reducción con Zn/acético.
    - d. Acoplamiento del Boc-Asn-fenilacético a la amino metil resina.
  - B. Acetilación de Grupos Amino Libres.
  - C. Separación de los Péptidos de la Resina por Tratamiento con Acido Fluorhídrico.
2. Pruebas de Toxicidad.
  - A. Acoplamiento de los Péptidos a Albúmina.
3. Obtención de Antisuecos.
  - A. Obtención de Anticuerpos anti-Péptido.
  - B. Obtención de Anticuerpos anti Noxiustoxina Nativa.
4. Técnicas Inmunoquímicas.
  - A. Radioinmunoanálisis (RIA).
    - a. Titulación de antisuecos.
    - b. Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos con Noxiustoxina.

- B. *Immunoensayo Enzimático (ELISA).*
  - a. *Titulación de Antisueros.*
  - b. *Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos con NTX nativa.*
- 5. *Separación de los Péptidos Sintéticos por HPLC.*
- 6. *Análisis de Aminocidos.*
- 7. *Análisis de Hidrofobicidad.*

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

- 1. *Péptidos Sintéticos.*
- 2. *Purificación de los Péptidos Sintéticos.*
- 3. *Toxicidad de los Péptidos Sintéticos.*
- 4. *Pruebas Inmunológicas.*
  - A. *Detección de Anticuerpos anti-Péptidos Sintéticos.*
  - B. *Titulación de Antisueros y Pruebas de Competencia por RIA.*
  - C. *Titulación de Antisueros y Pruebas de Competencia por ELISA.*

#### V. CONCLUSIONES.

#### VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.

#### VII. BIBLIOGRAFIA.

- VIII. ARTICULO: *Garrola G. B., Molinar-Rode R., Zentella A. D. y Possani L. D.*  
*"Síntesis de Péptidos y su Posible Utilización como Vacunas contra Toxinas de Alacrán".*

## I. INTRODUCCION.

La comprensión de las funciones biológicas de las proteínas es un punto importante en bioquímica. Las proteínas desempeñan su función, independientemente de su naturaleza, mediante su unión a una molécula blanco para formar un complejo. Este complejo puede ser transitorio, parecido al de una enzima con su sustrato o puede ser muy estable y virtualmente irreversible, como el de la haptoglobina con hemoglobina o puede poseer estabilidad que cae algunas veces entre estos dos extremos. En algunos casos la determinación de los parámetros estructurales de un sitio de unión es crítico para el entendimiento del modo de acción de la proteína.

Los primeros sitios de unión de proteínas que han sido completamente delineados y sintetizados, son aquellos que están involucrados en la unión de una proteína antigénica con su anticuerpo. Estas regiones (sitios antigénicos) han servido como modelo para hacer regiones sintéticas que imitan otros sitios de unión de la proteína.

La expresión de la acción biológica de algunas neurotoxinas del veneno del alacrán Centruroides noxius colectado en Nayarit ha sido estudiada. Las toxinas llamadas 11-10 y 11-11 de este veneno ejercen efectos significativos sobre las propiedades electrofisiológicas del axon gigante de calamar (Carbone y col., 1982). En presencia de anticuerpos neutralizantes contra las toxinas, estas no expresan su actividad biológica. Esto es bien ilustrado por el hecho de que el tratamiento más efectivo contra el envenenamiento producido por la picadura del alacrán, es el uso de un antiveneno (Del Pozo, 1962). Esta observación implica que en la presencia de anticuerpos específicos contra la región molecular de la toxina, responsable de la interacción específica con el blanco fisiológico, se hace inaccesible o conformacionalmente diferente.

Obviamente una comprensión clara a nivel molecular de este problema, requiere de la elucidación de los sitios tóxicos e inmunogénicos de las toxinas.

Este trabajo reporta los resultados preliminares, tratando de estudiar estos aspectos, en el caso particular de la toxina 11-11 aislada y caracterizada químicamente del veneno del alacrán C. noxius:

Una aproximación general para definir un sitio antigénico o un sitio de interacción de una proteína con su anticuerpo correspondiendo a la región blanco donde ejerce su acción cierta proteína, ha sido por fragmentación de proteínas con técnicas enzimáticas y químicas y determina cuál fragmento conserva la capacidad de interactuar con su anticuerpo o su receptor. Una vez que esta región ha sido identificada, se puede caracterizar por comparación de reactividad de la proteína química o biológicamente modificada o de sus fragmentos. Finalmente la síntesis química de estas regiones puede ser usada para identificar que aminoácidos, estructuras o confor-

maciones participan en la unión de los anticuerpos a su receptor.

Otra aproximación importante es la observación de la reactividad inmunológica cruzada de familias de proteínas de diferentes especies, con secuencias homólogas, mostrando la importancia de residuos variantes evolutivamente. Estos estudios han demostrado que la sustitución de un simple aminoácido puede hacer inmunogénica una región sobre la superficie de una molécula de proteína, tal como la lisozima (Takagaki y col., 1980), la hemoglobina (Leach, 1983) y citocromo C (Jemmerson y Margoliash, 1979a, b).

La interacción proteína-proteína es un proceso complejo que involucra características de la superficie molecular, incluyendo la forma, complementariedad e hidrofobicidad de las superficies moleculares que están interaccionando (Tainer J. y col., 1984).

### 1. Toxinas del Veneno de Alacranes.

Los primeros estudios sobre veneno de alacrán fueron motivados principalmente por la importancia médica de la picadura de alacrán, en varias regiones del mundo - como la región norte de África, México y Lejano Oriente. Los primeros venenos analizados fueron aquellos de unas cuantas especies que son peligrosas para el hombre. Considerando la cantidad limitada de veneno que un alacrán puede inyectar y el cuadro clínico dramático que puede resultar de una simple picadura, es obvio que el veneno del alacrán puede contener componentes altamente activos cuya purificación es deseable en orden a determinar su estructura y a elucidar su modo de acción. Así fue como una familia de proteínas neurotóxicas se caracterizó. Más datos sobre estos compuestos pueden hacer de ellos, herramientas útiles en neurobiología.

En general el veneno de los alacranes es de apariencia lechosa opalescente y con un pH alrededor de 7. El veneno obtenido por estimulación eléctrica del telson del alacrán, disuelto en agua contiene un material insoluble que puede separarse por centrifugación y carece de toxicidad. Al parecer son mucoproteínas y desechos celulares como membranas, aunque la composición no ha sido estudiada. La parte soluble contiene todos los componentes tóxicos y consiste en su mayor parte de una mezcla de proteínas y péptidos de diferentes pesos moleculares y en menor cantidad lípidos, nucleótidos, sales orgánicas y aminoácidos libres.

Aunque se encuentran presentes algunas enzimas, la acción letal del veneno se atribuye principalmente a una serie de polipeptidos neurotóxicos que difieren en el grado de toxicidad y composición de aminoácidos. El término neurotoxina se refiere a aquellas proteínas o polipeptidos que bloquean la transmisión sináptica al combinarse con las membranas del sistema nervioso (Babin y col., 1974).



Las toxinas del veneno del alacrán son proteínas muy estables, como se ha observado por experimentos de termodesnaturalización, seguido por dispersión óptica rotatoria, los que han mostrado que las toxinas de los alacranes mexicanos y brasileños son moléculas altamente empaquetadas y estabilizadas por puentes disulfuro. Algunas toxinas del veneno de los alacranes del género Centruroides, al hervirse por 5 minutos vuelven a replegarse tridimensionalmente conservando su toxicidad (Possani y col., 1981).

Nuestro laboratorio, ha caracterizado el veneno de alacranes del género Centruroides y ha purificado varias toxinas de las especies C. noxius (Dente y col., 1980), (Possani y col., 1981), C. elegans (Possani y col., 1978) y C. limpidus teomanus (Possani y col., 1980) y ha obtenido la secuencia completa de varias de ellas así como la secuencia N-terminal de otras.

Las secuencias N-terminal de las diferentes toxinas estudiadas, se han agrupado hasta el momento en nuevos grupos estructurales con base a los aminoácidos faltantes (Rochat y col., 1970), (Possani y col., 1985) además se ha encontrado que en estas secuencias N-terminal existe un 50% de homología entre ellas. Este alto grado de homología sugiere que la conservación de estos aminoácidos juega un papel importante en las funciones biológicas, dado que pueden constituir el sitio activo, ser esenciales para mantener la conformación o servir para el doblamiento de la cadena peptídica (Zlotkin y col., 1971).

Es probable que la presencia de cuatro puentes disulfuro en las proteínas tan pequeñas sean responsables de la gran estabilidad de estas toxinas. La localización de los puentes disulfuro es por lo tanto muy importante por el papel que juegan en la relación estructura función.

Con el objeto de obtener información sobre el sitio de acción, se han llevado a cabo varias modificaciones químicas sobre algunas toxinas conocidas, encontrando que la reducción de los puentes disulfuro, modificación de carboxilos y acetilación de grupos amino nulifican la actividad de estas toxinas, sugiriendo así la importancia de algunos aminoácidos sobre la toxicidad (Sampieri y col., 1975, Chicheportiche y Lazdunski, 1970, Rochat y Sampieri 1976).

La utilización de las toxinas como herramientas para estudios neurofisiológicos surgió a principios de 1960 con el estudio de la Tetrodotoxina, que bloquea específicamente el canal de sodio (Narahashi y col., 1964, 1969). Esto estimuló el estudio de una variedad de neurotoxinas de diversos animales entre ellos las de los alacranes, para el empleo de la acción de estas sobre los canales iónicos con el fin de poder caracterizarlas funcionalmente sobre las membranas nerviosas.

Se han publicado diversos trabajos del efecto del veneno de los alacranes sobre tejidos excitables, encontrando que algunas toxinas actúan sobre canales lo-

nicos dependientes de voltaje. Las toxinas de algunos alacranes africanos incrementan la activación de los canales de sodio (Catterall, 1977).

Puede decirse que en México existen seis especies de alacranes ponsoñosos para el hombre: del género Centruroides (Hoffmann, 1938), C. sculpturatus, C. suffusus con dos subespecies, C. s. cherambigli y C. s. suffusus, C. limpidus limpidus y el C. l. tecomanus, C. elegans con dos subespecies el C. e. insularis y el C. e. elegans, C. ingamatus y el C. noxius.

#### A. El Alacrán Centruroides noxius.

Es uno de los alacranes más interesantes por ser el más ponsoñoso citado hasta el momento, teniendo una dosis letal de 0.25-mg/kg de peso para el ratón.

Del veneno de C. noxius se han aislado siete fracciones principales que contienen polipeptidos tóxicos para el ratón. Las toxinas aisladas hasta el momento presentan ciertas características en común en su composición de aminoácidos. Son proteínas básicas, con un peso molecular alrededor de 7000 y contienen entre 39 o 65 residuos de aminoácidos, presentan 8 cisteínas como la mayoría de las toxinas descritas hasta el momento, a excepción de la toxina IV-2 que al parecer tiene 6 cisteínas, no contiene metionina excepto la toxina II-14 y la II-11 que presentan 1.

Las toxinas del género Centruroides presentan zonas de alta homología entre los residuos 1-5, 8-10, 18-20, 21-25 y la posición de las cisteínas, a excepción de la toxina II-11.

La Noxiustoxina que tiene 39 aminoácidos, contiene 6 cisteínas y una metionina es totalmente diferente a todas las toxinas citadas hasta el momento en la literatura, posiblemente pertenezca a una familia de toxinas diferentes (Possani y col., 1982).

Estudios recientes con el veneno de C. noxius, utilizando axones gigantes de calamar, demostraron la existencia de dos toxinas denominadas II-10 y II-11, que en contraste con el veneno de los alacranes africanos, actúan específicamente sobre el canal de sodio y de potasio respectivamente. La II-10 decrece la permeabilidad al sodio y la II-11 bloquea totalmente el canal de potasio. Ambas actúan independientemente del voltaje y son totalmente reversibles (Carbone y col., 1982).

En la siguiente sección de este trabajo se encuentran copias del artículo "Síntesis de péptidos y su posible utilización como vacunas contra toxinas de alacrán", en el cual se hace una amplia descripción de la purificación y caracterización química de las toxinas del veneno del alacrán C. noxius, por lo que aquí no las mencionaré.

## 2. Estrategias para Estudios de Estructura-Función de Proteínas.

Debido a la complejidad de la estructura de las proteínas, los sitios antigénicos así como las regiones de interacción con otras proteínas, no pueden determinarse fácilmente. Se han propuesto varias estrategias para el estudio de estas regiones:

a) Estudiar los efectos de cambios conformacionales sobre la inmunquímica de las proteínas.

b) Estudios de conformación e inmunquímica de derivados químicos específicos de las proteínas.

c) Aislamiento y estudio de fragmentos de proteína que se superpongan para identificar porciones inmunquímicamente reactivas.

d) Estudiar la inmunquímica y conformación de derivados químicos específicos de péptidos que son inmunquímicamente reactivos.

e) Verificar la localización y posteriormente delinear los sitios antigénicos deducidos por los pasos anteriores, por síntesis de estas regiones (Atassi., 1984)

Otra estrategia importante, es el análisis de la secuencia de las proteínas en relación a un índice de hidrofobicidad (Chou y Fasman, 1984). (Hopp y Woods, 1981), este análisis correlaciona los sitios antigénicos con hidrofobicidad máxima. Sin embargo esta relación no siempre se cumple. Por ejemplo en el caso de la mioglobina (Mb) el análisis de hidrofobicidad revela que solo dos de los sitios antigénicos coinciden con hidrofobicidad máxima y otra zona de máxima hidrofobicidad no es antigénica (Atassi., 1975).

Los resultados del estudio de la estructura antigénica de la Mb es una indicación de que todos los sitios antigénicos están expuestos pero no todas las regiones expuestas constituyen un sitio antigénico. El estar expuesto no es criterio suficiente de antigenicidad, por lo tanto, los sitios antigénicos no necesariamente son zonas de alta hidrofobicidad. Las interacciones hidrofóbicas, frecuentemente, proveen mayor contribución a la energía de unión por ejemplo en las cadenas alfa y beta de la Hb, el sitio más inmunodominante no es el de máxima hidrofobicidad (Kazim y Atassi, 1982). En el caso de la hemaglutinina del virus de la influenza, se ha localizado un sitio fuertemente inmunodominante el cual es enteramente hidrofóbico (Atassi y Websler 1983); Se encontraron dos regiones sobre el citocromo C, que en base a su hidrofobicidad se esperaban que fueran inmunogénicos, pero resultaron no ser antigénicos, (Atassi, 1981).

### A. Efecto de la Sustitución de Aminocidos.

Las alteraciones de la naturaleza química de una cadena lateral dentro del sitio antigénico (remoción o reversión de una carga, creación de una nueva carga,

eliminación de un puente de hidrógeno, etc.) causadas por modificaciones químicas o cambios evolutivos en una proteína homóloga, pueden causar una reducción o eliminación total de la reactividad de una región en una proteína.

La extensión de la modificación de la reactividad depende de la naturaleza de los cambios químicos, la localización del residuo que está siendo sustituido o modificado y la contribución de este residuo a la energía total de unión o interacción.

Modificaciones química de algunos residuos de aminoácidos trifuncionales en las toxinas I, II y III del alacrán Androctonus australis Héctor indican: que la reducción y metilación de un enlace disulfuro destruye la actividad tóxica de la toxina II; el único residuo de triptofano no está incluido en el sitio activo de la molécula. La modificación de cinco de los siete carboxilos que tiene la molécula de la toxina II suprime su toxicidad, la acetilación de los residuos de lisina y tirosina en esta toxina conducen a la pérdida de la actividad tóxica e inmunogénica. El tratamiento de la toxina acetilada con hidroxilamina restaura parcialmente la actividad antigénica, la guanidinación de la toxina II no afecta su toxicidad significativamente. La alquilación de esta toxina por ácido iodoacético afecta tanto los grupos amino como los residuos de histidina. Se concluye que al menos una tirosina puede estar involucrada en un sitio antigénico de la toxina II, la pérdida de la toxicidad se debe principalmente a modificaciones en los residuos de lisina (Rocha y Sampieri, 1976).

Además de las modificaciones realizadas directamente en el sitio antigénico o la región tóxica, cuyos efectos son fácilmente observados, las sustituciones que involucran residuos fuera de estas regiones pueden causar efectos considerables, ya sea por cambios conformacionales o por inducir alteraciones en las propiedades químicas de la proteína. (Atassi, 1984).

Una sustitución aunque sea distante del sitio, puede causar un reajuste conformacional que puede influir en su reactividad, por ejemplo en la mioglobina y hemoglobina, alteraciones químicas en los residuos que interaccionan con el grupo hemo (que se encuentra fuera de los sitios antigénicos) modifican su reactividad antigénica (Reichlin M., y col., 1963).

Para la lisozima se ha demostrado que la nitración de una tirosina fuera del determinante antigénico (Tir 20) pero dentro de una distancia de interacción de los residuos esenciales de contacto (Lis 96, 3.6 Å; Lis 97 5.9 Å) crea un efecto electrostático inductivo que cambia la reactividad del sitio (Atassi M., 1978).

## B. Síntesis de Péptidos.

La localización de determinantes antigénicos continuos en proteínas se basa en medir la reactividad de péptidos naturales o sintéticos de la molécula. Generalmen-

te los fragmentos se prueban por su capacidad para inhibir la reacción entre anticuerpo y antígeno completo.

Se cree que para que un péptido induzca la producción de anticuerpos capaces de reaccionar con la proteína intacta que contiene la secuencia del péptido era necesario que el péptido reprodujera la conformación terciaria del sitio antigénico de la proteína intacta. Un ejemplo es el sitio antigénico de la lisozima que comprende los residuos [64-80], para el cual fue necesario sintetizar el péptido con una estructura covalente cerrada. (Maron E, y col., 1971; Pecht y col., 1971).

Esta consideración restringe la utilidad de usar los péptidos sintéticos para estudios de estructura-función de proteínas, debido a que se requiere gran información sobre la estructura terciaria de las proteínas. La reciente explosión en el número de tipos de aplicaciones de los péptidos sintéticos es debido en parte a que se ha demostrado que péptidos correspondientes a alguna región de la proteína pueden inducir anticuerpos que reaccionan con la proteína nativa y no necesariamente reproducen con exactitud la conformación terciaria que tiene esta región en la proteína. Por ejemplo en estudios de la hemaglutinina del virus de la influenza - se sintetizaron 20 péptidos que corresponden al 75% de la secuencia total. De estos péptidos 18 fueron capaces de producir anticuerpos que reconocen a la proteína intacta y al virus completo, pero ninguno de los 20 péptidos fue capaz de reaccionar con anticuerpos inducidos contra la proteína intacta (Green y col., 1982).

Se ha observado que ciertas características de los péptidos son importantes para que éstos sean inmunogénicos:

Los extremos amino y carboxi-terminal de diferentes proteínas muestran un alto promedio de actividad antigénica, posiblemente debido a que ellos están localizados en la superficie y tienen relativamente alta flexibilidad (Westhof y col., - 1984).

Las regiones que tienen suficiente número de residuos polares o cargados por lo general son regiones que tienden a estar en la superficie de la proteína nativa.

Los péptidos deben ser mayores a un pentámero, debido a que los péptidos cortos tienden a no ser inmunogénicos (Mimman H. L. y col., 1983).

Se ha visto que los péptidos que contienen prolina, producen anticuerpos que reaccionan con la proteína intacta (Sutcliffe J. y col., 1983).

En trabajos hechos con el citocromo C de rata, se ha demostrado que la conformación nativa no es esencial para que los péptidos sintéticos unan a los anticuerpos inducidos contra la proteína entera, concluyendo que la energía de asociación entre antígeno y anticuerpo puede ser suficiente para inducir conformación en péptidos flexibles conformacionalmente (Petersson V., 1985).

Se han usado anticuerpos anti-péptido sintético para investigación del papel

de la flexibilidad conformacional en el proceso de reconocimiento proteína-proteína (Tainer J. y col., 1984).

El grupo de Atassi que ha estudiado la estructura casi total de la lisozima, la mioglobina, albúmina y hemoglobina, conociendo ya los determinantes antigénicos de estas proteínas y sintetizando estas regiones, realiza trabajos de interacción de éstas con sus respectivos receptores sobre células T y B para estudiar los mecanismos de respuesta inmune (Atassi M. Z., 1984, Bixter y Atassi, 1984).

Además de los trabajos relacionados con el estudio de determinantes antigénicos en virus, bacterias y proteínas, también se están usando en el estudio de toxinas como la toxina del cólera (Jacob y col., 1984, Rhodes y col., 1985), y la toxina II del veneno del alacrán Androctonus australis Héctor (Granier C. y col., 1984)

Una descripción mas amplia de los trabajos más relevantes sobre el uso de péptidos sintéticos para estudios de regiones concretas en diversas proteínas, se encuentran en el inciso VIII, el que corresponde al artículo titulado "Síntesis de péptidos y su posible utilización como vacunas contra toxinas de alacrán". En este mismo artículo se encuentran también, una explicación completa de los pasos de purificación y caracterización de la Noxiustoxina y una descripción del método de síntesis de péptidos en fase sólida propuesto por Merrifield. Por esta razón no se incluyen en esta parte del trabajo.

## II. OBJETIVOS.

Como ya se mencionó, este trabajo se refiere de manera especial a la toxina II-II del veneno del alacrán C. noxius, teniendo por objetivos principales:

- 1.- La purificación de esta toxina a partir de veneno total extraído del alacrán por estimulación eléctrica.
- 2.- La síntesis química de fragmentos de esta toxina, así como su síntesis total.
- 3.- La obtención de anticuerpos contra los péptidos.
- 4.- Caracterización inmunológica y tóxica de estos fragmentos por medio de pruebas de competencia y toxicidad respectivamente.
- 5.- En base a los resultados obtenidos en los objetivos planteados anteriormente, proyectar el trabajo futuro del laboratorio con relación a la síntesis química de secuencias peptídicas correspondientes a diversas toxinas del veneno de alacranes, en especial los que habitan en México.

## III. MATERIAL Y METODOS.

### 1. Síntesis de Péptidos en Fase Sólida.

#### A. Síntesis de *ter*-Butiloxicarbonilaminoácil-4-(oximetil)fenilacetamidometil-Resina (Boc-aminoácido-Pam-Resina).

Los péptidos se sintetizaron siguiendo el método de Merrifield para la formación de Boc-aminoácido-Pam-Resina. (Mitchell A. R. y col., 1978), ver figura 1.

#### a. Preparación de la Sal de Cesio de Boc-asparagina.

Se disolvieron 1.3 mmoles de Boc-Asn (Peninsula Co.) en 0.5 ml de metanol. Se agregó gota a gota y se agitó 1.43 mmoles de carbonato de cesio disueltos en un mililitro de agua. La sal de cesio del aminoácido así formada se concentró en rotavapor, eliminando el agua con tolueno. Se dejó secar en vacío en presencia de pentóxido de fósforo por dos horas.

#### b. Acoplamiento del Boc-aminoácido con el Bromuro de Fenacil Ester.

La sal de cesio del aminoácido se disolvió en 10 ml de dimetilformamida (DMF) tibio y se agregó 1.1 equivalentes por cada equivalente de aminoácido, de bromuro de fenacil ester. La reacción se llevó a cabo a 50°C y con agitación. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina (CCF), usando el sistema acetato de etilo-hexano 2:3. El producto se extrajo con 25 ml de acetato de etilo, lavando dos veces con agua, dos con ácido acético al 5%, dos con agua, dos con bicarbonato de sodio al 5% y finalmente dos veces más con agua. A la fase orgánica se le agregó sulfato de magnesio anhidro para eliminar el agua remanente. El producto se concentró en rotavapor.

#### c. Reducción con Zn/acético.

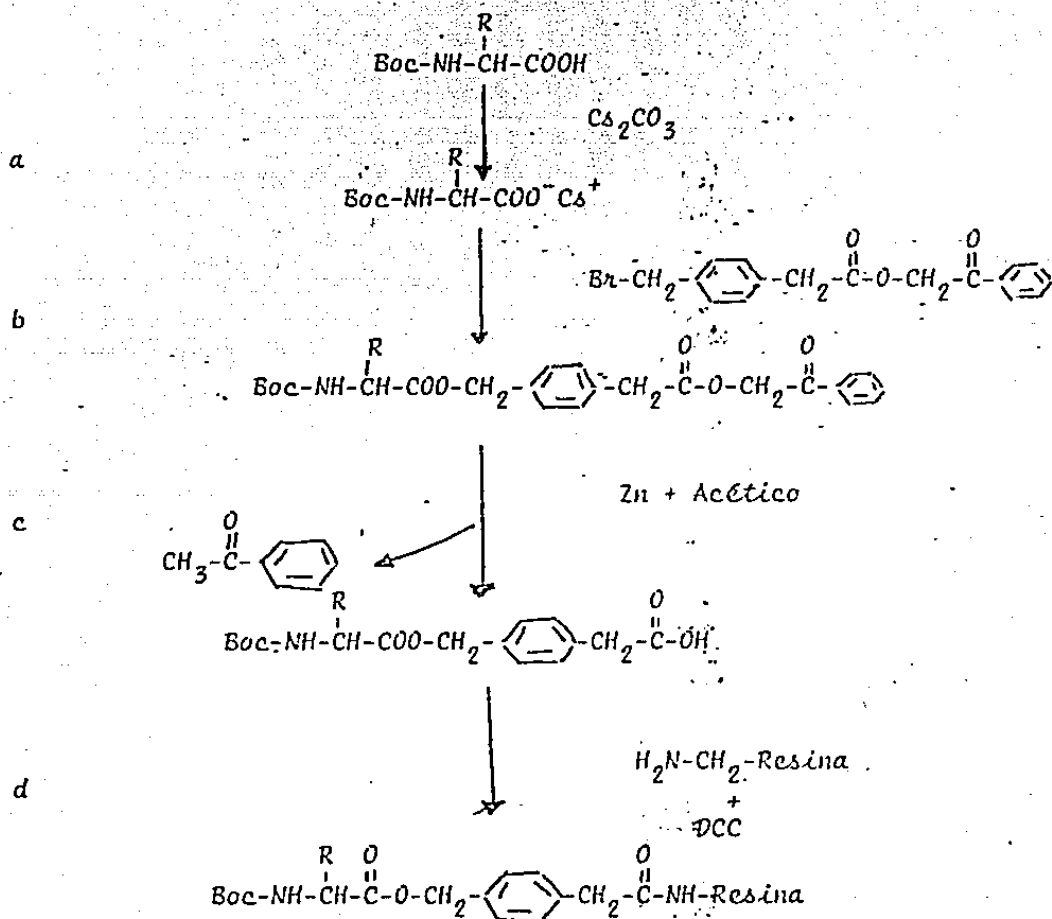
En 30 ml de ácido acético glacial al 90% se disolvió el fenacil ester del aminoácido, se añadieron 40 equivalentes de zinc en polvo por cada equivalente de aminoácido, se dejó en agitación vigorosa, siguiendo la reacción por CCF utilizando el sistema cloroformo-metanol-acético 10:0.5:0.1. Cuando la reacción se llevó a cabo totalmente, la mezcla de reacción se filtró por celita y se lavó cinco veces con 15 ml de ácido acético al 90%; el filtrado se concentró en rotavapor y se dejó en desecador con pentóxido de fósforo por dos horas.

El producto se disolvió en una mezcla de agua y acetato de etilo y se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio por dos veces, la fase orgánica se lavó dos veces más con ácido clorhídrico al 5% y se eliminó el exceso de agua con sulfato de magnesio anhidro. Después se concentró a un mínimo de volumen y se agregaron 50



FIGURA 1

Preparación de Boc-aminoácido-Pain-Resina



militros de hexano calentado a 50°C y se congeló en un baño de hielo seco-acetona con el objeto de precipitar el producto y poder decantar el hexano que contiene la acetofenona liberada en la reacción. Esta operación se repitió tres veces, para eliminar el máximo de acetofenona.

#### d. Acoplamiento del Boc-Asn-bencilacético a la Amino Metil Resina.

La amino metil resina se lavó tres veces con cloruro de metileno, dos veces -- con trietilamina al 5% y nuevamente con cloruro de metileno tres veces. El derivado de aminoácido se disolvió en 10 ml de DMF más 20 ml de cloruro de metileno y se agregó a la resina dejándose en agitación por 10 minutos, transcurridos estos se agregaron 1.3 mmoles de hidroxibenzotriazole y se dejó en agitación. Después de diez minutos, se agregaron 5 gotas de trietilamina y 1.3 mmoles de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) dejando en agitación a temperatura ambiente por 36 horas.

#### B. Acetilación de los Grupos Amino Libres.

A la resina con el aminoácido pegado (Boc-Asn-Pan Resina) se le agregaron dos mililitros de piridina y dos mililitros de anhídrido acético. Después de 12 horas de agitación a temperatura ambiente se lavó la resina tres veces con cloruro de metileno, dos con isopropanol y tres con cloruro de metileno.

A partir de este momento se procedió a acoplar uno a uno los aminoácidos de acuerdo a la secuencia deseada, siguiendo los pasos de desprotección, neutralización y acoplamiento de acuerdo al esquema de la figura 2.

El control de cada acoplamiento se realizó determinando los grupos amino libres siguiendo la técnica de Sarin y col., 1981.

Para el trabajo descrito en esta tesis se sintetizaron los péptidos indicados en la tabla I.

Los péptidos correspondientes a la secuencia carboxilo terminal de la Noxiustoxina, se sintetizaron a partir de la misma resina, al completar el péptido deseado se tomó parte de la resina y con el resto se continuó la síntesis del siguiente péptido. Se empezó con tres gramos de resina y se sacó un gramo cada vez.

Para el péptido correspondiente a los primeros veinte aminoácidos (NTX<sub>1-20</sub>), se preparó igualmente la Pan-Resina, solo que con el aminoácido Leucina, partiendo de medio gramo de resina.

El péptido NTX<sub>1-9</sub>, se sintetizó a partir de cloro-metil-Resina como se describe en el artículo del inciso VIII.

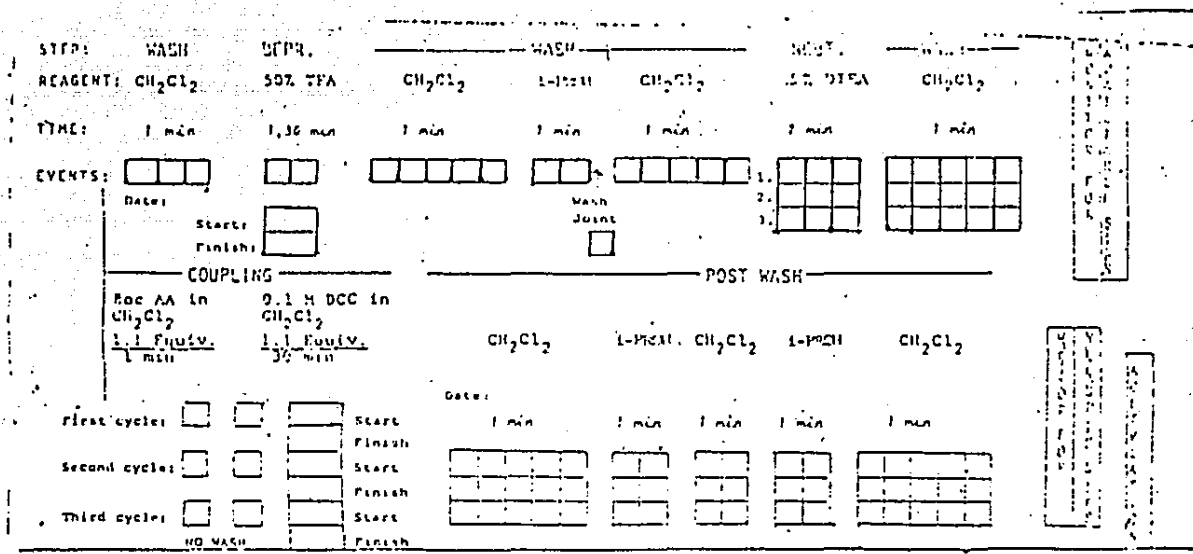


Figura 2. Esquema de acoplamiento de aminoácidos en síntesis de péptidos en fase sólida.

### C. Separación de los Péptidos de la Resina por Tratamiento con Acido Fluorhídrico.

La reacción con ácido fluorhídrico se llevó a cabo en un aparato especial (Península Tipo II). Se colocó la resina con el péptido en un recipiente de este aparato y se le agregó 90% en volumen de ácido y 10% en volumen de anisol, se dejó la reacción por 45 min. en agitación en un baño de hielo-agua (0°C).

Se evaporó totalmente el ácido y se procedió a extraer el péptido que quedó adherido a la resina, lavándose primero con 100 ml de éter etílico para eliminar el anisol y extrayendo después con 100 ml de ácido acético al 3% con un equivalente de ditiotreitól por cada cisteína presente en la secuencia. Se evaporó el ácido acético y se liofilizaron los péptidos.

#### 2. Pruebas de Toxicidad.

La toxicidad de los péptidos sintéticos, se probó por inyección intraperitoneal, de los péptidos solos o acoplados a albúmina, a ratones albinos de 18 a 20 - gramos de peso, mismos que son sensibles a la toxina nativa.

El péptido NTX<sub>1-9</sub> se probó además por inyección ventricular (cerebral) y subcutánea.

##### A. Acoplamiento de los Péptidos a Albúmina. (Goodfriend T. L. y col., 1964).

Se disolvieron 10 mg de albúmina de ratón y 20 mg de péptido juntos en 0.5 ml de agua. A esta mezcla se le agregó 150 mg de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida disuelta en 0.25 ml de agua. La mezcla se dejó reaccionar por dos horas con agitación a temperatura ambiente. La reacción se terminó por diálisis contra - agua por 24 horas.

#### 3. Obtención de Antisuecos.

##### A. Obtención de Anticuerpos anti-péptido.

Se formaron dos lotes de ratones albinos hembras de la cepa BALB/c, con grupos de 10 ratones cada uno. Un lote se inmunizó con los péptidos solos y el otro - con los péptidos acoplados a albúmina de ratón, siguiendo el esquema de la tabla V.

Los péptidos correspondientes al extremo amino terminal acoplados a albúmina, resultaron ser tóxicos, por lo que se inyectaron sólo 50 ug en lugar de 200 ug como con los demás péptidos.

Los ratones se sangraron por punción ocular, después de la tercera inmunización. El volumen extraído fue aproximadamente de 100 ul. Se separó el suero por centrifugación y se congeló a -20°C, para su estudio posterior.

## B. Obtención de Anticuerpos Anti-Noxiustoxina Nativa.

A un grupo de cuatro ratones de la cepa BALB/c, se les inmunizó con la Noxiustoxina nativa acoplada a albumina de ratón, siguiendo el mismo esquema de inmunización que se utilizó para la obtención de anticuerpos anti-péptidos, pero inyectando solo 30 ug de toxina cada vez.

Los ratones se sangraron individualmente a partir de la tercera inmunización, obteniendo aproximadamente 50 ul de suero por ratón. Este suero se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior estudio.

### 4. Técnicas Inmunoquímicas.

La presencia de anticuerpos anti-péptido se detectó por inmunodifusión. Las pruebas de competencia y titulación de los sueros se realizó por radioinmunoanálisis y por inmunoensayo enzimático.

#### A. Radioinmunoanálisis (RIA).

##### a. Titulación de los Antisueros.

La Noxiustoxina nativa se marcó con  $^{125}\text{I}$  usando el método de Lactoperoxidasa- $\text{H}_2\text{O}_2$  (Morrison M. y SicoBayse G., 1970), obteniendo una actividad específica de 5.1 Ci/mmol.

Los sueros se probaron en diluciones de 1:100 hasta 1:100 000. Todas las diluciones se hicieron con amortiguador de fosfatos salino con 1% de albúmina sérica bovina (PBS-BSA).

Se mezclaron 100 ul de cada dilución de suero con 100 ul de  $\text{NTX-}^{125}\text{I}$  (20 000 cpm), aproximadamente 1.7 pmoles. Después de 6 horas de incubación a  $4^{\circ}\text{C}$  se añadieron 50 ul de inmunoglobulina de conejo anti-ratón (segundo anticuerpo) - dejándolo reaccionar a  $4^{\circ}\text{C}$  por doce horas. La mezcla de reacción se diluyó con 2 ml de PBS-BSA y se centrifugó a 3000 rpm por 30 min. Se descartó el sobrenadante y se contó la radioactividad presente en el precipitado.

Las cpm que se encuentran en el precipitado son proporcionales a la cantidad de  $\text{NTX-}^{125}\text{I}$  reconocida por los sueros probados. Se graficaron cuentas por minuto contra logaritmo de la dilución del suero. Cada experimento se realizó por triplicado. Los datos de las gráficas corresponden al promedio de los tres experimentos.

##### b. Ensayo de Competencia de los Péptidos Sintéticos con Noxiustoxina Nativa.

La toxina fría o los péptidos sintéticos se probaron desde 0.1 hasta 1000 pmoles. El volumen de reacción utilizado fue de 200 ul por ensayo, lo que signifi

ca que la concentración de la toxina y de los péptidos se estudió en un rango de 0.5 nM a 5  $\mu$ M.

La toxina *frla* o los péptidos se mezclaron con la toxina marcada (20 000 -- cpm) y se le añadió el suero anti-toxina nativa en una dilución 1:200. Se dejaron competir por doce horas a 4°C. Se agregaron 2 ml de PBS-BSA a cada tubo y se centrifugó a 3000 rpm por 30 min.

Las cpm del precipitado indican que tanto se desplazó la reacción de la NTX marcada con su anticuerpo por la NTX *frla* o los péptidos.

Se graficó por ciento de inhibición contra cantidad de péptido o toxina.

## B. Inmunoensayo Enzimático (ELISA).

### a. Titulación de Antisueros.

Placas de vinil de 96 pozos (Costar 2596) se recubrieron con la fracción II-11 del veneno del alacrán *C. noxius* (100  $\mu$ l por cada pozo de una solución de 3  $\mu$ g/ml en amortiguador de bicarbonato 20 mM pH 9.2).

Se probaron diluciones de los sueros de 1:320 a 1:100 000. Las diluciones se hicieron en solución de PBS-BSA más 0.1% de Tween 20 y 10% de suero comercial de caballo (Biocel).

Se colocaron 100  $\mu$ l de cada dilución de suero en los pozos de las placas recubiertas con la fracción II-11 y se dejó reaccionar a 4°C por doce horas.

Se lavó la placa por cinco veces con PBS-0.1% de Tween 20, se añadió a cada pozo 100  $\mu$ l del segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Ig de conejo anti-ratón) dejándolo reaccionar por tres horas a temperatura ambiente. La placa se lavó cinco veces con PBS-0.1% de Tween 20.

Las placas se revelaron con una solución de ortofenilendiamina 0.4 mg/ml con 0.4% de hidroxiperoxido de urea. Se lee la absorbancia a 490 nm. Se graficó absorbancia contra logaritmo de la dilución.

### b. Ensayo de Competencia de los Péptidos Sintéticos con NTX nativa por el Método de ELISA.

Se probaron diluciones de los péptidos sintéticos o de la NTX nativa de 100 a 0.0001  $\mu$ g/ml en PBS-BSA más 10% de suero de caballo. Se mezclaron 200  $\mu$ l de cada concentración con 200  $\mu$ l de una dilución 1:320 del suero anti-NTX nativa, se dejó reaccionar la mezcla por cuatro horas a temperatura ambiente.

De la mezcla de 400  $\mu$ l se tomaron por triplicado 100  $\mu$ l y se colocaron en tres pozos diferentes de la placa de vinilo previamente recubierta con la fracción II-11 y se dejó 7 minutos a temperatura ambiente. Se lavó cinco veces con PBS-0.1% de Tween 20. Se añadió el segundo anticuerpo (100  $\mu$ l por cada pozo) y se dejó a tempe

ratura ambiente por 4 horas. Nuevamente se lavó 5 veces con PBS-0.1% Tween 20. Se reveló la placa con ortofenilendiamina como se describió anteriormente. Se graficó la concentración de péptido contra el porciento de inhibición.

#### 5. Separación de los Péptidos Sintéticos por HPLC.

Los péptidos sintéticos se pasaron por una columna de exclusión molecular -- I-125 Whatman usando un amortiguador de trietilamina-fosfato pH 2.25 con acetonitrilo en una relación 2:1 V/V. Se usó un aparato Hewlett-Packard con un flujo de 1 mL/min (Rivier J. E., 1980).

#### 6. Análisis de Aminoácidos.

Se determinó la composición de aminoácidos de los péptidos sintéticos después de una hidrólisis con ácido clorhídrico 6 N a 110°C por 20 horas, en un analizador automático Durrum D-500. (Moore S, 1972).

#### 7. Análisis de Hidrofobicidad.

Se analizó la secuencia de aminoácidos de la Noxiustoxina por Índices de hidrofobicidad de acuerdo a la técnica de Hopp y Woods 1981.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

##### 1. Péptidos sintetizados.

Los péptidos sintetizados corresponden a secuencias de aminoácidos de la Noxiustoxina del veneno del alacrán Centruroides noxius, como se muestra en la tabla 1.

La síntesis se siguió por medio de análisis de aminoácidos y controlando los acoplamientos por determinación de grupos amino libres. Después del tratamiento con ácido fluorhídrico, para separar a los péptidos de la resina, se les realizó análisis de aminoácidos, obteniendo los resultados mostrados en la tabla II.

Como se puede observar en esta tabla los péptidos pequeños, tienen una composición de aminoácidos muy parecido a lo esperado (péptidos NTX<sub>30-39</sub>, NTX<sub>21-39</sub>, NTX<sub>1-9</sub>) y se observa que la composición de aminoácidos va difiriendo de lo esperado conforme aumenta su número (30 y 39 aminoácidos). Esto es de esperarse dado que al aumentar el número de residuos aumenta también el impedimento estérico y esto hace que algunas de las cadenas polipeptídicas que se están formando queden alteradas.

Existen tres clases generales de productos colaterales que se producen durante la síntesis en fase sólida (Sarin y col., 1984). Uno de éstos se produce por deleciones de péptidos que ocurre cuando la cadena polipeptídica no está accesible temporalmente para la reacción pero después nuevamente forma parte en la síntesis. Otro producto colateral es por terminación de péptidos, los que se producen cuando la cadena polipeptídica interrumpe permanentemente su crecimiento en algún ciclo de la síntesis y modificaciones de péptidos los que se producen por una variedad de reacciones químicas laterales durante el ensamble de la cadena o separación de la resina.

Las deleciones de péptidos, contienen los extremos amino y carboxilo terminal pero les falta uno o más residuos internos. Los péptidos terminados o cortos tienen correcto el extremo carboxilo terminal pero les faltan los residuos del amino terminal y los péptidos modificados pueden tener el número correcto de residuos pero sus estructuras alteradas de alguna forma.

Merrifield y col., han demostrado que existe hasta un 81 % de eficiencia de síntesis, aún en cadenas de 60 residuos de aminoácidos (Sarin y col., 1984).

A pesar de estas fallas, la composición de aminoácidos de los péptidos sintetizados no se aleja mucho de lo esperado y nos hace pensar que un gran porcentaje de péptidos tiene la secuencia deseada.





TABLA II  
ANALISIS DE AMINOACIDOS DE LOS PEPTIDOS SINTETICOS

AMINOACIDO	TOXINA NIX <sub>30-39</sub>		TOXINA NIX <sub>21-39</sub>		TOXINA NIX <sub>11-39</sub>		TOXINA NIX <sub>1-39</sub>		TOXINA NIX <sub>1-9</sub>		TOXINA NIX <sub>1-20</sub>	
	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.
ASP	3.00	3	3.5	3	3.4	3	4.19	4	1.00	1	1.00	1
TRE	-*	-	-	-	-	-	1.49	2	1.98	2	1.83	2
SER	-	-	1.97	2	2.65	3	3.29	4	0.98	1	1.69	2
GLU	-	-	-	-	1.76	2	1.71	2	-	-	1.93	2
PRO	-	-	-	-	N.D.	1	N.D.	2	-	-	1.88	2
GLI	0.75	1	2.95	3	2.96	3	3.0	3	-	-	-	-
ALA	-	-	2.02	2	2.14	2	2.06	2	-	-	-	-
VAL	-	-	-	-	-	-	1.00	1	0.85	1	0.66	1
MET	0.93	1	0.97	1	0.95	1	0.97	1	-	-	-	-
ILE	-	-	-	-	-	-	1.02	2	1.17	2	1.11	2
LEU	-	-	-	-	0.92	1	0.94	1	-	-	1.00	1
TIR	0.86	1	1.98	2	1.77	2	2.02	2	-	-	-	-
LIS	1.8	2	3.00	3	6.00	6	6.87	7	0.96	1	2.89	4
CIS	N.D.	2	N.D.	3	N.D.	5	N.D.	6	N.D.	1	N.D.	3
RENDIMIENTO SINTESIS %	64.3		61.0		61.4		71.5		99.0		47.7	

\* a.a. AUSENTE EN LA SECUENCIA  
ENC., significa Encontrado  
ESP., significa Esperado.

En la tabla se puede notar que el aminoácido isoleucina, aparece bajo en todos los casos. Esto se debe a que este aminoácido se encuentra en un enlace ile-ile, el cual por ser un enlace doblemente hidrofóbico, es difícil de llevar a cabo, esto por el lado de la síntesis (Eskok y Karlson, 1970). Por otro lado, en el momento de la hidrólisis ácida, es así mismo un enlace difícil de romper y los análisis mostrados, fueron realizados por una hidrólisis normal de 20 horas, para que este dato sea más confiable, el análisis será necesario hacer una hidrólisis de 96 horas.

Los aminoácidos serina y treonina, se encuentran también bajos en algunos casos, esto también se puede deber en parte a que estos aminoácidos son sensibles a la hidrólisis ácida y se degradan en un pequeño porcentaje, para determinar su concentración exacta se debe realizar análisis de aminoácidos a diferentes tiempos de hidrólisis (20, 40 y 72 horas), y graficar su concentración contra tiempo y extrapolar a tiempo cero.

Los rendimientos de la síntesis se calcularon en base a la cantidad de péptido esperada, tomando como referencia los equivalentes del primer aminoácido pegado a la resina y la cantidad de péptido obtenido.

Como también se puede observar en la tabla II, excepto por el péptido NTX<sub>1-20</sub> en general los rendimientos de síntesis fueron buenos, considerando que se obtuvieron cantidades de 100 a 300 mg de péptido (según su tamaño), cantidad más que suficiente para realizar los estudios de caracterización de la toxina.

## 2. Purificación de los Péptidos Sintéticos.

Para saber de una forma cualitativa si teníamos por lo menos una parte de la toxina sintética (NTX<sub>1-39</sub>) en una conformación parecida a la que tiene la NTX nativa; corrimos en paralelo una electroforesis en geles de acetato-urea-alanina del sistema de Reisfeld (Reisfeld y col., 1962). La Noxiustoxina tiene la característica de que en este sistema electroforético migra con el marcador de color del gel por lo que es muy fácil seguirla y comparar nuestra toxina sintética. En la figura 3 se puede observar claramente que tanto la toxina sintética (gel 2) como la toxina nativa (gel 1) migran con el indicador de color (pironina).

Se nota en la parte superior a la banda de la toxina sintética un barrido, que nos indica la presencia de una mezcla de péptidos modificados.

Debido a estos resultados se decidió purificar los péptidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando una columna de exclusión molecular I-125 Whatman. Esta columna tiene un rango de separación de 70 000 a 1000 (figura 14), por lo que podríamos separar los polímeros de alto peso molecular que se pudieron formar por unión de los péptidos por medio de puentes disulfuro, de los péptidos -

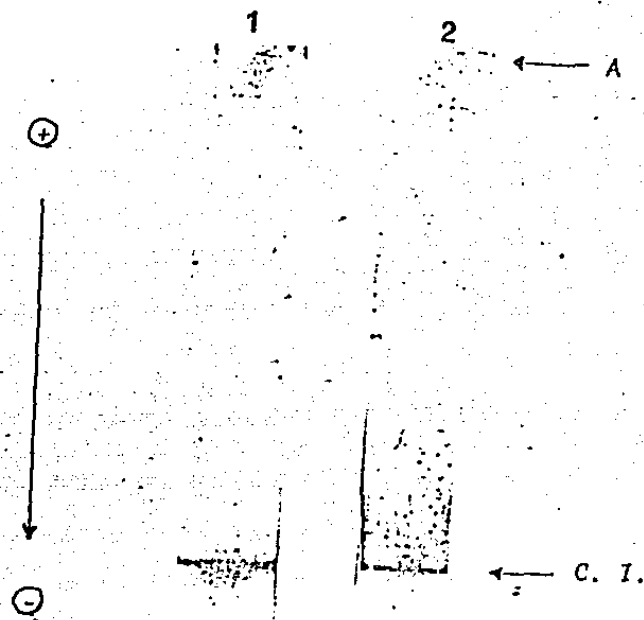


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la NTX, en el sistema acetato-urea- alanina (Reisfield y col., 1962).  
 Gel 1 50 ug de Noxiustoxina nativa, gel 2 50 ug de NTX<sub>1-39</sub> sintética.  
 A. significa punto de aplicación, C. I. colorante indicador.

pequeños.

De las figuras 15 a la 22 se muestran las gráficas resultantes de la purificación por HPLC de los diferentes péptidos, corroborando que en péptidos pequeños la síntesis en fase sólida es eficiente y que conforme aumenta el número de aminoácidos, aumentan los errores de síntesis (péptidos cortos, deleciones). Se puede observar que los extremos amino terminal  $\text{NTX}_{1-9}$  y  $\text{NTX}_{1-20}$  y los extremos carboxilo terminal,  $\text{NTX}_{30-39}$  y  $\text{NTX}_{21-39}$  muestran un pico principal mayoritario con pequeños picos contaminantes. Conforme aumenta el tamaño de los péptidos se observa la aparición de nuevos picos, encontrando que la toxina sintética completa ( $\text{NTX}_{1-39}$ ) muestra cuatro picos, el pico 3 tienen el mismo tiempo de retención que la toxina nativa y el pico 2 tiene el tiempo de retención correspondiente a su peso molecular. La toxina nativa tiene un tiempo de retención mayor al correspondiente a su peso molecular, posiblemente por efecto de conformación.

De los picos principales obtenidos por purificación en HPLC, de los diferentes péptidos se realizó análisis de aminoácidos (Tabla VI) mostrando que éstos corresponden a lo esperado, indicando que la mayor parte de péptido tiene la secuencia deseada.

Como se puede observar en esta tabla, de los pico obtenidos de la toxina completa ( $\text{NTX}_{1-39}$ ) el que corresponde más en composición a la toxina nativa es el pico 2, el pico 3 que sale en el mismo tiempo de retención que la toxina nativa, era el que se esperaba que tuviera la composición más parecida a la de la nativa, se piensa que tal vez este péptido tenga una conformación similar a la que tiene la toxina nativa.

### 3. Toxicidad de los Péptidos Sintéticos.

Todos los péptidos sintéticos fueron ensayados en cuanto a su toxicidad. Se utilizaron ratones albinos de la cepa  $\text{CD}_{1}$ , entre 18 y 20 gramos de peso corporal. La inyección se efectuó por tres vías diferentes: subcutánea, intraperitoneal e intraventricular (cerebral). También se ensayaron los mismos péptidos acoplados a albúmina sérica de ratón.

Como el primer péptido que se sintetizó fue el correspondiente a la secuencia amino terminal de la Noxiustoxina ( $\text{NTX}_{1-9}$ ), este fue el primero estudiado (Tabla III).

Por estudios de otras toxinas y analogía con estudios tridimensionales de éstas se pensó que posiblemente el extremo amino terminal estuviera expuesto (por lo general en los péptidos y proteínas los extremos amino y carboxilo están expuestos) (Sutcliffe y col., 1982).

Aunque se inyectó una dosis elevada de péptido, 200  $\mu\text{g}$  (aprox. 0.2  $\mu\text{moles}$ ).

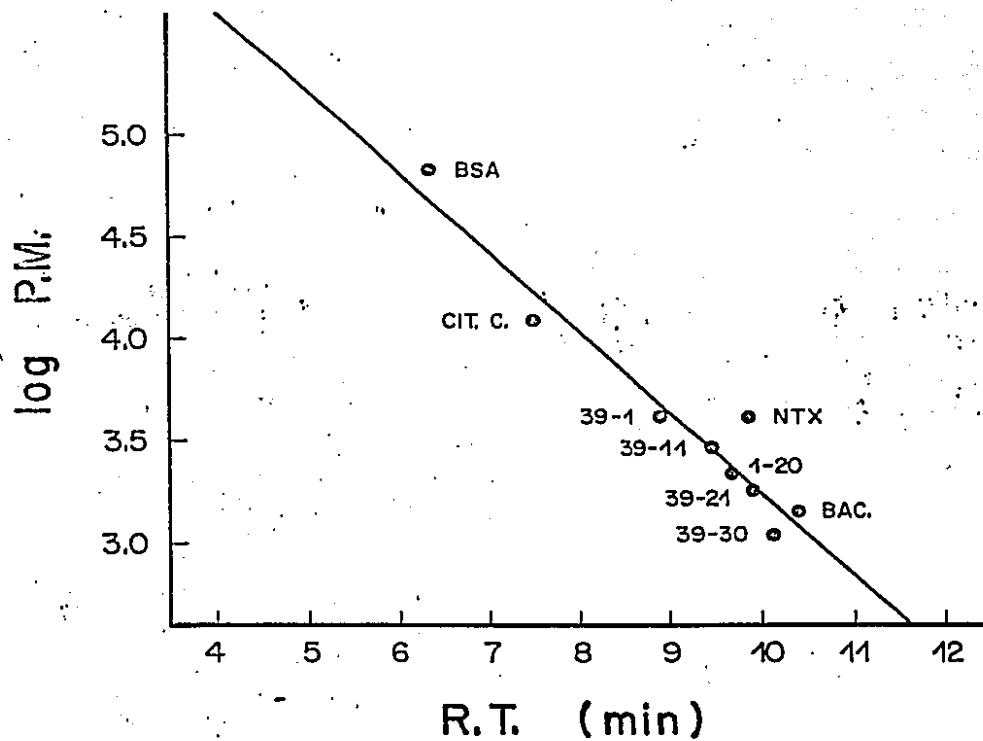


Figura 14. Curva de calibración del método cromatográfico (HPLC) para la separación de los peptidos sintéticos.

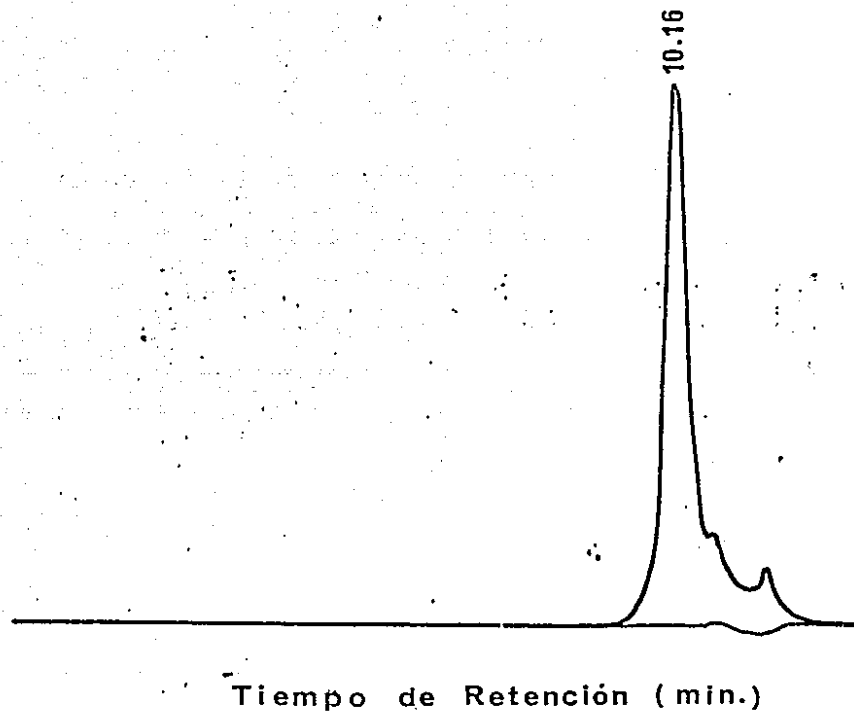


Figura 15. Separación del péptido NTX<sub>1-9</sub> por HPLC usando una columna de exclusión molecular 1-125 Watman, con amortiguador trietilamina-fosfórico (TEA-PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) pH 2.25, con acetonitrilo en relación 2:1 V/V, con flujo de 1 ml/min.

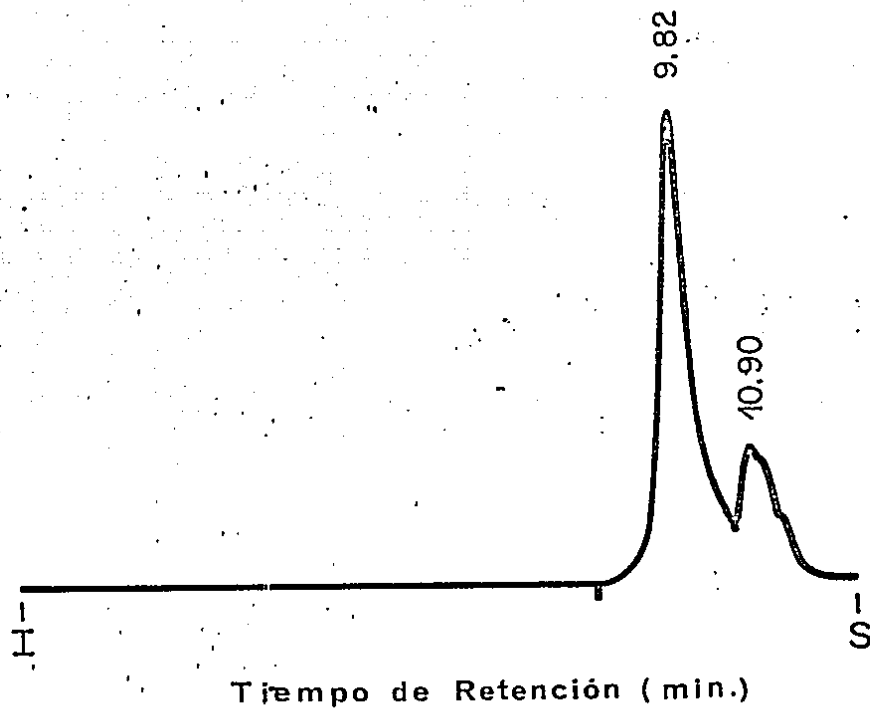


Figura 16. Separación del péptido NTX<sub>1-20</sub> por HPLC, en las mismas condiciones de la figura 15.



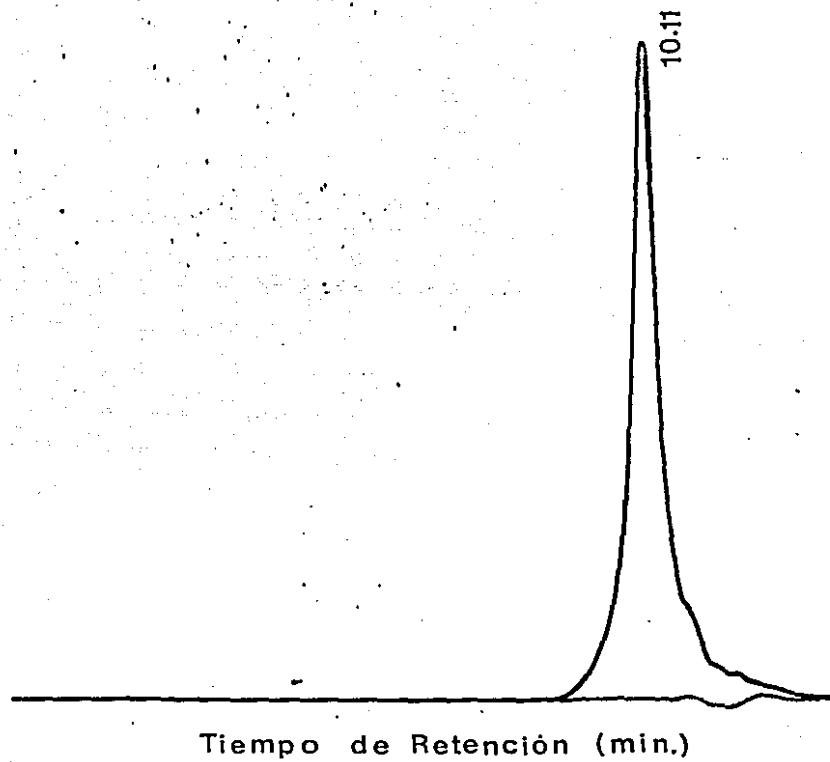


Figura 17. Separación del péptido NTX<sub>30-39</sub>, en las mismas condiciones que la fig. 15.

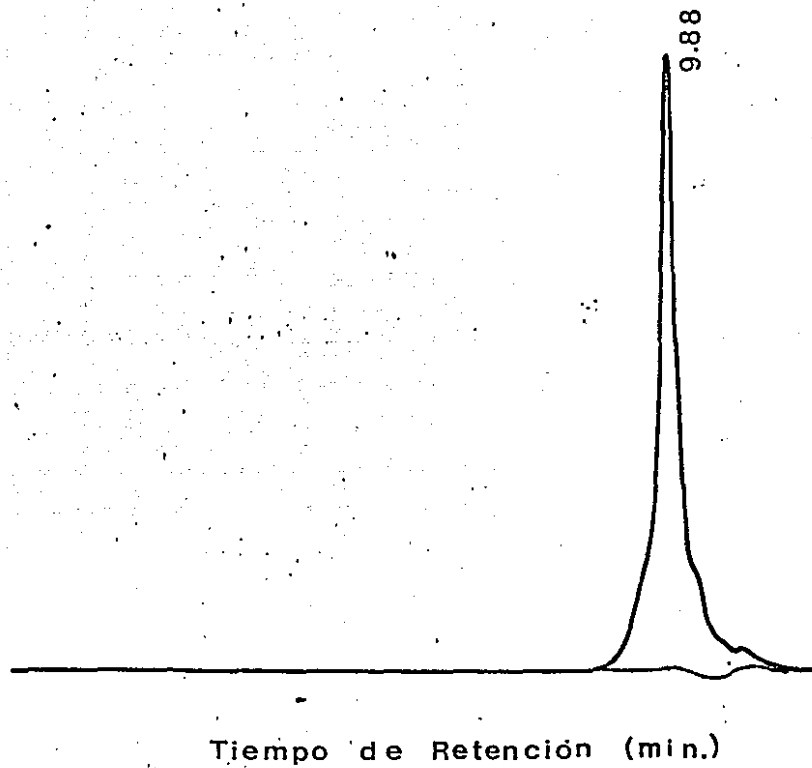


Figura 18. Separación del péptido NTX<sub>21-39</sub>, en las mismas condiciones descritas en la figura 15.

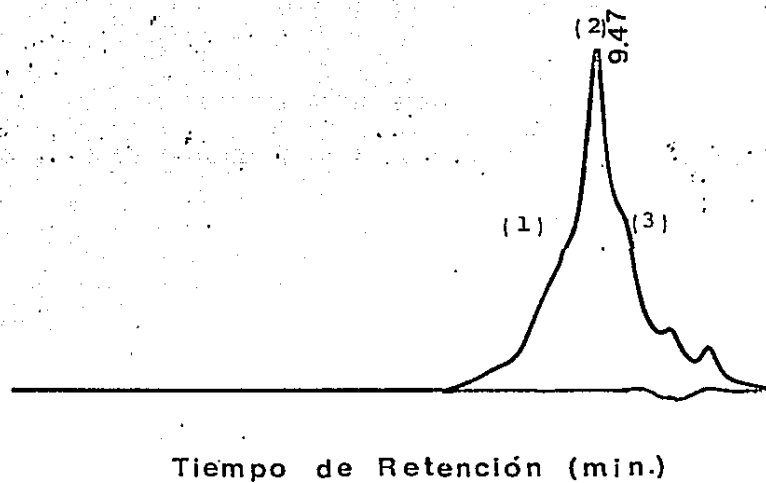


Figura 19. Separación del péptido NTX<sub>11-39</sub>, en las mismas condiciones descritas para el péptido NTX<sub>1-9</sub>. Los números entre paréntesis, son con los que se les designo a los picos.

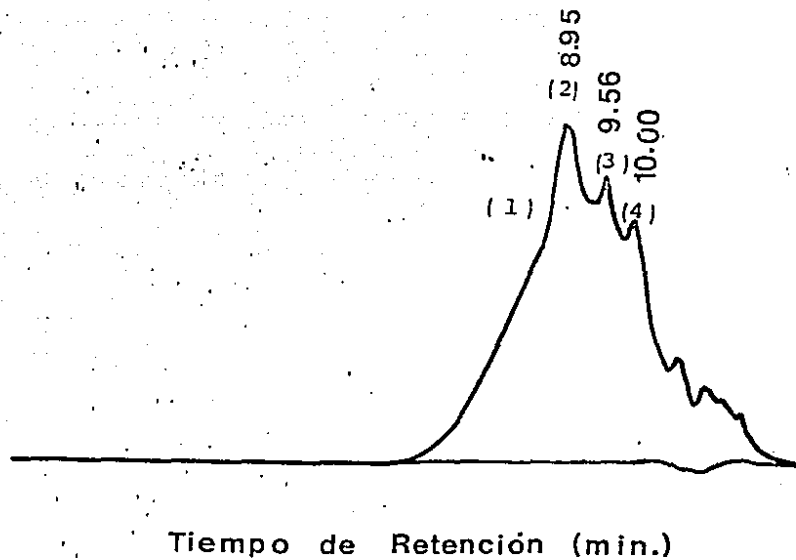


Figura 20. Separación del péptido  $\text{NTX}_{1-39}$ , en las mismas condiciones descritas en la figura 15. Los números entre paréntesis indican el número de la fracción.

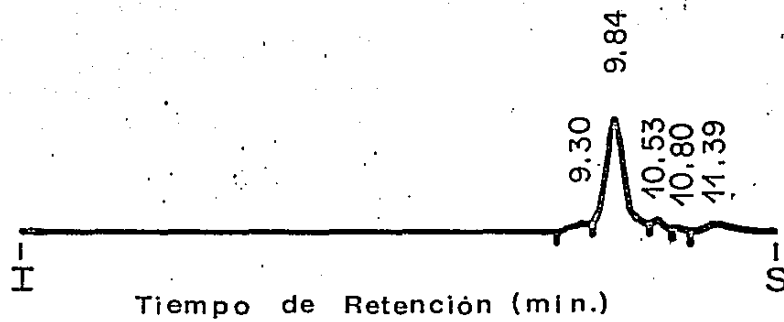


Figura 21. Separación de la noxiustoxina nativa por HPLC, en las mismas condiciones descritas para los péptidos.

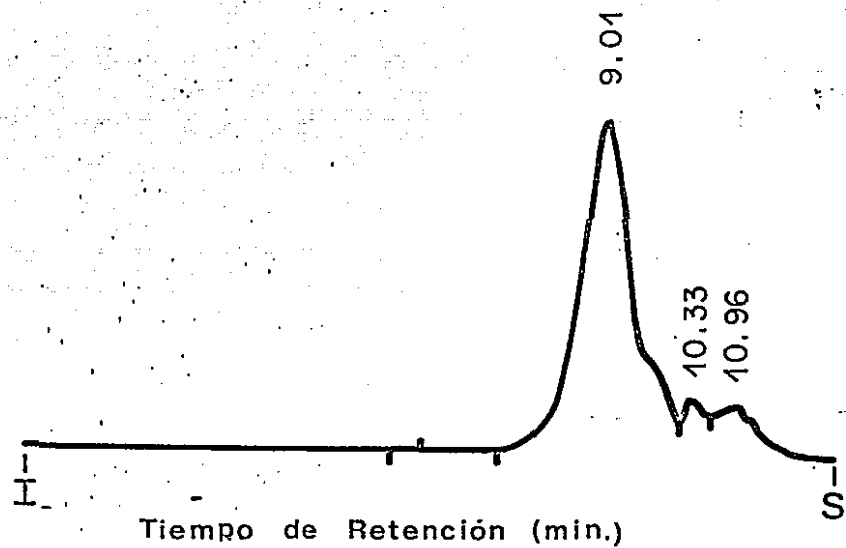


Figura 22. Recromatografía del pico 2 obtenido de la cromatografía del péptido NTX<sub>1-39</sub> (Fig. 20) en las mismas condiciones.

TABLA VI

ANALISIS DE AMINO ACIDOS DE LOS PEPTIDOS SINTETICOS  
PASADOS POR HPLC, COLUMNA I-125

AMINO ACIDO	NTX <sub>1-39</sub> (2)		NTX <sub>1-39</sub> (3)		NTX <sub>1-39</sub> (4)		NTX <sub>11-39</sub> (2)		NTX <sub>1-20</sub> (1)	
	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.	ENC.	ESP.
ASP	4.00	4	4.00	4	4.00	4	3.00	3	1.23	1
TRE	1.97	2	1.31	2	0.61	2	-*	-	2.30	2
SER	4.05	4	3.77	4	2.48	4	2.82	3	2.38	2
GLU	2.34	2	2.05	2	1.23	2	1.89	2	2.38	2
PRO	2.35	2	2.11	2	1.90	2	0.99	1	2.07	2
GLI	3.31	3	3.34	3	2.70	3	2.99	3	-	-
ALA	2.16	2	2.24	2	1.64	2	2.07	2	-	-
VAL	0.79	1	0.42	1	0.063	1	-	-	0.91	1
MET	1.04	1	1.04	1	0.86	1	0.97	1	-	-
ILEV	1.34	2	0.8	2	0.4	2	-	-	1.51	2
LEU	1.12	1	1.02	1	0.65	1	0.98	1	1	1
TIR	1.91	2	1.85	2	1.52	2	1.7	2	-	-
LIS	6.88	7	6.45	7	5.36	7	5.68	6	3.14	4
CIS	N.D.	6	N.D.	6	N.D.	6	N.D.	5	N.D.	3

\* a.a. ausente en la secuencia

el ratón tardo cuatro horas en morir presentando los mismos síntomas tóxicos que se observan cuando se inyecta la toxina nativa (de ésta se requiere 0.05 umoles y el ratón muere en una hora). Esto nos puede indicar que el sitio activo se encuentra por el extremo amino terminal, pero que requiere de una parte o del resto de la molécula para tener la conformación adecuada que le confiere más potencia o se podría pensar también que solo una parte del péptido sintético inyectado adoptó la conformación tal que le confirió actividad o que fue reconocido por el receptor -- adecuado, por lo que la potencia puede ser la misma o incluso mayor.

Los resultados obtenidos al administrar el péptido por diferentes vías, nos hacen pensar que posiblemente el péptido no sea de fácil difusión para llegar al sitio de acción, ya que por vía subcutánea el ratón no llegó a morir, sino solo presentó síntomas de toxicidad, no así por vía intraventricular, con lo que se aceleró la muerte del animal ya que directamente se inoculó en el sistema nervioso (la Noxiustoxina es una neurotoxina que actúa sobre el canal de potasio, se pega a sinaptomas del sistema nervioso central de ratón). Se observa también el efecto de la dosis, lo cual concuerda con lo dicho anteriormente.

Los datos de la inyección intraperitoneal de todos los péptidos se muestran en la tabla IV. Los péptidos correspondientes a las secuencias carboxilo terminal no fueron tóxicos en este sistema. A pesar de que se esperaba que la toxina completa fuera tóxica, principalmente porque electroforéticamente migra igual que la toxina nativa y pensando que tiene una conformación semejante a ella, ésta tampoco fue tóxica. Posiblemente existe una competencia por la presencia de péptidos más pequeños o bien el porcentaje de toxina con la misma conformación sea tan pequeña, que no sea suficiente para que se puedan observar síntomas de toxicidad.

Por el contrario, los extremos amino terminal sí fueron tóxicos. Como se había mostrado ya para la  $NTX_{1-9}$ , también la  $NTX_{1-20}$  fue tóxica, se observó que al acoplar estos péptidos a albúmina de ratón aumenta su toxicidad, posiblemente con el acoplamiento adquieran una conformación fija (más estable) que reacciona más fácilmente con su receptor. Se ha reportado en la literatura que los péptidos pequeños en solución acuosa, no fácilmente adoptan estructuras estables, por la ausencia de fuerzas dadas para el enrollamiento de las proteínas (Niman H. L. y col., 1983). Estos péptidos pueden ser flexibles conformacionalmente y se pueden inducir en ellos alguna conformación para la interacción con otras proteínas (Paterson V. -- 1985).

#### 4. Pruebas Inmunológicas.

##### A. Detección de Anticuerpos Anti-péptidos Sintéticos.

Ratones albinos hembras de la cepa BALB/c se inmunizaron con los péptidos sin



TABLA III

TOXICIDAD DE NTX<sub>1-9</sub>

D O S I S	VIA DE ADMINISTRACION		
	INTRAPERITONEAL	SUBCUTANEA	INTRAVENTRICULAR
200 ug	SINTOMAS DE TOXICIDAD A LOS 20 MIN MUERTE A LAS 4 HORAS	SINTOMAS DE TOXICIDAD EN 20 MIN (HIPEREXITABILIDAD, SALORREA) NO MUERTE	CONVULSIONES A LOS 12 MIN MUERTE EN 14 MIN (CONTROL CON 20 ul DE AGUA)
100 ug	---	NO SE OBSERVAN SINTOMAS DE TOXICIDAD	SINTOMAS DE TOXICIDAD MUERTE AL DIA SIGUIENTE
20 ug	---	---	CONDUCTA DIFERENTE A LA OBSERVADA CON NTX

TABLA IV

TOXICIDAD DE LOS PEPTIDOS SINTETICOS

	PEPTIDOS SOLOS	PEPTIDOS ACOPLADOS A ALBUMINA
NTX <sub>1-39</sub>	-	-
NTX <sub>30-39</sub>	-	-
NTX <sub>21-39</sub>	-	-
NTX <sub>11-39</sub>	-	-
NTX <sub>1-20</sub>	+	ND
NTX <sub>1-9</sub>	+	++
II 9.2.2 <sub>1-10</sub> *	-	++
HIBRIDO: NTX <sub>1-9</sub> + II 9.2.2 <sub>1-10</sub>	+	++

- Significa no tóxico

+ Significa tóxico en una dosis de 200ug/20g peso

++ Significa tóxico en una dosis de 100ug/20g peso

ND No determinado

\* Este péptido se describió en el capítulo del libro incluido en este trabajo (ver inciso VIII).

téticos solos o acoplados a albúmina de acuerdo al esquema presentado en la tabla V. Para efecto de inmunización se utilizaron los péptidos obtenidos directamente después de la ruptura con HF, por lo tanto sin purificar por cromatografía líquida.

Se detectó la presencia de anticuerpos por inmunodifusión, después de la quinta inmunización. Para todos los demás estudios se usó el suero obtenido después de la séptima inmunización.

Primero se enfrentaron los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con los diferentes péptidos con sus inmunógenos para saber si existía respuesta inmunológica a ellos.

Una vez que se observó respuesta inmune, estos antisueros se enfrentaron a la toxina sintética completa, para observar qué anticuerpos (qué región de la molécula) eran capaces de reconocer a la toxina completa pudiendo inferir qué región de la molécula está expuesta (Fig. 4), se probaron tanto los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con péptidos solos como de los acoplados a albúmina, observando igual respuesta en ambos casos.

Se usó como antígeno a la toxina sintética acoplada a albúmina, ya que no se observó banda de precipitación cuando se usó sin acoplar a albúmina.

Aparentemente en la toxina sintética acoplada a albúmina se encuentra expuesta la región carboxilo terminal ya que existe reconocimiento (banda de precipitado) por parte de los anticuerpos que fueron levantados contra los fragmentos NTX<sub>30-39</sub> y NTX<sub>21-39</sub>.

Después de observar que los anticuerpos contra los fragmentos de la toxina eran capaces de reconocer a la toxina sintética completa se procedió a enfrentar estos anticuerpos a la toxina nativa (Fig 5 y 6).

Se realizó una inmunodifusión, colocando en el pocillo del centro a la toxina nativa sola y en los pocillos laterales a los antisueros anti-péptidos (Fig 5). Observando la ausencia de bandas, se pensó que posiblemente por lo pequeño de la toxina no es posible que precipite al reaccionar con el anticuerpo si es que éste lo reconoce. Para descartar esta posibilidad, se acopló la toxina a albúmina de ratón (Fig 6) observando así bandas de precipitado.

El antisuero anti-NTX<sub>1-39</sub> obtenido de inmunizar ratones con este péptido solo y acoplado a albúmina se enfrentaron a la Noxiustoxina nativa, a albúmina de ratón y al péptido solo y al acoplado a albúmina, observando en ambos casos reconocimiento de los péptidos.

Se observa la banda de precipitado mayor con el péptido acoplado a albúmina tanto con el antisuero anti-NTX<sub>1-39</sub> como con el antisuero anti-NTX<sub>1-39</sub>-albúmina.

TABLA V

ESQUEMA DE INMUNIZACION

Se inmunizaron grupos de diez ratones albinos hembras de la cepa BALB/c, tanto con los péptidos solos, como acoplados a albúmina. Los péptidos ó los polímeros con albúmina se inyectaron por vía subcutánea en dos puntos subyacentes del lomo del ratón, de acuerdo al siguiente esquema:

	µg Péptido	Adyuvante completo de Freund	Adyuvante incompleto de Freund
1a semana	100	+	-
2a semana	200	+	-
3a semana	200	-	+
4a semana	200	-	+
5a semana	200	-	-
6a semana	200	-	-
8a semana	200	-	-

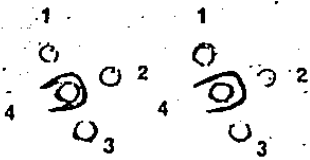


Figura 4. Inmunodifusión en gel de agarosa al 0.8% en PBS.  
 Concentración de NTX<sub>1-39</sub>-albumina de 1 mg/ml

Izquierda		Derecha	
Centro: NTX <sub>1-39</sub> -albumina		Centro: NTX <sub>1-39</sub> -albumina	
Pozo		Pozo	
1	suero NTX <sub>30-39</sub> -alb.	1	suero NTX <sub>30-39</sub>
2	suero NTX <sub>21-39</sub> -alb.	2	suero NTX <sub>21-39</sub>
3	suero NTX <sub>1-39</sub> -alb.	3	suero NTX <sub>1-39</sub>
4	PBS	4	PBS

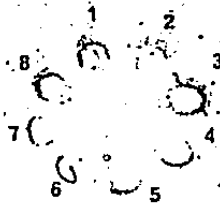


Figura 5. Inmunodifusión en gel de agarosa al 0.8% en PBS. En el pocillo del centro se colocó noxiustoxina en una concentración de 1mg/ml, en los pozos laterales se colocaron los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos solos.

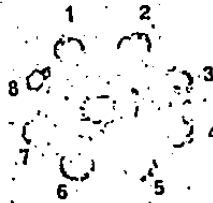


Figura 6. Inmunodifusión en gel de agarosa el 0.8% en PBS. En el centro se colocó a la noxiustoxina acoplada a albumina de ratón en una concentración de 1 mg/ml. En los pozos laterales se colocaron los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos acoplados a albumina, suero preinmune (pozo 7) y PBS (pozo 8).

Esto posiblemente se debe a la presencia de albúmina en el complejo antígeno-anticuerpo, o a la presencia de anticuerpos anti-albúmina. Una banda débil de precipitado indica que existe reacción con el péptido solo (Fig 7).

Para descartar la presencia de anticuerpos anti-albúmina de ratón se enfrentaron los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos acoplados a albúmina, -- con albúmina de ratón, no observando reconocimiento (Fig 8).

La otra posibilidad que existía, era la presencia de anticuerpos anti-albúmina modificada por la reacción con carbodiimida, por lo que se probaron los antisueros anti-péptidos-albúmina, frente a albúmina tratada con carbodiimida (Fig 9 izquierda).

Se pudiera pensar que las bandas de precipitado observadas de la reacción de los antisueros anti-péptidos-albúmina, con la toxina nativa acoplada a albúmina pudieran deberse tan solo a la presencia de anticuerpos anti-albúmina modificada, - pero no se puede descartar la presencia de anticuerpos que reconozcan también a la toxina nativa. Para comprobar esto se procedió a montar métodos mas sensibles que nos permitieran detectar anticuerpos que reconozcan a la Noxiustoxina sin que interfiera el acarreador.

#### B. Titulación de Antisueros y Pruebas de Competencia por RIA.

Se procedió a montar un método de detección de la toxina marcada con  $^{125}\text{I}$  con anticuerpos anti-toxina nativa, usando un segundo anticuerpo para poder precipitar el complejo. Una vez montado este método se probaron todos los sueros anti-péptido frente a la toxina marcada encontrando que tan solo el suero producido contra la toxina sintética completa (NTX<sub>1-39</sub>) sin acoplar a albúmina, pudo reconocer a la toxina marcada con  $^{125}\text{I}$  (Fig 10).

El encontrar anticuerpos anti-péptido que reconozcan a la proteína nativa no implica que esta región sea necesariamente un determinante antigénico en la molécula original, ya que puede ser una región expuesta que naturalmente no es un determinante antigénico principal. (Lerner R. A., 1982).

Haciendo reaccionar ahora a los diferentes fragmentos sintéticos con los anticuerpos anti-toxina nativa podemos darnos una idea de por donde se encuentra la región antigénica.

Los resultados de las competencias de los péptidos con la toxina nativa muestran nuevamente (Fig 11) que la toxina sintética completa fue la única capaz de desplazar a la toxina nativa. Se requirió de aproximadamente mil veces más de péptido para lograr una inhibición suficiente. Aparentemente, también el fragmento de las tres cuartas partes de la toxina desplaza pero en menor grado.

La forma de la curva de desplazamiento de la toxina nativa indica la presencia de un solo tipo de anticuerpo y la curva de la toxina sintética hasta 1000 pmoles -

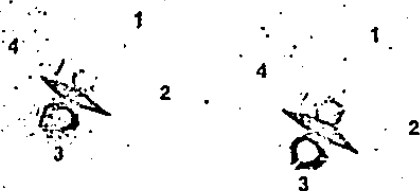


Figura 7. Inmunodifusión en gel de agarosa al 0.8% en PBS.  
Se utilizó una concentración de noxiustoxina de 1mg/ml,  
de albumina de raton 10 mg/ml, de NTX<sub>1-39</sub>-albumina 1mg/ml  
y de NTX<sub>1-39</sub> 1 mg/ml.

Izquierda:

Centro: Suero de los ratones  
inmunizados con NTX<sub>1-39</sub>-alb.

Pozos

- 1 noxiustoxina
- 2 albumina de raton
- 3 NTX<sub>1-39</sub>-alb.
- 4 NTX<sub>1-39</sub>

Derecha:

Centro: Suero de los ratones  
inmunizados con NTX<sub>1-39</sub>

Pozos

- 1 noxiustoxina
- 2 albumina de raton
- 3 NTX<sub>1-39</sub>-alb.
- 4 NTX<sub>1-39</sub>

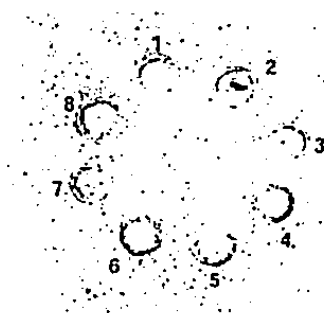


Figura 8. Inmunodifusión en gel de agarosa al 0.8% en PBS.  
En el centro se colocó albumina de raton en una concentra  
ción de 10 mg/ml, en los pozos laterales se colocó el suē  
ro de los ratones inmunizados con los peptidos acoplados  
a albumina.



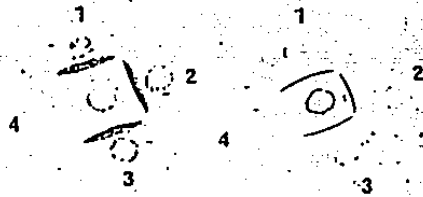


Figura 9. Inmunodifusión en gel de agarosa al 0.8% en PBS. Se utilizó una concentración de albumina de raton tratada con carbodiimida de 10 mg/ml, de NTX<sub>1-39</sub>-albumina 1 mg/ml.

Izquierda

Derecha

Centro: Albumina de raton tratada con carbodiimida.

Centro: NTX<sub>1-39</sub>-alb.

Pozos

Pozos

- 1 suero NTX<sub>30-39</sub>-alb.
- 2 suero NTX<sub>21-39</sub>-alb.
- 3 suero NTX<sub>1-39</sub>-alb.
- 4 PBS

- 1 suero NTX<sub>50-39</sub>
- 2 suero NTX<sub>21-39</sub>
- 3 suero NTX<sub>1-39</sub>
- 4 PBS

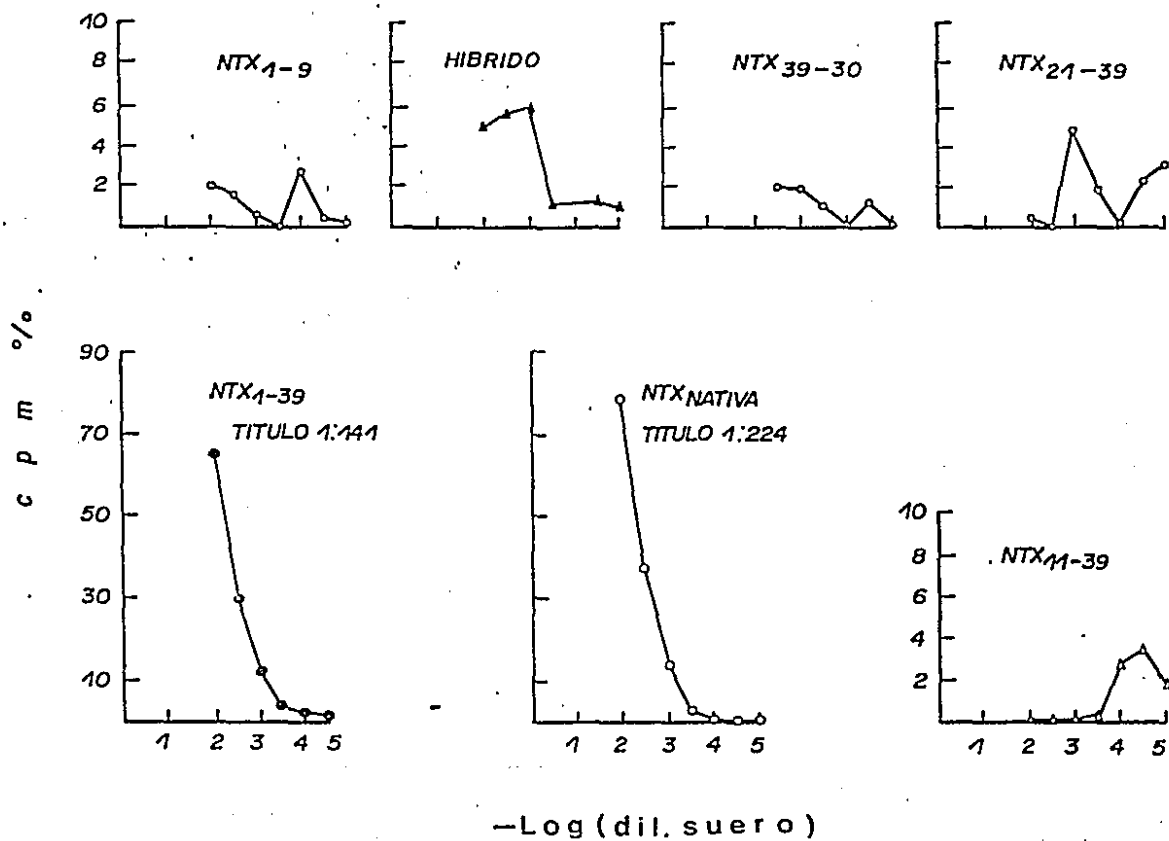


Figura 10. Titulación de los sueros de raton inmunizados con los peptidos y la noxiustoxina, por RIA, después de la séptima inmunización.

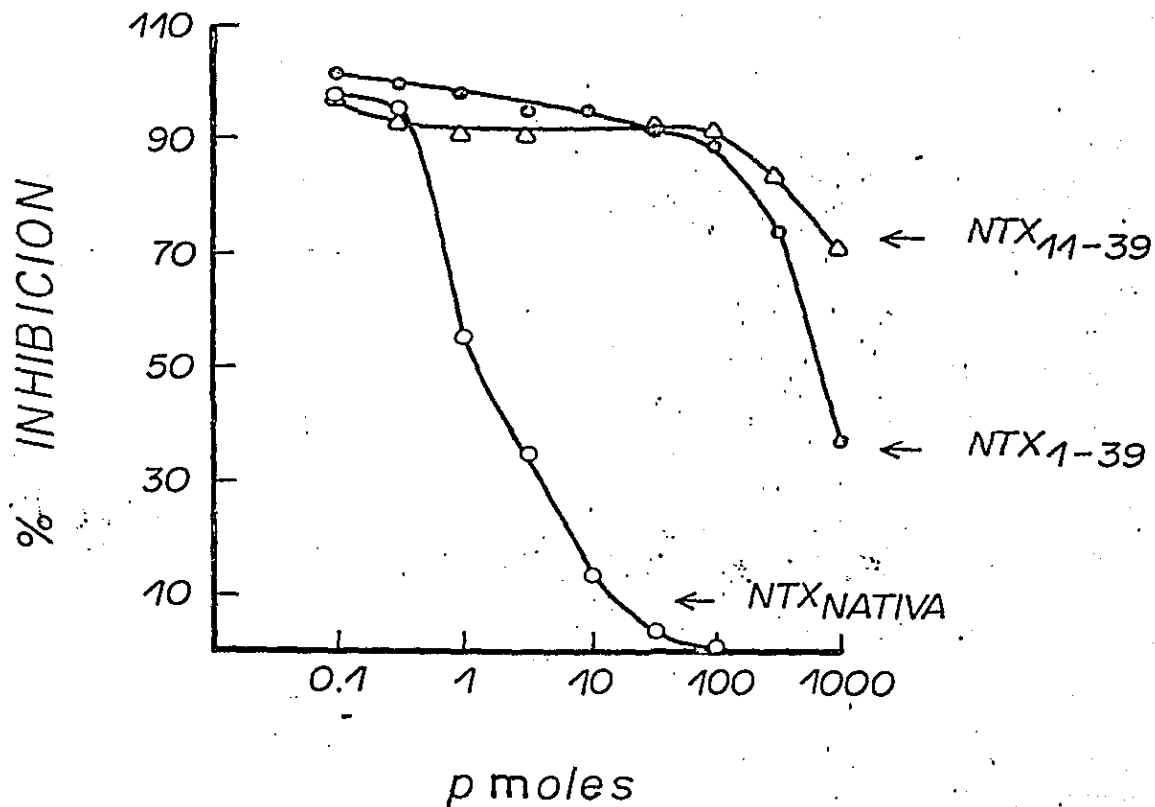


Figura 11. Ensayo de Competencia por RIA. Se determino la inhibición producida por NTX nativa, NTX<sub>1-39</sub>, NTX<sub>11-39</sub> sobre la unión de la NTX<sup>125</sup>I a los anticuerpos anti NTX nativa.

parece ser que reacciona con el mismo anticuerpo ya que las curvas se observan paralelas y con una sola pendiente, es importante hacer notar que no se probaron con concentraciones mayores de péptidos y esta curva podría llegar a inhibir totalmente o cambiar de pendiente indicando la presencia de otro tipo de anticuerpo y/o mezcla de péptidos.

### C. Titulación de Antisueros y Pruebas de Competencia por ELISA.

Estos experimentos se repitieron, ahora usando el método de ELISA, encontrando los mismos resultados. Tan solo el antisuero anti-NTX<sub>1-39</sub> fue capaz de reconocer a la toxina nativa (Fig 13). Se observa que por este método, la curva de inhibición de la toxina sintética muestra tres pendientes, indicando que existen tres conformaciones (o tres clases de péptidos) que son reconocidos por los anticuerpos anti-Noxiustoxina con diferentes afinidades. La primera pendiente aparentemente es paralela a la curva de inhibición de la Noxiustoxina, lo que indica que por lo menos una parte del péptido sintético tienen la misma conformación de la toxina nativa o bien podrían existir tres tipos de anticuerpos ya que se está usando un suero policlonal.

Se repitieron los experimentos de desplazamiento con los péptidos semipurificados de la NTX<sub>1-39</sub> (picos 2, 3 y 4) suponiendo que cada uno corresponde a las tres pendientes observadas en la curva de desplazamiento de la NTX<sub>1-39</sub> (Fig 23).

Se observa que las fracciones 3 y 4 siguen mostrando las tres pendientes que mostraba el péptido no pasado por la columna I-125 y el pico 2 muestra una sola pendiente.

La presencia de varias pendientes nos puede indicar que estas fracciones aún no están puras y que existe una mezcla de tres péptidos que son reconocidos por el mismo anticuerpo pero con diferentes afinidades o puede ser que exista una mezcla de anticuerpos que tienen diferentes afinidades por el péptido.

El pico 2 que muestra una sola pendiente y además es paralela a la mostrada por la NTX nativa, nos podría indicar que este péptido es reconocido por el mismo anticuerpo que reconoce a la nativa pero con diferente afinidad. Observando los análisis de aminoácidos de esta fracción se nota que precisamente este pico es el que tienen la composición más cercana a la de la Noxiustoxina.

Después de analizar los resultados obtenidos de las pruebas de toxicidad y de desplazamiento, éstos sugieren que la región amino terminal de la toxina sea la involucrada en ambos casos. Cabe aclarar que en los experimentos de desplazamiento, los resultados obtenidos con los péptidos amino terminal NTX<sub>1-9</sub> y NTX<sub>1-20</sub>, pueden estar subestimados puesto que estos péptidos no fueron totalmente solubles.

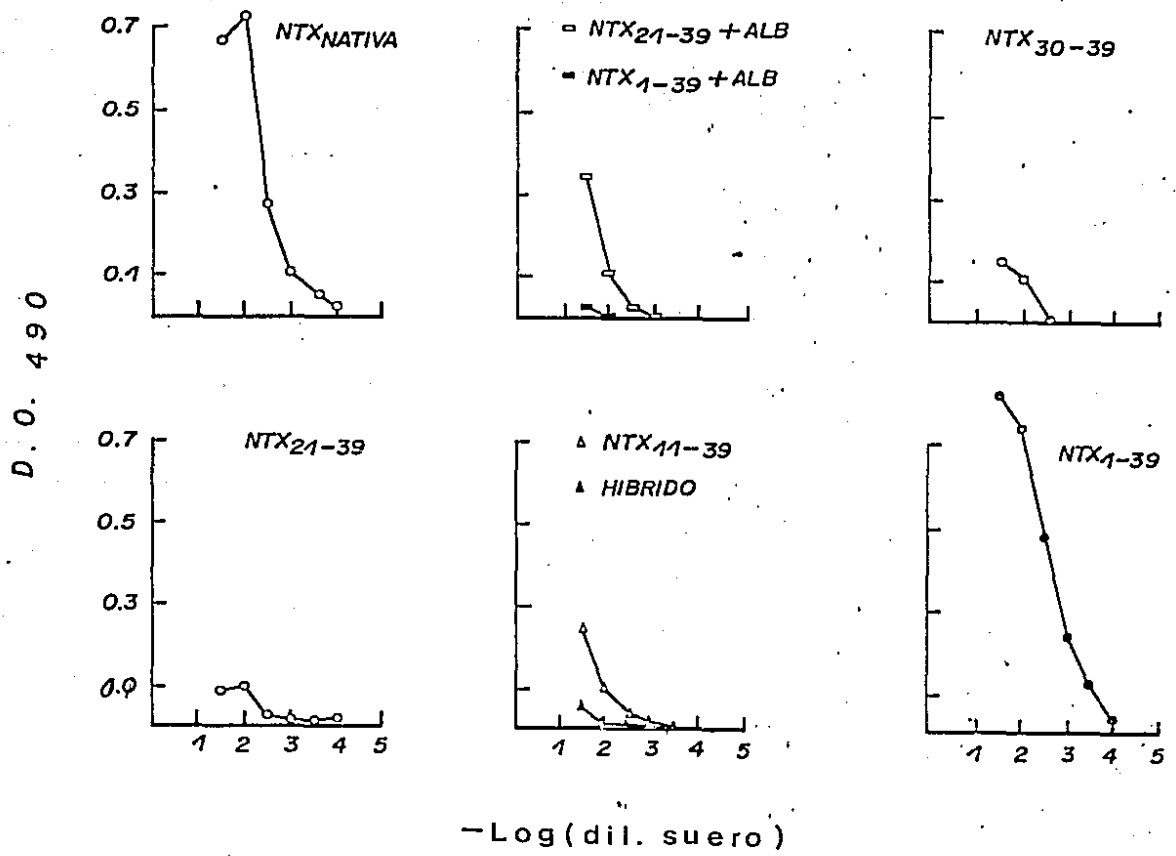


Figura 12. Titulación de los sueros de raton inmunizados con los peptidos y la noxiustoxina por ELISA, Despues de la septima inmunización.

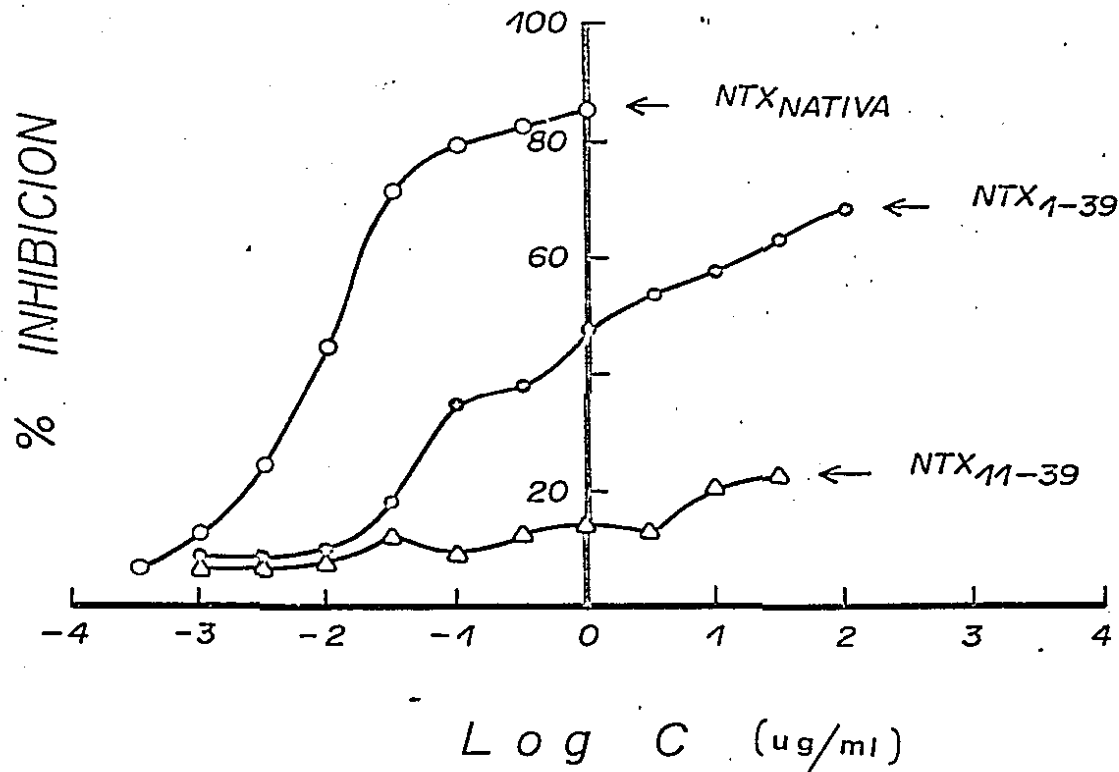


Figura 13. Ensayo de Competencia por ELISA. Se probó la inhibición producida por NTX nativa, NTX<sub>1-39</sub>, NTX<sub>11-39</sub>, sobre la unión de los anticuerpos anti-NTX nativa a la base sólida cubierta con fracción II-11 del veneno de C. noxius.

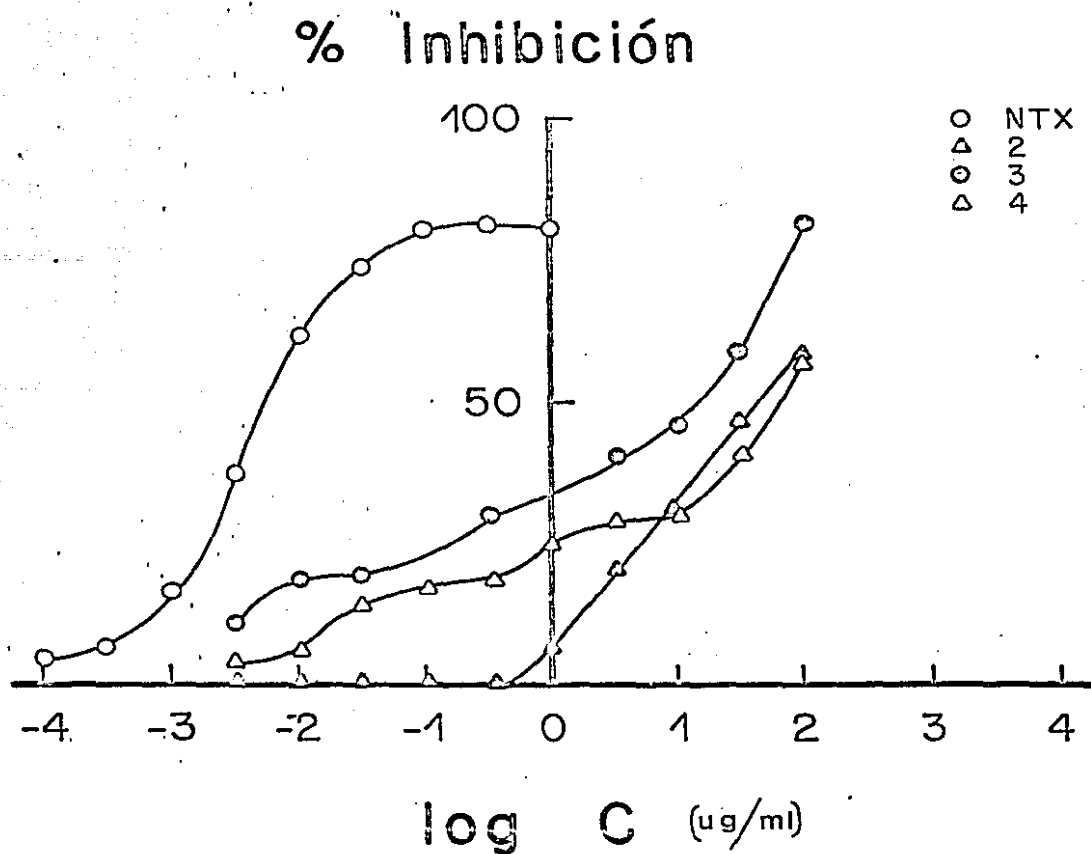


Figura 23. Ensayo de competencia por ELISA. Se probó la inhibición producida por NTX nativa, las fracciones 2, 3 y 4 obtenidas de la cromatografía del péptido NTX<sub>1-39</sub> (Fig. 20), sobre la unión de los anticuerpos anti-NTX nativa a la fase sólida cubierta con fracción II-11 del veneno de C. noxius.

## V CONCLUSIONES.

Se sintetizaron, siguiendo el método de Merrifield, seis péptidos que corresponden a fracciones amino y carboxilo terminal de la Noxiustoxina, toxina del veneno del alacrán de Nayarit Centruroides noxius Hoffmann, que actúa sobre el canal de potasio en axones gigantes de calamar.

El rendimiento general de síntesis fue del 60%, encontrando composiciones de aminoácidos muy parecidas a lo esperado.

Se levantaron anticuerpos contra todos los péptidos solos y acoplados a albúmina, en ratones albinos hembras de la cepa BALB/c.

Se montaron los métodos de ELISA y RIA para la Noxiustoxina.

De los anticuerpos anti-péptido, solo los anti-NTX<sub>1-39</sub> fueron capaces de reconocer a la toxina nativa, probados por estos dos métodos.

Los resultados de competencia indican que solo la NTX<sub>1-39</sub> fue capaz de desplazar a la Noxiustoxina. Por estos mismos métodos, se observa también que el péptido NTX<sub>11-39</sub> compite parcialmente con la toxina nativa.

Solo los péptidos NTX<sub>1-9</sub> y NTX<sub>1-20</sub> fueron tóxicos en ratones albinos, mismos que son sensibles a la toxina nativa.

El no obtener ningún desplazamiento con los péptidos correspondientes a los extremos carboxilo terminal, pero sí con los péptidos que se acercan a la región amino (NTX<sub>11-39</sub> y NTX<sub>1-39</sub>), parece indicar que esta región contribuye de manera importante al reconocimiento por los anticuerpos anti-Noxiustoxina.

Se analizó la secuencia de esta toxina por índices de hidrofobicidad (Hopp y Woods, 1981), encontrando que la región más hidrofílica, se encuentra entre los aminoácidos 5 y 19, la que pensamos sea la más expuesta. (Fig 24).

De los resultados obtenidos, en trabajo en colaboración con el laboratorio -ii del Dr. Bayón, sobre el efecto de estos péptidos en la liberación de GABA en sinaptosomas, se observó que también los extremos amino (NTX<sub>1-9</sub> y NTX<sub>1-20</sub>) así como la toxina completa (NTX<sub>1-39</sub>), son los únicos que tienen acción. Esto nos hace pensar que la región activa pudiera estar cerca del extremo amino.



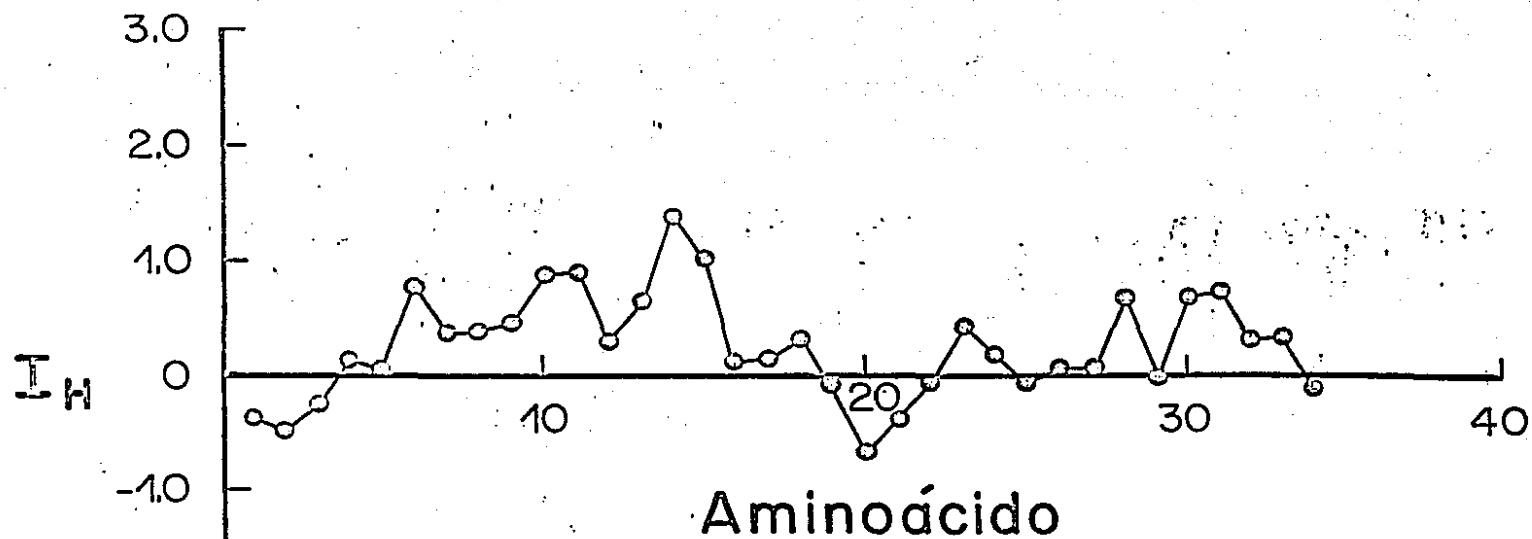


Figura 24. Análisis de hidrofiliidad de la noxiustoxina, de acuerdo al método de Hopp T. P. y Woods K. R., 1981. La región comprendida entre los aminoácidos 5 y 19 es la de más alta hidrofiliidad.

## VI . PERSPECTIVAS FUTURAS.

En base a los resultados obtenidos, se ha pensado en sintetizar nuevos péptidos correspondientes a la región amino terminal de la Noxiustoxina, pero omitiendo los extremos hidrofóbicos, para que estos péptidos sean solubles, y así repetir - estos experimentos, aumentando uno a uno los aminoácidos hidrofóbicos para poder apreciar la contribución que éstos tengan sobre la acción de la toxina.

También se ha pensado sintetizar nuevos péptidos que tengan un aminoácido modificado o cambiado, para poder delinear de una forma mas exacta los sitios tóxicos e inmunogénicos. Así mismo también se ha contemplado el uso de anticuerpos monoclonales con el objeto de realizar ensayos de competencia con los péptidos sintéticos a fin de completar este estudio.

Va teniendo caracterizada esta toxina, se buscarla en otros venenos, toxinas - semejantes y posiblemente se pueda encontrar que el sitio inmunogénico y/o tóxico - sea análogo. Esto serviría para estudios de evolución, así como para pensar en un - antisuero específico contra esta región, que pudiera ser efectivo para toda una familia de toxinas.

Estos mismos estudios se piensan realizar con la toxina II-10 del veneno de C. noxius, ya que esta toxina actúa sobre el canal de sodio y así se abarcaría otra familia de toxinas.

Teniendo ya caracterizado el sitio tóxico de estas toxinas, estos péptidos podrían utilizarse como herramienta bioquímica para estudio de estos dos canales así como en estudios fisiológicos.

VII BIBLIOGRAFIA.

1. Atassi M. Z. (1975). Antigenic Structure of Myoglobin: The Complete Immunochemical Anatomy of Protein and Conclusions Relating to Antigenic Structures of Proteins. *Immunochemistry* 12, 423-438.
2. Atassi M. Z. (1978). Precise determination of the Entire Antigenic Structure of Lysozyme. *Immunochemistry* 15, 906-936.
3. Atassi M. Z. (1981). Immune Recognition of Cytochrome c. I. Investigation by Synthesis whether Antigenic sites of Polymeric Cytochrome Coincide with Locations of sequence differences between the Immunizing and Host Cytochromes. *Molecular Immunology* 18, 1021-1025.
4. Atassi M. Z. (1984). Antigenic Astructures of Proteins. *Eur. J. Biochem.* 145, 1-20.
5. Atassi M. Z. and Webster R. G. (1983). Localization, Synthesis and Activity of an Antigenic Site on Influenza Virus Hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 840-844.
6. Babin D. R., Watt D. D., Goos S. M., Mlejnik R. V. (1974). Amino Acid Sequence of Neurotoxic Protein Variants from the Venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch. Biochem. Bioph.* 164, 694-706.
7. Bixter G. S. and Atassi M. Z. (1984). T cell Recognition of Lysozyme III. Recognition of the 'surface stimulation' synthetic Antigenic Sites. *J. Immunogenet* 11, 245.
8. 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. *Nature* 296, 90-91.
9. Catterall W. A. (1977). Activation of The Action Potential  $Na^+$  Ionophore by Neurotoxin. *J. Biol. Chem.* 252, 8669-8676.
10. Chicheportiche R. and Lazdunski M. (1970). The Conformation of Small Proteins. The state-diagramm of a Neurotoxin of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* 14, 549-555.
11. Chu P. Y. and Fasman G. D. (1974). Prediction of Protein Conformation. *Biochemistry.* 13, 222-224.
12. Del Pozo E. C. (1962). Estudios Experimentales sobre las acciones del Veneno del Aacar. *Rev. Ins. Sal. Enf. Trop. (Mex.)* 22, 173-178.
13. Dent H. A. R., Possani L. D., Ramirez G. A., Fletcher P. L. Jr. (1980). Purification and Characterization of Two Mammalian Toxins from the Venom of the Mexican Scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 18, 343-350.
14. Esko K. and Karlsson M. (1970). Effects of Boc-Amino acid adsorption with Respect to yield and Racemisation in the Merrifield Method. *Acta Chem Scand* 24, 1415-22.
15. Granier C., Bahraqui E., Van Rietschoter, Rochat H. and El Ayebl M. (1984). Synthesis and Immunological Characterization of Two Peptides which are models for two of the four major antigenic sites of a Scorpion Toxin. *Int. J. Peptide Protein Res.* 23, 187-197.

16. Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shinnicke E. M., Sutcliffe J. G. and Lerner R. H. (1982). Immunogenic Structure of the Influenza Virus Hemagglutinin. *Cell* 28, 477-487.
17. Goodfriend L. T., Levine L., Fasman G. D. (1964). Antibodies to Bradykinin and Angiotensin: A Use of Carbodiimides in Immunology. *Science* 144, 1344-1346.
18. Hoffmann C.C. (1938). Nuevas consideraciones acerca de los Alacranes Mexicanos. *An. Inst. Biol.* 9, 318-337.
19. Hopp T. P. and Woods K. R. (1981). Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3824-3828.
20. Jacob C. D., Peña M., Arnon R. (1984). Neutralization of Heat-Labile Toxin of *E. coli* by Antibodies to Synthetic Peptides Derived from the subunit of Cholera toxin. *Embo J.* 3, 2889.
21. Jemerson R. and Margoliash E. (1979a). Topographic Antigenic Determinants on - Citochrome c. *J. Biol. Chem.* 254, 12706-12716.
22. Jemerson R. and Margoliash E. (1979b). Specificity of the Antibody Response - of Rabbits to a self-antigen. *Nature* 282, 468-471.
23. Kazim A. L. and Atassi M. Z. (1982). Structurally Inherent Antigenic Sites. *Biochem J.* 203, 201-208.
24. Leach S. J. (1983). How Antigenic are Antigenic Peptides? *Biopolymers* 22, 425-40.
25. Maron E., Shiozawa C., Arnon R., and Sela M. (1971). Chemical and Immunological Characterization of a Unique Antigenic Region in Lysozyme. *Biochemistry* 10, 763.
26. Mitchell A. R., Kent S. B. H., Engelhard M. and Merrifield E. B. (1978). A New Synthetic Route to *tert*-Butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)phenylacetamidomethyl-Resin and Improved Support for solid Phase Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* 43, 2845-2852.
27. Moore S. (1972). The Precision and Sensitivity of Amino Acid Analysis. In: *Chemistry and Biology of Peptides* (Meinhos J. ed.) pp 629-653. Ann Arbor Science Publishers Michigan.
28. Morrison M. and Sico Bayse G. (1970). Catalysis of Iodination by Lactoperoxidase. *Biochemistry* 9, 2995.
29. Narahashi T., Deguchi T., Urakawa N., Ohkubo Y. (1960). Stabilization and Rectification of muscle fibers membrane by Tetrodotoxin. *Am. J. Physiol.* 198, 934.
30. Narahashi T., Moore J. W. Seal W. R. (1964). Tetrodotoxin Blockage of Sodium conductance increase in Lobster Gigant Axon. *J. Gen. Physiol.* 47, 963-974.
31. Niman H. L., Houghten R. A., Walker L. C., Reisfeld R. A., Wilson I. A., Hogle J. and Lerner R. A. (1983). Generation of Protein-reactive Antibodies by short Peptides is an Event of High Frequency: Implications for the Structural Bases of - Immune Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 4949-4953.
32. Paterson V. (1985). Delineation and Conformational Analysis of two Synthetic - Peptides Models of Antigenic Sites on Rodent Cytochrome c. *Biochemistry* 24, 1048-1055.

33. Pecht I., Maron E., Arnon R. and Sela M. (1971). Specific Excitation Energy Transfer from Antibodies to Dansyl-Labeled Antigen. *Eur. J. Biochem.* 19, 368.
34. Possani L. D., Ramirez G. A., Fletcher P. L. Jr. Gurrola M. A. N. (1978) Isolation of two Mammalian Toxins from the Venom of Mexican Scorpion Centruroides elegans (Thorell). *FEBS Letters* 91, 261-264.
35. Possani L. D., Fletcher P. L. Jr. Alagón A. B. C., Alagón A. C., Julid J. Z. (1980). Purification and Characterization of a Mammalian Toxin from Venom of the Mexican Scorpion Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. *Toxicon* 18, 175.
36. Possani L. D. Steinmetz W. E., Dent M. A. R., Alagon A. C., Wuthrich K. (1981) Preliminary Spectroscopy Characterization of six Toxins from Latin American Scorpions. *Biochem. Biophys. Acta.* 669, 183-192.
37. Possani L. D., Dent M. A. R., Martin B. M., Maelicke A. and Svendsen I. (1981) The amino Terminal sequence of Several Toxins from The Venom of The Mexican Scorpion Centruroides noxius Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 46, 207-214.
38. Possani L. D., Martin B. M. Svendsen I., Rode G. S. and Erickson B. W. (1985). Scorpion Toxins from Centruroides noxius and Tityus serrulatus. *Biochem J.* 15, 739-750.
39. Reichlin M., Hay M. and Levine L. (1963). Immunochemical Studies of Hemoglobin and Mioglobin and Their Globin Moieties. *Biochemistry* 2, 970-979.
40. Reisfeld R. A., Lewis V. J. and William D. E. (1962). Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide gels. *Nature* 195, 281-283.
41. Rhodes G., Carsen D. A., Valbroch J. Haughten R., Vaugham J. H. (1985). Human Immune Response to Synthetic Peptides from the Epstein-Barre Nuclear Antigen. *J. Immunol.* 134, 211.
42. Rivier Jean E. (1980). Evaluation of Triethylammonium Phosphate and Formate-acetonitrile Mixures as Eluents for High-Performance gel Permeation Chromatography. *J. Chromatography* 202, 211-222.
43. Rochat C. H. Kopygan C., Miranda F., Lissitzky S.; Edmon P. (1970). Scorpion Neurotoxins: A Family of Homologous Proteins. *FEBS Lett.* 10, 351-359.
44. Rochat C. H. and Sampieri F. (1976). Structure-Function Relationships of Scorpion Neurotoxins, *Biochemistry* 15, 2254-2261.
45. Sampieri F and Rochat C. H. (1975). Structure-Function Relationships of Scorpion Neurotoxins. Communication at the 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. Tokio 1974. *Toxicon* 13, 120.
46. Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P. and Merrifield R. B. (1981). Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Anal. Biochem.* 117, 147-157.
47. Sarin V. K., Kent S. B. H., Mitchell A. R. and Merrifield R. B. (1984). A General Approach to The Quantitation of Synthetic Efficiency in Solid-Phase Peptide Synthesis as a Function of Chain Length. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7545.
48. Sutcliffe J. G., Schinnick T. M., Green N. and Lerner R. A. (1983). Antibodies That React with Predetermined Sites in Proteins *Science* 219, 660-666.

49. Tainer J. A., Getzof E. D., Alexander H., Houghten R. A., Olson A. J., and Lerner R. A. (1984). The Reactivity of anti-Peptide Antibodies is a Function of the Atomic Mobility of Sites in a Protein. *Natur* 312, 127-134.
50. Takagaki Y., Hirayama A., Fujio H. and Amano T. (1980). Antibodies to a Continuous Region at Residues 38-54 of Hen Egg White Lysozyme Found in a Small Fraction of anti-Hen Egg White Lysozyme Antibodies. *Biochemistry* 19, 2498-2505.
51. Watt D. D., Babin D. R., Mlejnek E. V. (1974). The Protein Neurotoxin Scorpion and Elapid Snake Venom. *J. Agric. Food. Chem.* 22, 43-51.
52. Westhof E., Altshah D., Moras D., Bloamer A. C. Mondragon A., Kluy A. and Van Regenmortel M. H. V. (1984). Correlation between Segmental Mobility and the Location of Antigenic Determinants in Proteins. *Nature* 322, 123-126.
53. Zlotkin E., Rochat H., Kopeyan C., Miranda F., Lissitzky S. (1971). Purification and Properties of the Insect toxin from The Venom of The Scorpion Androctonus australis Héctos. *Biochimie* 53, 1073-1078.

VIII. ARTICULO: Gurrola G. B., Molinar-Rode R., Zentella A. D. y Possani L. D.  
"Síntesis de péptidos y su Posible Utilización como Vacunas -  
contra Toxinas de Alacrán".

# Avances en el mecanismo de acción de fármacos

Carlos M. CONTRERAS  
Cristina CORTINAS DE NAVA  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Luis A. BARRAGAN  
Facultad de Medicina, UNAM

Prólogo de Kaethe WILLMS M.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

 MASSON

BARCELONA-MEXICO, 1984



## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
1. Genotoxicidad de Fármacos. <i>C. Cortinas de Nava, J. Espinosa, S. Vega, P. Ostrasky e I. Jiménez</i> . . . . .	1
2. Mecanismos centrales de acción hipertensiva. <i>H. Vidrio</i> . . . . .	13
3. Importancia de los receptores serotoninérgicos centrales en el efecto de algunos agentes hipertensivos. <i>E. Hong</i> . . . . .	21
4. La administración crónica de mebendazole y su aplicación en la cirrosis hepática experimental. <i>I. Díaz de León, P. Santamaría, B. Morales, R. Burrios y H. Soto</i> . . . . .	27
5. Síntesis de péptidos y su posible utilización como vacunas contra toxinas de alacrán. <i>G.B. Gurrola, R. Molinar-Rode, A.D. Zentella y L.D. Possant</i> . . . . .	35
6. Farmacocinética: Perspectivas y probabilidades. <i>H. Jung C.</i> . . . . .	59
7. Cronofarmacología. Variación circanual de la sensibilidad del ileo aislado de cobayo a la naloxona. <i>R. Rodríguez, M. Luján y E. Vargas-Ortega</i> . . . . .	67
8. Las betacarbolinas (endógenas y exógenas) propiedades y mecanismos de acción múltiples a nivel del sistema nervioso central. <i>J.A. Barragán, J.A. Galindo-Morales y A. Díaz-Vallejo</i> . . . . .	75
9. Acciones centrales de la fenciclidina, <i>J.A. Galindo Morales, A. Díaz Vallejo y L.A. Barragán</i> . . . . .	85
10. Estudio Integral de la Disfunción amigdalina producida por la inhalación crónica de tiner. <i>E. García-Castells y J. Bernat Hernández.</i>	97
11. Tolerancia al tolueno durante el desarrollo postnatal. <i>M. Lorenzana-Jiménez y M. Salas</i> . . . . .	105
12. ¿Es la dependencia física a opiáceos una desviación cuantitativa o cualitativa de la normalidad? <i>M. Luján, J. Aguilar y R. Rodríguez</i> .	115
13. Papel de los receptores opiáceos en la acción de fármacos psicotrópicos. <i>M.D. Ramírez-González, S. Arbilla y S.Z. Langer</i> . . . . .	133

14. Participación de los inhibidores de síntesis de proteínas en los procesos amnésicos. <i>G. Castro-Larrazabal</i> .....	167
15. Efecto del extracto de tila ( <i>Tilia mexicana</i> ) como hipnótico potencial. <i>J.R. Murillo, R. Tamés, C. Arenas, J.L. Díaz y C.M. Contreras</i> .....	157
16. Análisis Neurofarmacológico de un onirógeno vegetal. <i>L. Mayaguita, J.L. Díaz y C.M. Contreras</i> .....	167
17. Efecto de la perfusión intracerebral de opiáceos y sus antagonistas sobre el ciclo sueño-vigilia en el gato. <i>M. Alvarez-Rueda, E. Naranjo Rodríguez, J.A. Rojas Ramírez, M. Luján y R. Rodríguez</i> .....	179
18. Avances recientes en el estudio de las benzodiazepinas y su efecto sobre el sueño y el apetito. <i>A. Posadas Andrews y J.A. Rojas Ramírez</i> .....	197
19. La farmacología conductual: Métodos y perspectivas. <i>M. Valencia Flores y D.N. Velázquez Martínez</i> .....	209
20. Acción electrofisiológica de compuestos alucinógenos: posibles vías sinápticas de acción. <i>C.M. Contreras y G. Mexicano</i> .....	217
21. Alteraciones de la función sináptica en las psicosis. Modificación por psicofármacos. <i>R. Garnica</i> .....	225
22. La Psicofarmacología clínica experimental. <i>A. Torres Ruiz</i> .....	233
23. Función integradora del sistema nervioso central como factor determinante de los efectos producidos por las drogas. <i>C. Guzmán-Flores y M. Alcaraz</i> .....	245
24. Historia de la Psicofarmacología. <i>D. Nieto</i> .....	251

# SINTESIS DE PEPTIDOS Y SU POSIBLE UTILIZACION COMO VACUNAS CONTRA TOXINAS DE ALACRAN

---

Georgina B. Gurrola,<sup>1</sup> Ricardo Molinar-Rodríguez,<sup>1</sup>  
Alejandro D. Zentella<sup>2</sup> y Lourival D. Possani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular, Instituto de  
Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,  
UNAM, México, D.F.

## INTRODUCCION

Fue en México que la acción farmacológica de los venenos de los alacranes se estudió por primera vez en forma sistemática. El grupo del Dr. Del Pozo y colaboradores en la década de los 40 estudió la acción de los venenos de los alacranes de Durango (*Centruroides suffusus suffusus*), de Nayarit (*C. noxius*), de Guerrero (*C. limpidus limpidus*) y de Colima (*C. tecomanus*), sobre preparaciones musculares. Se observó el comportamiento de la contracción muscular y los efectos de fibrilación en relación con la inervación periférica y también del sistema nervioso central. (Del Pozo, 1948a, b, 1949a, b; Del Pozo y Anguiano 1946, 1947; Del Pozo y col., 1944, 1945).

Cerca de veinte años más tarde los primeros datos referentes a la composición y estructura de los componentes bioactivos de los venenos fueron determinados. Así se verificó que las toxinas del veneno de alacranes son de naturaleza polipeptídica. El aislamiento y caracterización bioquímica de estos componentes se realizó primeramente con venenos obtenidos de alacranes Norte-Africanos de los géneros *Androctonus*, *Buthus* y *Leiurus* (Miranda y col., 1970; Rochat y col., 1979) por un grupo de investigadores franceses. Más de una decena de toxinas fueron purificadas y caracterizadas por estos autores.

De 1962 a 1975 también se reportaron algunas características estructurales y funcionales del alacrán *C. sculpturatus* Ewing de los desiertos de Arizona (USA) y Sonora (México) (Patterson, 1962; Watt, 1964; Babin y col., 1975).

En la misma época ciertas propiedades del veneno del alacrán Brasileño *Tityus serrulatus* fueron descritas (Freire-Maia y Ferreira, 1961; Freire-Maia y Diniz, 1970; Freire-Maia y col., 1970; Diniz, 1971, Vital Brasil y col., 1973).

Cerca de treinta años después del estudio pionero de Del Pozo y colaboradores nosotros empezamos el estudio bioquímico de los alacranes Mexicanos. Hemos podido aislar a homogeneidad varias toxinas del veneno de *C. noxius* (Dent y col., 1980; Possani y col., 1981a, 1981d), *C. tecomanus* (Possani y col., 1980), y *C. elegans* (Possani y col., 1978). García (1976), Rochat y col. (1979), también contribuyeron a este estudio al aislar y determinar la secuencia de toxinas del *C. s. suffusus* de Durango. Del alacrán *T. serrulatus* también se caracterizaron varias toxinas (Possani y col., 1977, 1981c).

El veneno de los alacranes Centro Asiáticos fue estudiado, sobre to-

do por un grupo de investigadores rusos (Zhdanova y col., 1978; Grishin y col., 1980, 1981 y 1982).

Muchos otros autores han contribuido al entendimiento de diversos aspectos ligados a la bioquímica y farmacología del veneno y toxinas de los alacranes, entre ellos Stahnke, 1978; Zlotkin y col., 1978; Koppenhöfer y Schmidt, 1968; Narahashi y col., 1972; Romey y col., 1976; Cahalan, 1975; Gillespie y col., 1980; Nonner, 1979; Catterall, 1976; Jover y col., 1980; Okamoto, 1980; Meves y col., 1982; Fontecilla-Camps y col., 1980; Watt y col., 1978; Wang y Strichartz, 1983; Kenneth y col., 1982; Jaimovich y col., 1982; Norman y col., 1983).

En la literatura reciente podemos encontrar por lo menos tres revisiones muy adecuadas sobre el asunto: Zlotkin y col., (1978), Rochat y col., (1979) y Catterall (1980).

Los hallazgos más importantes de estos autores con relación a la estructura y función de las toxinas de alacranes se pueden resumir de la siguiente forma: En venenos de alacranes de la familia *Buthidae* se han encontrado dos grupos de toxinas: péptidos con 61 a 70 aminoácidos (Miranda y col., 1970; Grishin y col., 1980; Darbon y col., 1982) y péptidos con 36 a 39 aminoácidos (Zhdanova y col., 1978; Possani y col., 1982). Ambos grupos de toxinas son constituidos por péptidos con estructura primaria semejantes que se mantienen muy compactas desde el punto de vista de estructura terciaria por la presencia de 3 a 4 puentes de disulfuro. Existen excepciones a esta regla general (Zlotkin y col., 1982; Lazarovici y col., 1982). La toxicidad de estos péptidos se ha verificado en mamíferos (ratones), pollos, chapulines, larvas de mosca y cochinillas (Zlotkin y col., 1978). Dependiendo del bioensayo utilizado se han descrito las llamadas toxinas para mamíferos, insectos o crustáceos, (Rathmayer y col., 1978). Entre las principales funciones afectadas por estas toxinas está el bloqueo del canal de sodio (Catterall, 1980) y potasio (Carbone y col., 1982, 1983), así como cambios en la cinética de cierre de los canales (Nonner, 1979). Se puede afirmar que de manera general la acción de las toxinas se efectúa a nivel de canales iónicos de membranas excitables. También se ha visto un efecto de pegado a sinapsis del sistema nervioso central (Cárabez y Possani, 1982).

Desde un punto de vista antropocéntrico lo importante es que debido a la presencia de estos polipéptidos tóxicos en los venenos de los alacranes mueren muchas personas anualmente en el mundo (Balozet, 1971). Los trabajos de Bravo-Becherelle y Mazotti (1961) y López-Acuña y Alagón (1979) indican que en México cerca de 700 a 800 personas mueren anualmente victimadas por la picadura de alacrán. Esta cifra es baja cuando consideramos que más de 100,000 personas son picadas en México por año (Monroy-Velasco, 1961). El uso del suero de caballo dirigido en contra del veneno de alacranes es una de las causas que ayuda a abatir el número de muertos especialmente entre los niños de 0 a 10 años de edad, faja etaria donde se sitúan más del 90% de los casos de muerte en nuestro País.

Sin embargo los problemas de distribución o de aplicación del suero en los momentos oportunos hace la cifra de cientos de muertos demasiada elevada para dejar de preocuparnos desde un punto de vista de epidemiología y de salud pública. En realidad, el escorpionismo en ciertas regiones de México llega a ocupar el primer lugar de causa de consulta médica (morbilidad) para algunas áreas endémicas del País (ejemplo: ciertos municipios del Estado de Guerrero, Morelos o Sur de Puebla. (López Acuña y Alagón, 1979).

De esta forma queda plenamente justificada la búsqueda de nuevos fármacos que puedan ayudar en la solución del problema del escorpionismo

en nuestro medio. Una de las ideas inicialmente propuestas fue el uso del tratamiento químico del veneno de alacranes con la finalidad de obtención de una anatoxina anti-alacrán, que pudiera fungir como vacuna. Los resultados obtenidos por polimerización del extracto de telsons con glutaraldehído demostraron la posibilidad y la eficacia de tal tratamiento, por lo menos en animales experimentales de laboratorio (Possani y col., 1981b). No obstante, debido al gran número de dosis necesarias (cerca de 13 millones para todas las regiones de alacranes peligrosos) para proteger a los niños afectados del País, se pensó en una segunda alternativa: la síntesis de péptidos con misma secuencia de aminoácidos que las toxinas, pero no tóxicos, que pudieran ser utilizados como vacuna. El método de síntesis de péptidos en fase sólida desarrollado por el Profesor Merrifield de la Universidad Rockefeller (ver Material y Métodos) se ha mostrado altamente satisfactorio en este sentido. En realidad, esta idea no es novedosa, varios péptidos correspondientes a toxinas de bacterias y a proteínas de virus ya fueron sintetizados con la finalidad de usarlos como vacunas (Sela, 1983; Leach, 1983; Maurer y col., 1983 y Lerner, 1983).

La finalidad de este capítulo es describir el aislamiento y caracterización de algunas toxinas de alacranes, seguido de una exposición sobre el método de síntesis de péptidos en fase sólida. Pretendemos después mencionar los péptidos ya sintetizados con fines de obtención de vacunas experimentales y mencionar dos ejemplos específicos de péptidos de toxinas de alacrán que hemos sintetizado con el mismo objeto.

## MATERIAL Y METODOS

### PURIFICACIÓN DE LAS TOXINAS DEL VENENO DE ALACRAN

#### a. Obtención de veneno

Los venenos de los alacranes mexicanos estudiados por nosotros se obtienen de ejemplares vivos por estimulación eléctrica del telson. El veneno generalmente se recupera en agua bidestilada y se centrifuga por 15 min. a 10,000 x g (Sorval, rotor SS-34) eliminándose el precipitado. El sobrenadante es liofilizado y se guarda a -20°C hasta su uso.

#### b. Bioensayo

La presencia de las diferentes fracciones tóxicas o de las toxinas purificadas se sigue por inyección intraperitoneal en ratones albinos de 18 a 20 gramos. Los principales síntomas de intoxicación observados son: excitabilidad, sinlórrea, disnea, cianosis, parálisis de los miembros inferiores, diarrea y muerte por paro respiratorio o cardíaco. Las dosis letales medias (DL<sub>50</sub>) se determinan usualmente en 10 a 12 grupos de 10 ratones cada uno, a los cuales se inyectan dosis crecientes de veneno o fracción tóxica. Una gráfica del porcentaje de muerte versus el logaritmo de la concentración del veneno permite la determinación del punto medio de la gráfica (DL<sub>50</sub>).

#### c. Separación cromatográfica de las toxinas

La estrategia de purificación que se ha seguido involucra primeramente filtración en columna de Sephadex G-50 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) en amortiguadores de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, seguido de columnas de intercambio iónico en resinas del tipo de la carboximetilcelulosa (CM-32, Whatman Inc., Clifton, New Jersey, USA) o Bio-Rex 70 (BioRad Laboratories, Rockville Center, New York, USA) (Possani y col., 1981a, c, d).

Usualmente un segundo o tercer paso cromatográfico en las mismas resinas de intercambio iónico se requiere para la obtención de las toxinas en forma homogénea. Los datos técnicos específicos de estas cromatografías se describen en los pies de figuras (ver Resultados y Discusión) y se encuentran también descritos en las publicaciones originales (Possani y col., 1977, 1978, 1980, 1981a, b, c, d). La eliminación de las sales provenientes de los gradientes de fuerza iónica aplicados a las columnas de intercambio se hace por diálisis en membranas de poro controlado (3M, Spectrapor, Spectrum Medical Industries, Los Angeles, Ca., USA). La pureza de las toxinas se observa de rutina por electroforesis en geles de poliacrilamida a pH ácido, de acuerdo a la técnica descrita por Reisfeld y col. (1962). Otro criterio independiente de pureza de las toxinas se basa en los resultados de la secuenciación de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas, por el método que se describirá más adelante.

### CARACTERIZACION QUIMICA DE LAS TOXINAS

#### a. Análisis de Aminoácidos

Las toxinas homogéneas son hidrolizadas en ácido clorhídrico 6N 110°C por tiempos variados (24, 48, 72 y 96 horas) o en presencia de ácido metanosulfónico, de acuerdo a las técnicas de Moore y Stein (1963) y Liu y Chang (1971), y los aminoácidos resultantes se separan y cuantifican en un analizador automático Durrum D-500 (Possani y col., 1977).

#### b. Determinación de la secuencia de aminoácidos de las toxinas

Para la determinación de la estructura primaria de las toxinas homogéneas primeramente se reduce y alquila la cadena polipeptídica con reductores como el beta-mercaptoetanol o dilitreitol y se bloquean los grupos sulfidrilos con iodoacético ó 2-vinilpiridilo (Possani y col., 1981a, c). Para la obtención de la secuencia completa de aminoácidos de las toxinas es necesario casi siempre romper la cadena en péptidos menores y separarlos cromatográficamente (Babin y col., 1975). Esto se obtiene en la mayoría de las veces por tratamiento enzimático con enzimas hidrolíticas de especificidad del tipo peptidásico, como la proteinasa V.8 de *Staphylococcus aureus*, tripsina y carboxipeptidasa Y (Rochat y col., 1979, Possani y col., 1982).

Tanto la región N-terminal de la secuencia de aminoácidos como la secuencia de los péptidos intermedios de las toxinas se determinan automáticamente por la reacción de Edman (Edman y Begg, 1967) en un aparato Beckman modelo 890 C. Los aminoácidos derivados que se obtienen del secuenciador automático se identifican por cromatografía líquida de alta presión (aparato Hewlett Packard), por cromatografía en capa fina, por conteo de radioactividad en el caso de aminoácidos derivatizados con reactivos conteniendo radioisótopos, o finalmente por análisis de aminoácidos (Durrum D-500) de los fenilhidantoina-aminoácidos hidrolizados con ácido iodhídrico (Possani y col., 1977, 1981a, c).

#### c. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en estos experimentos son de calidad de altísima pureza y se obtienen de las compañías como Pierce Chemical Co., Beckman Instruments y otras indicadas en los trabajos originales (Possani y col., 1977, 1981a, c).

### CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LAS TOXINAS

Hasta el momento hemos utilizado tres métodos diferentes para verificar el mecanismo molecular del sitio de acción de las toxinas purificadas del veneno de alacranes.

Los datos más significativos se obtuvieron utilizando como bioensayo membranas del axon gigante de calamares (*Loligo vulgaris*) mantenidas en voltaje-sostenido, de acuerdo a la técnica descrita por Carbone y col., (1982).

La utilización de la microscopía electrónica de cortes del cerebro de ratas tratadas con toxina y anticuerpos específicos marcados con ferritina fue importante en los experimentos de localización tisular del sitio de acción de las toxinas del veneno de *C. noxius* (Cárabez y Possani, 1982).

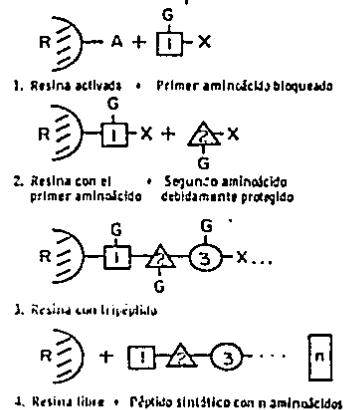
Finalmente algunos experimentos iniciales de captación de neurotransmisores químicos marcados radioactivamente, por sinaptosomas de cerebro de ratones también se realizaron para verificar el mecanismo de acción de ciertos venenos (Colomer y col., 1978).

### SINTESIS DE PEPTIDOS EN FASE SOLIDA

Como uno de los objetivos principales de este capítulo es describir la obtención de nuevos fármacos (péptidos bioactivos) por síntesis química, dedicaremos más tiempo y espacio a la presentación del método y a la discusión de algunos datos técnicos correspondientes.

En la Figura 1 se visualiza el esquema general del método y en la figura 2 se presenta la formulación química de los eventos importantes de la síntesis, según la describe Merrifield (1963).

Figura 1. ESQUEMA DEL METODO DE SINTESIS DE PEPTIDOS EN FASE SOLIDA



En el primer (1) paso el soporte sólido, resina (R) actividad (A), es puesta a reaccionar con el primer aminoácido (1) representado por un cuadrado. La presencia de bloqueadores específicos de la cadena lateral del aminoácido se representa por G y el grupo alfa-amino está protegido por un grupo BOC(X). En el paso 2 la resina que ya contiene el primer aminoácido, previa liberación de X (desprotección), es puesta a reaccionar con un segundo aminoácido (2) representado por un triángulo. De la misma forma se procede al acoplamiento de un tercer aminoácido (3, círculo) y de los subsiguientes n aminoácidos deseados (rectángulo). Al final el péptido es liberado por reacciones que eliminan los grupos protectores y rompen al mismo tiempo el enlace con el soporte sólido.

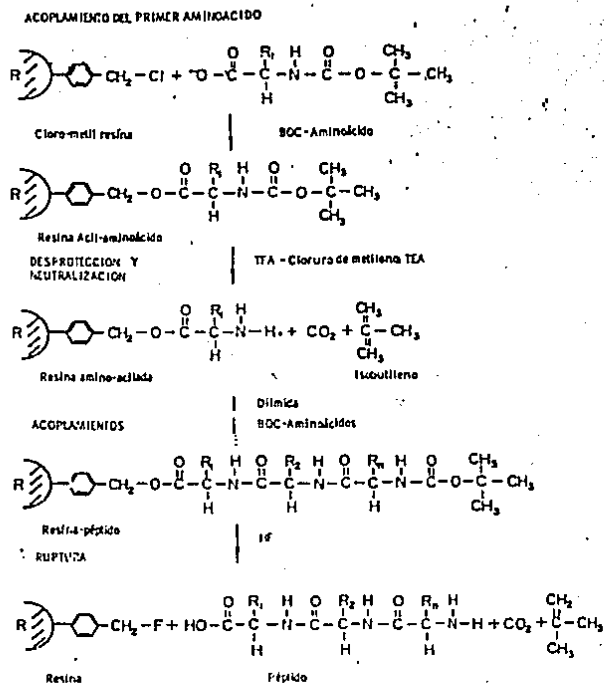


Figura 2. ESQUEMA CENTRAL DE LAS REACCIONES QUIMICAS QUE OCURREN EN EL METODO DE SINTESIS DE PEPTIDOS

Al acoplamiento del primer aminoácido, como está indicado en la figura, se sigue el paso de desprotección con trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno y la neutralización con trietilamina (TEA). El acoplamiento del siguiente aminoácido se hace con la ayuda de ciclohexilcarbodiimida (DCC). Los dos pasos anteriores se repiten de forma cíclica para cada nuevo aminoácido de la secuencia. Al término de la síntesis la ruptura del péptido del soporte sólido y la remoción de todos los grupamentos protectores de los radicales laterales de los aminoácidos se hace con ácido fluorhídrico (HF).

La premisa fundamental de la síntesis de péptidos en fase sólida es, que los aminoácidos se pueden ensamblar en un péptido en la secuencia deseada mientras la cadena polipeptídica está anclada en un soporte insoluble. Después de que la secuencia deseada ha sido sintetizada se puede romper la cadena del soporte y liberar el péptido en solución.

El soporte sólido es un polímero sintético que tiene grupos químicos reactivos. Estos grupos se hacen reaccionar con el grupo carboxilo de un aminoácido de tal manera que forma un enlace covalente al polímero. Durante este paso, el grupo amino del aminoácido está protegido de modo que no puede reaccionar con el polímero.

El grupo protector se remueve selectivamente sin dañar el enlace del aminoácido al soporte. Después de quitar el grupo protector, un segundo aminoácido N-protégido, se hace reaccionar con el grupo amino expuesto del primer aminoácido formando así el primer enlace peptídico.

Repetiendo estos dos pasos de desprotección y acoplamiento usando cada vez el aminoácido N-protégido apropiado, la secuencia deseada del péptido se ensambla al polímero. Al final de la síntesis, se aplica un reactivo que específicamente rompe la unión del primer aminoácido al polímero (generalmente es un enlace tipo éster que se rompe con tratamiento ácido en condiciones drásticas), sin afectar los enlaces peptídicos, quedando el péptido libre en solución.

Las técnicas de fase sólida tienen ciertas ventajas sobre los métodos en solución, primero los péptidos unidos al soporte insoluble se pueden separar de los reactivos solubles y los productos laterales simplemente por lavados repetidos del soporte sólido, los reactivos solubles pueden usarse en exceso para forzar a que la reacción sea completa y obtener un mejor rendimiento. La síntesis en sí es más rápida ya que todas las reacciones se llevan a cabo en el mismo vaso de reacción, evitando repetidas transferencias de los intermediarios y pérdidas del material. Todas las reacciones involucradas en el crecimiento de la cadena peptídica pueden realizarse automáticamente.

El lector interesado podrá consultar las revisiones publicadas por Stewart y Young, 1968; Erickson y Merrifield, 1976; Barany y Merrifield, 1980.

#### SINTESIS DE PEPTIDOS CORRESPONDIENTES A TOXINAS DE ALACRANES MEXICANOS.

Los péptidos correspondientes a la secuencia N-terminal (treonina-1 a serina-9) de la Noxiustoxina, y el correspondiente a la secuencia N-terminal de la toxina II-9.2.2 (Lisina-1 a Treonina-10) del veneno del alacrán mexicano *C. noxius* se sintetizaron de acuerdo al método descrito por Merrifield.

Se usó cloro-metil-resina de Bio-Rad Laboratories, y BOC-amino ácidos de Peninsula Laboratories, Inc. (San Carlos, Ca. U.S.A.). (Tabla No. 1).

La síntesis se lleva a cabo a partir del aminoácido de posición C-terminal (la síntesis se realiza de carboxilo a amino).

Cuatro milimoles (mmol) del primer amino ácido Boc-Ser (Bzl) para la Noxiustoxina y Boc-Tre(Bzl) para la toxina II-9.2.2, se disolvieron en aproximadamente 2 ml de metanol y se añadieron 2 mmol de carbonato de cesio disueltos en 0.3 ml de agua. Se concentró en rotavapor y se eliminó el agua con tolueno (3 veces aprox. 5 ml cada vez) y con cloroformo (5 veces, aproximadamente 5 ml cada vez). El producto se dejó en el desecador 12 horas.

Esta sal de cesio del aminoácido, se disolvió en 8 ml de dimetilformamida (DMF) (J.T. Baker). De éstos se tomaron 2 ml (aprox. 1 mmol) y se añadió a un vial con 1 g de Cl-metil-resina (0.67 meq/g) suspendida en el mínimo de volumen de DMF (aprox. 4 ml). Se dejó en baño de agua a 50°C por 17 horas.

Boc-Ala	N-terbutiloxycarbonil-alanina
Boc-Arg (TOS)	N-terbutiloxycarbonil-N-p-toluenesulfonil-arginina
Boc-Asn	N-terbutiloxycarbonil-asparagina
Boc-Asp (ODZL)	N-terbutiloxycarbonil-O-bencil-aspartico
Boc-Cys (4Me-BZL)	N-terbutiloxycarbonil-S-4-metil-bencil-cisteina
Boc-Gln	N-terbutiloxycarbonil-glutamina
Boc-Glu (QBZL)	N-terbutiloxycarbonil-O-bencil-glutámico
Boc-Gly	N-terbutiloxycarbonil-glicina
Boc-Ile, 1/2 H <sub>2</sub> O	N-terbutiloxycarbonil-isoleucina
Boc-Leu, 1/2 H <sub>2</sub> O	N-terbutiloxycarbonil-leucina
Boc-Lys (C-Z)	N-terbutiloxycarbonil-N-eflora-bencil-oxycarbonil-lisina
Boc-Met	N-terbutiloxycarbonil-metionina
Boc-Phe	N-terbutiloxycarbonil-fenilalanina
Boc-Pro	N-terbutiloxycarbonil-prolina
Boc-Ser (BZL)	N-terbutiloxycarbonil-O-bencil-serina
Boc-Thr (DZL)	N-terbutiloxycarbonil-O-bencil-treonina
Boc-Trp	N-terbutiloxycarbonil-triptofano
Boc-Trip (C10)	N-terbutiloxycarbonil-N-formil-triptofano
Boc-Tyr (C12-BZL)	N-terbutiloxycarbonil-O-2,6-clorobencil-tirosina
Boc-Val	N-terbutiloxycarbonil-valina
Boc-His (TOS)	N-terbutiloxycarbonil-N-4-toluenesulfonil-histidina

TABLA 1

La resina se pasó a un vaso de reacción y se lavó con cloruro de metileno 5 veces (aproximadamente 10 ml cada vez).

El resto de la sal de cesio del aminoácido (aprox. 3 mmol) en 6 ml de DMF, se mezclaron con la resina y se dejaron en agitación por 48 horas a temperatura ambiente.

La resina se lavó: 2 veces con DMF, una vez con DMF-H<sub>2</sub>O (9:1), DMF, DMF-etanol (1:1), cloruro de metileno, isopropanol, cloruro de metileno.

Se tomó una muestra (2.5 mg para la resina con Boc-Ser, 1.95 mg para la resina con Boc-Tre), para análisis de aminoácidos, en el analizador Durrum D-500.

Se obtuvo 0.1 mmol de serina por gramo de resina y 0.22 mmol de treonina por gramo de resina.

La desprotección del Boc-aminoácido se realizó con 10 ml de ácido trifluoroacético (TFA) (Pierce Chemical Co.) al 50% en cloruro de metileno, se lavó después 5 veces con cloruro de metileno (5 ml). Se neutralizó con trietilamina (TEA) al 5% también en cloruro de metileno.

El siguiente Boc-aminoácido (0.3 mmol para la Noxiustoxina y 0.66 mmol para la toxina II-9.2.2) disuelto en aproximadamente 1 ml de cloruro de metileno se agregó junto con dicitclohexilcarbodiimida (DCC) de Aldrich Chemical Co. N. Jersey USA, (0.3 mmol para Noxiustoxina y 0.66 mmol para la toxina II-9.2.2) como agente acoplante. Se ajustó el volumen con cloruro de metileno a aproximadamente 5 ml.

La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 2 horas.

Se lavó la resina con cloruro de metileno 5 veces, con isopropanol 2 veces, cloruro de metileno 2 veces, isopropanol 2 veces y cloruro de metileno 5 veces.

Un ciclo comprende desde la neutralización hasta el último lavado.

Después de cada ciclo se controló la reacción por cuantificación de grupos amino libres por reacción con ninhidrina (Sarin y col., 1981). Si aún existían grupos aminos libres se realizaba un nuevo ciclo en las mismas condiciones. Cuando al llegar hasta un tercer ciclo aún existiera grupos aminos libres entonces se procedía a acetilar la resina para bloquear estos grupos. Se sigue el mismo procedimiento para los siguientes aminoácidos a partir de la desprotección.

Una vez completada la secuencia se procedió a la separación de los péptidos de la resina, usada como soporte sólido. La resina se pasó a un vaso de reacción y se agregó 1 ml de anisol (J.T. Baker) para evitar daños a los aminoácidos tirosina, cisteína y metionina y se dejó reaccionar con ácido fluorhídrico (HF) a 0°C en agitación, en un aparato Península, modelo estándar. Después de 45 minutos se evaporó el ácido fluorhídrico. Al final del ciclo de desprotección se pasó la resina a un embudo y se extrajo el anisol con éter etílico. Los péptidos que son generalmente insolubles en éter se extraen en ácido acético del 2 al 10% dependiendo de la hidrofobicidad del péptido. En nuestro caso se extrajo con 100 ml de ácido acético al 3% y se agregó un equivalente de agente reductor (ditiotretol) por cada cisteína de péptido.

El ácido se evaporó en un rotavapor (Büchi) y los péptidos se liofilizaron. Se hizo análisis de aminoácidos de los péptidos, y se aplicó una pequeña muestra en el cromatógrafo líquido de alta presión para verificar el estado de pureza de los péptidos obtenidos. Los datos de análisis y recuperaciones respectivos están mencionados adelante (ver Resultados y Discusión).

#### PROTOCOLO DE INMUNIZACION

Considerando que los dos péptidos sintéticos correspondientes a las toxinas de alacranes que obtuvimos son relativamente pequeños juzgamos que para la finalidad de obtención de una vacuna no sería absolutamente necesario dedicar mucho esfuerzo a la purificación del péptido sintético que tuviera exactamente la secuencia deseada (ver Resultados y Discusión). Por esta razón y como se trataba de un primer experimento en este sentido, utilizamos los péptidos tal como se obtienen del rompedor de péptidos, para la inmuni-

zación de los animales de laboratorio (ratones).

Los péptidos se polimerizaron con glutaraldehído. A una solución de 4 mg de péptido por ml se le agregó poco a poco una solución de 0.25% de glutaraldehído y se agitó la mezcla a temperatura ambiente por 4 horas.

Los polímeros de los péptidos se homogenizaron con adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) y se inyectaron a grupos de 6 ratones albinos hembras de la cepa BALB/b, de acuerdo al siguiente esquema: En la primera inyección de inmunización, se aplicaron 100 µg de péptido por vía subcutánea en dos puntos subadyacentes del lomo del ratón.

La segunda inyección se realizó a los 8 días, pero ahora se inyectaron 200 µg de péptido. Las siguientes dos inmunizaciones (tres y cuatro semanas) se llevaron a cabo con adyuvante incompleto.

Los animales recibieron dos nuevas inyecciones (seis y ocho semanas) pero ahora sin adyuvante.

Se tomaron muestras de suero a las 4, 6 y 8 semanas después de la primera inyección.

Los sueros obtenidos están siendo analizados en el laboratorio por técnicas de inmunodifusión y por hemaglutinación. También serán verificados con relación a su poder neutralizante "in vitro" y dependiendo de los resultados los ratones inmunizados serán desafiados "in vivo", con las toxinas correspondientes.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Purificación y Caracterización de Toxinas del Veneno de Alacranes

Gran parte de los hallazgos encontrados durante la purificación de las toxinas de los alacranes mexicanos ya fueron publicados (Dent y col., 1980; Possani y col., 1978, 1980, 1981a, d, 1982).

Por esta razón en la Figura 3 nos limitamos a dar un ejemplo de los perfiles cromatográficos obtenidos en la purificación de las toxinas II-9.2.2 y II-11 (Noxiustoxina) del veneno de *C. noxius*. Parte de los datos de secuencia de estas dos toxinas fueron utilizados para la síntesis de péptidos, como se discutirá más adelante.

En la Fig. 3a se presentan los resultados de filtración en gel de Sephadex G-50 del veneno de *C. noxius*. Solamente la fracción II fue tóxica a mamíferos. Cabe recordar que el veneno de *C. noxius* es el más potente de los venenos estudiados por nosotros hasta el momento; su DL<sub>50</sub> en ratones albinos es del orden de 5 µg/20 gramos de peso de ratón (Dent y col., 1980). La fracción II fue sometida a una columna de CM-celulosa en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 y eluida con un gradiente salino de cloruro de sodio (Fig. 3b). De los 14 componentes obtenidos, las fracciones II-8 a II-14 fueron tóxicas a ratones, mientras que la fracción II-5 y II-6 fueron tóxicas a crustáceos (acociles y cangrejos) (Possani y col., 1981a).

La fracción II-9, componente mayor del veneno, después de dializar, fue recromatografiada en una columna de CM-celulosa en un sistema semejante a la Fig. 3b (Possani y col., 1981a).

La separación obtenida fue relativamente pobre por lo que se juntaron los componentes tóxicos II-9.2 y II-9.3 bajo la denominación de fracción II-9.2 y se aplicaron a una columna de Bio-Rex 70 como originalmente se describió (Possani y col., 1981d), resultando el perfil cromatográfico mostrado en la Fig. 3c. El componente II-9.2.2 se comportó de forma homogénea en el sistema electroforético de Reisfeld y col. (1962) y fue utilizado para análisis de aminoácidos y determinación de estructura primaria (Possani y col., 1981a; 1982). El peso molecular de esta toxina fue calculado en 7,371. Su composición revela la presencia de 65 aminoácidos con 4 puentes disulfuros.

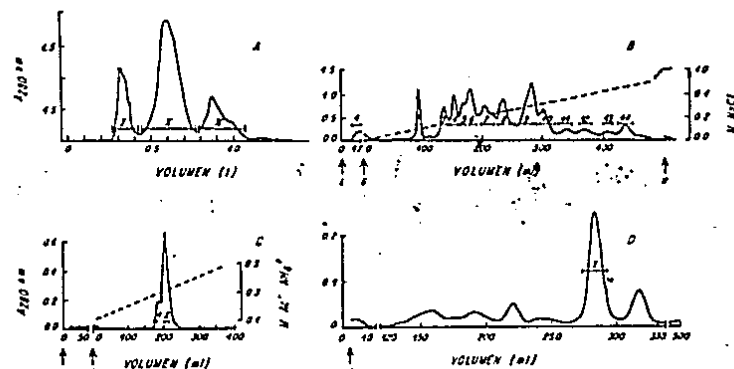


Figura 3. SEPARACIONES CROMATOGRAFICAS DEL VENENO DEL ALACRAN *C. noxius*

- A) Columna de Sephadex G-50 (2.9 x 1.70 cm) a la cual se aplicaron 500 mg (6.3 ml) de veneno soluble. La columna fue eluida con amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 a una velocidad de 60 ml/hr (tubos de 10 ml). Tres fracciones (I-III) correspondientes a 17%, 63% y 20% respectivamente fueron colectadas. La fracción II (tóxica) fue recromatografiada, como se indica abajo.
- B) Columna de Carboximetilcelulosa (0.9 x 27 cm). Se aplicaron 95 mg de fracción II en el mismo amortiguador de (A), y la elución se hizo con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 0.5 M (240 ml en cada reservorio). Fracciones de 2.4 ml fueron colectadas a una velocidad de 20 ml/hr. Se obtuvieron 14 fracciones, de las cuales la 8 a la 14 son tóxicas a mamíferos y la 6 es tóxica a crustáceos. El componente 9 (II-9) fue recromatografiado en las mismas condiciones de la fig. B. Debido a falta de resolución en la segunda columna de carboximetilcelulosa el material tóxico se juntó bajo la denominación de componente II-9.2. I<sub>1</sub> = cargado del material; G = inicio del gradiente; W = lavado con 1 M de NaCl.
- C) Cromatografía del componente II-9.2 en una columna (0.9 x 9.3 cm) de Bio-Rex 70. Un total de 22.6 mg de proteína en 75 ml de solución se aplicó a la columna que fue eluida con un gradiente lineal de acetato de amonio, pH 6.5, de 0.09 M a 0.5 M (200 ml de amortiguador en cada lado del gradiente). La velocidad de flujo fue de 24 ml/hr y se colectaron fracciones de 2.2 ml cada una. El componente II-9.2.2 se mostró homogéneo por gel electroforésis en el sistema de Reisfeld (1962).
- D) Cromatografía del componente II-11 de la figura B en carboximetilcelulosa. A una columna (0.9 x 27 cm) se aplicaron 8.2 mg del componente II-11 (B) en presencia de 50 mM de fosfato de potasio, pH 6.0. Se eluyó de la columna con un gradiente lineal (no presentado en la figura) de cloruro de sodio de 0 a 0.38 M (250 ml cada lado del gradiente). Se corrió a un flujo de 30 ml/hr y se colectaron fracciones de 2.5 ml. El componente tóxico (I') más importante se mostró también homogéneo en el sistema electroforético de Reisfeld (1962).



La Fig. 3d reporta el perfil obtenido en la recromatografía del componente II-11 de la Fig. 2b, en un amortiguador de fosfatos a 50 mM, pH 6.0. De esta forma se obtuvo pura la toxina que denominamos Noxiustoxina (Possani y col., 1982). Esta molécula está constituida por 39 aminoácidos con un peso molecular de 4.184 y 3 puentes disulfuros. La Noxiustoxina (NTX) es la primera toxina de naturaleza peptídica reportada que afecta de forma selectiva al canal de potasio de membranas de axon gigante de calamar (Carbone y col., 1982). En la Fig. 4 se ilustra este efecto. La inhibición es reversible. Cuando se lava la preparación con solución que no contiene toxina el trazado del flujo de iones de potasio a través de la membrana se recupera en un 80% de los niveles iniciales (control). De la misma forma se encontró que el componente II-10 (Fig. 3b) del veneno de *C. noxius*, tiene afinidad específica por el canal de sodio de la misma preparación de axon gigante. Bloquea de forma selectiva y reversible el flujo de iones sodio, sin cambiar aparentemente la cinética de cierre de este canal (Carbone y col., 1982). Este es uno de los hallazgos farmacológicos diferenciales entre las toxinas de veneno de alacranes americanos y norteafricanos. Para toxinas de alacranes norteafricanos y centro asiáticos se había descrito que afectan la cinética de cierre del canal de sodio (Cahalan, 1975, Nonner, 1979) prolongando el potencial de acción. Datos confirmatorios de lo arriba expuesto fueron obtenidos por Gillespie y col., (1980); Meves y col., (1982) y Wang y Strichartz (1983).

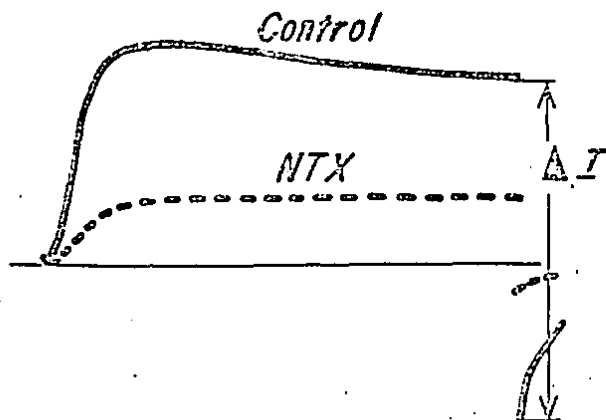


Figura 4. ACCION DE LA NOXIUSTOXINA (NTX) EN LOS CANALES DE POTASIO DEL AXON GIGANTE DEL CALAMAR

La gráfica se obtuvo directamente del osciloscopio. El efecto de la NTX se estudió en axones preparados y sometidos a la técnica de voltaje sostenido de acuerdo al trabajo de Carbone y col. (1982, 1983). La fracción de canales de potasio bloqueada por la NTX se puede estimar a partir de los valores del salto de corriente ( $\Delta I$ ) obtenidos en presencia de NTX y en ausencia de toxina (Control).

Otro hallazgo importante obtenido con el veneno de *C. noxius* fue realizado con la fracción II de la Fig. 3a. Esta fracción fue usada para la purificación de anticuerpos específicos por inmuno adsorción. Los anticuerpos obtenidos fueron acoplados con ferritina y utilizados para microscopía elec-

trónica, como se describió en el trabajo de Cárabez y Possani (1982). El sitio de acción de por lo menos uno de los componentes tóxicos de la fracción II está en la sinapsis de la corteza cerebral de rata, o por lo menos, es capaz de pegarse específicamente a algún constituyente de la membrana sináptica. Todavía no se completan los experimentos con la finalidad de determinar cual de los 14 componentes de esta fracción es él, o los, responsables de los resultados obtenidos por microscopía electrónica.

Igualmente trabajando con sinaptosomas del cerebro de ratones, Colomer y col. (1978) demostraron la existencia de inhibición en la captación de GABA (ácido gama-aminobutírico) y glutamato marcados con radioisótopos, por efecto de la fracción II de *C. elegans*.

Desde el punto de vista estructural, que es lo más importante para los fines de este capítulo, la secuencia N-terminal de varias toxinas de la especie de alacranes mexicanos fueron determinadas. Todas pertenecen a alacranes del género *Centruroides* y los datos se presentan en la Tabla 2. Las secuencias subrayadas corresponden a los péptidos que se sintetizaron (toxinas C.n. II-9.2.2 y NTX).

Como se observa en esta tabla, el mayor número de secuencias N-terminal estudiadas hasta el momento se refieren al *C. noxius*. Seis toxinas distintas de este alacrán tienen su secuencia de aminoácidos de la región N-terminal conocidas.

#### SINTESIS DE PEPTIDOS PARA UTILIZACION COMO VACUNAS

El mensaje intercelular en eucariotes pluricelulares se define cada vez más en función de substancias de naturaleza polipeptídica. Entre ellas están las hormonas (ejemplo: la insulina, la hormona de crecimiento), las enzimas de procesamiento de las mismas (ejemplo: proteínas), los neuromoduladores (ejemplo: encefalinas, endorfinas), las neurotoxinas (ejemplo: toxinas de alacranes) y de manera general proteínas o péptidos tóxicos como por ejemplo las proteínas de la cápsula externa de virus (hepatitis B), o toxinas de pared celular de bacterias. Estas péptidos bioactivos fueron encontrados en toda la escala filogenética y sus funciones o la interferencia que causan a nivel de la comunicación intercelular vive actualmente momentos de gran euforia y desarrollo científico, con hallazgos sorprendentes, a tal punto que los compuestos sencillos como la acetilcolina, o los fármacos heterocíclicos como los alcaloides están pasando a un segundo plano en el contexto del estudio de los llamados mediadores químicos.

Por esto la síntesis química controlada de péptidos en el laboratorio abre la posibilidad del diseño de una infinidad de nuevos fármacos que seguramente revolucionarán la Farmacología dándole un empuje y abriendo perspectivas nunca antes soñadas.

La factibilidad del método de síntesis en fase sólida fue primero demostrada con la obtención del tetrapéptido: leucil-alanil-glicil-alanina por Merrifield (1963). En seguida se extendió a la síntesis de bradiquinina, (Merrifield, 1964) angiotensina, insulina y otros péptidos, llegando a aplicarse a la síntesis de varias proteínas, como la ribonucleasa A.

En el campo de la Inmunología el uso de péptidos sintéticos como antígenos ha servido para el mejor conocimiento de los determinantes antígenicos. Se ha distinguido claramente entre determinantes secuenciales, aquellos cuya especificidad es enteramente determinada por una secuencia continua

TABLA n.2. SECUENCIA N-TERMINAL DE TOXINAS DE ALACRANES DEL GENERO CENTRUROIDES

TOXINA	SEC U E N C I A	REFERENCIA
	1                    10                    20	
C. n. II-9.2.2	KFGYLVDEKNTGCKYECLKIGDNDY -- CL	Possani y col., 1981a
C. n. NTX*	ZHNKCTSI/RQCSKIYCKELYGSAGAK	Possani y col., 1982
C. n. II-10	KEGYLVN	Possani y col., 1981a
C. n. II-13	KEGYVDPYHDGCKYCYKIGDNDY -- XL	Possani y col., 1981a
C. n. II-14	KDGYLVDAK-GCKKNKYKLGKNDY -- CN	Possani y col., 1981a
C. n. II-10.2	TFIDVKCGSSKECXF	Possani y col., 1982
C. sE I*	KDGYLVEKT-GCKKTCYKLGENDF -- CN	Babin y col., 1975
C. sE V <sub>1</sub> *	KEGYLVKKSDDGCKYDFWLGKRNHINTCE	Babin y col., 1974
C. sE V <sub>2</sub> *	KEGYLVKKSSTGCKYGCCLKIGENEGKCE	Babin y col., 1974
C. sE V <sub>3</sub> *	KEGYLVKKSDDGCKYCYKLGENEG -- CD	Fontecilla-Camps y col., 1980
C. s. s. I	KEGYLVKKSSTGCKYECLKIGDNDY -- CL	García, 1976
C. s. s. II*	KEGYLVKKSSTGCKYECLKIGDNDY -- CL	García, 1976
C. e. II-6.3	KZGYLVHIIISTGCKYVZCFKLGBBBY -- CL	Ramírez y col., 1981
C.I. I. II-9.3	KZGXLYVBIIXTGC	Possani y col., 1980

\* Secuencia de aminoácidos completa conocida (ver referencia)

Las abreviaturas utilizadas corresponden a los nombres científicos de los alacranes: C. n. (*Centruroides noxalis*); C. sE (*C. sculpturatus*); C. s. s. (*C. suffusus suffusus*); C. e. (*C. elegans*); C. I. I. (*Leopoldus teoconanus*). NTX significa Noxiustoxina. Trazo (\*) fue introducido para aumentar la homología de las secuencias. X significa aminoácido desconocido. Las é y s secuencias subrayadas fueron sintetizadas.

de aminoácidos, azúcares o nucleótidos y determinantes conformacionales, aquéllos cuya especificidad está controlada por la posición de los átomos en el espacio, que pueden corresponder a diferentes segmentos de la macromolécula lineal. Estas diferencias se han demostrado por estudios con polímeros lineales de misma composición de aminoácidos pero difiriendo en su conformación estérica. Esto ha sido útil para el conocimiento del mecanismo de la respuesta inmune, su relación con el complejo principal de histocompatibilidad y especificidad de las células T y B. (Leach, 1983; Maurer y col., 1983 y Mozes, 1983).

Se ha demostrado que solamente una fracción de anticuerpos inducidos por un complejo macromolecular inmunogénico con actividad biológica, está directamente involucrado en la neutralización de dicha actividad. Así resulta que no es necesario que todos los determinantes antigénicos de un antígeno (virus, bacterias, toxinas) estén presentes para producir anticuerpos que inhiban su actividad biológica.

Como un sistema modelo el grupo de Michael Sela (1983) escogió el colifago MS2, con lo que demostró que dos polipeptidos sintéticos de 18 y 20 aminoácidos (P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub>) análogos a la cápsula viral, indujeron la producción de anticuerpos capaces de neutralizar el efecto de este virus (Langbeheim y col., 1976).

Es lógico pensar que el péptido P<sub>2</sub> asuma una conformación estérica parecida a la que tiene este fragmento en la proteína intacta de la cápsula y que esta conformación es también conservada en el fago intacto.

En este estudio los antígenos sintéticos se administran homogenizados con adyuvante completo de Freund a animales de experimentación, después se demostró que el acoplamiento a un peptidoglicano aislado de *Bacillus megaterium* y administrado con el mismo adyuvante daba mejores resultados (Langbeheim y col., 1978).

Se ha reportado la síntesis de péptidos análogos a la secuencia comprendida entre los aminoácidos número 186 y 201 de la cadena A de la toxina diftérica. Estos péptidos se acoplan a albúmina sérica bovina y se inyectan a cobayos con adyuvante completo de Freund produciendo anticuerpos capaces de neutralizar la actividad dermonecrótica de la toxina diftérica. El antisero confiere protección contra la actividad letal de la toxina en cobayos (Audibert y col., 1981).

El mismo grupo de Audibert reporta en 1982 un conjugado sintético comprendiendo un hexadecapéptido (la secuencia comprendida entre los aminoácidos número 186 y 201 de la toxina diftérica) y un muramil dipéptido (N-acetil neuramín-L-alanil-D-isoglutámico) unido a un acarreador sintético, una multicadena de poli-DL-alanina con el cual obtiene una respuesta inmune más efectiva.

Se sintetizaron fragmentos de la proteína M de *Streptococcus pyogenes* y se inyectaron en conejos obteniendo buenos títulos de anticuerpos en seis semanas, sin embargo, sólo un antisero fue capaz de opsonizar a un tipo de estreptococo, indicando así que esta secuencia puede ser serotipo específico, en contraste a la especificidad de la respuesta inmune humoral la respuesta celular presenta alta reacción cruzada. (Beachley, II. y col., 1981).

Los anticuerpos obtenidos fueron incapaces de reaccionar en el tejido cardíaco de estos animales.

Estudios más extensos se han hecho con virus de la influenza. Müller y sus colaboradores (1982) sintetizaron el péptido correspondiente a la secuencia comprendida entre los aminoácidos 91 y 108 de la hemaglutina del tipo AH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> del virus de la influenza. Acoplaron este péptido a toxoide tetánico y los conjugados resultantes se homogenizaron con adyuvante completo de Freund y se inyectaron en conejos y ratones. Los anticuerpos producidos demostraron una marcada reacción cruzada con el virus intacto de la capa A/TEX/77. Estos anticuerpos fueron capaces de inhibir la hemaglutinación de los eritrocitos de pollo por el virus.

Estudios preliminares indican que ratones de la cepa C3H/Di Sn inmunizados por el conjugado están parcialmente protegidos contra una posterior infección. Estos resultados indican la eficiencia del material sintético para producir una respuesta inmune anti-influenza.

El grupo de Lerner (1983) sintetizó 20 péptidos correspondientes a 75% de la molécula de hemaglutinina HA1 del virus de la influenza, mostrando una amplia variedad de estructuras secundarias y terciarias. Cada péptido se inyectó unido a un acarreador (hemocianina) en conejos, los anticuerpos producidos se hicieron reaccionar con los péptidos unidos a su acarreador, con la molécula completa de hemaglutinina y con el virus completo. Se obtuvieron anticuerpos contra los 20 péptidos; 15 de éstos anticuerpos reaccionaron con la molécula de hemaglutinina y 17 de ellos reconocieron al virus intacto.

Estos resultados sugieren que la inmunogenicidad de la molécula completa no es la suma de la inmunogenicidad de sus partes y que depende de las partes expuestas en la molécula. (Green y col., 1982).

Es conocido que la especificidad antigénica del virus de la influenza es debida principalmente a determinantes sobre la molécula de hemaglutinina y que éstos varían ampliamente en la secuencia de aminoácidos, pero se han encontrado varios aminoácidos que se conservan dentro de esta secuencia. La localización y síntesis del principal sitio antigénico e inmunogénico de la molécula de hemaglutinina ofrecerá péptidos que pueden ser usados como estrategia efectiva de vacunación.

En el trabajo de Atassi y Webster (1983) muestran que los residuos 1 a 11 de la molécula de hemaglutinina HA2 (correspondiente a la región de fusión) representa un importante sitio antigénico sobre el virus de la influenza.

Se sintetizaron trece péptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos, predicha por secuencia de nucleótidos, del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; siete de éstos pueden producir una respuesta inmune en conejo. Los antisueros obtenidos fueron capaces de precipitar partículas "Dane" del virus. (Lerner y col., 1981).

Dreesman y colaboradores (1982) usaron una técnica de análisis computarizada para predecir dos regiones hidrofóbicas del antígeno de superficie del virus de la hepatitis. Sintetizaron dos péptidos cíclicos conteniendo enlaces disulfuro en la región comprendida entre los aminoácidos 117 y 137. Los dos péptidos se incorporaron a diversos adyuvantes y éstos fueron inyectados a grupos de ratones intraperitonealmente, obteniendo anticuerpos el día 14 después de la primera inyección. Esto demuestra que se puede inducir la producción de anticuerpos sin necesidad de unir los péptidos a proteínas acarreadoras.

Basados en la predicción de la estructura secundaria, por análisis de

las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, y en la importancia de los residuos de lisina para la antigenicidad, se sintetizaron siete péptidos correspondientes a la región comprendida entre los aminoácidos 121 y 160 del determinante A del antígeno de superficie de la hepatitis B.

La antigenicidad e inmunogenicidad de estos péptidos es baja en comparación con el antígeno natural, posiblemente el determinante A esté constituido de secuencia continua o discontinua con residuos adyacentes espacialmente que no están directamente unidos al péptido y depende de una conformación específica que posiblemente involucra residuos de lisina y cisteína. (Bhatnagar y col., 1982).

En la tabla 3 resumimos algunos de los péptidos sintéticos obtenidos de la literatura contemporánea, relativo a la posible utilización de péptidos sintéticos como vacunas.

Péptidos análogos a:	Referencia
Cápside del colifago MS-2 P <sub>2</sub> Glu <sub>89</sub> - Ala <sub>107</sub> P <sub>3</sub> Glu <sub>109</sub> - Tyr <sub>129</sub>	Longbeheim y col., 1976
Proteína M de <i>Streptococcus pyogenes</i> Péptido S-CD7 (Asn <sub>1</sub> - Met <sub>35</sub> ) Péptido S-18-29 CD7 (Ala <sub>18</sub> - Lys <sub>29</sub> )	Beachey y col., 1981
Toxina Diftérica Ser <sub>194</sub> - Cys <sub>201</sub> Arg <sub>190</sub> - Cys <sub>201</sub> Cis <sub>180</sub> - Cys <sub>201</sub>	Audibert y col., 1981
Hexadecapéptido Cis <sub>186</sub> - Cys <sub>201</sub>	
Octadecapéptido Ala-Ala-Cis <sub>186</sub> - Cys <sub>201</sub> S S     ACM ACM	Audibert y col., 1982
Hemaglutinina del virus de la influenza Tir - Glu <sub>1</sub> - Cys <sub>15</sub> Tir - Glu <sub>1</sub> - Glu <sub>36</sub> Tir - Cys <sub>15</sub> - Cys <sub>33</sub> Tir - Asn <sub>39</sub> - Cys <sub>65</sub> Cis <sub>33</sub> - Leu <sub>60</sub> Tir Cis <sub>53</sub> - Cys <sub>64</sub> Tir Cis <sub>33</sub> - Leu <sub>37</sub> Tir Tir - His <sub>76</sub> - Ile <sub>83</sub> Tir - His <sub>76</sub> - Glu <sub>90</sub> His <sub>76</sub> - Ser <sub>111</sub> Ser <sub>91</sub> - Leu <sub>108</sub>	Asp <sub>105</sub> - Cys <sub>140</sub> Tir - Glu <sub>130</sub> - Arg <sub>151</sub> Tir - Trp <sub>132</sub> - Ser <sub>146</sub> Cis <sub>140</sub> - Glu <sub>147</sub> - Tir Cis <sub>140</sub> - Tir <sub>156</sub> Cis <sub>140</sub> - Ser <sub>175</sub> Asn <sub>174</sub> - Tir <sub>196</sub> - Cys His <sub>184</sub> - Tir <sub>196</sub> - Cys Tir - Glu <sub>201</sub> - Leu <sub>227</sub> Cys Cis <sub>306</sub> - Asn <sub>329</sub> Müller y col., 1982

Péptidos análogos a:	Referencia
<b>Región de fusión de la hemaglutinina del virus de la influenza</b>	
FR/D Glu <sub>1</sub> -Fen <sub>2</sub> -Glu <sub>11</sub>	
FR/A Glu <sub>1</sub> -Leu <sub>2</sub> -Glu <sub>11</sub>	Atasi y col., 1983
<b>Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B</b>	
Cis <sub>18</sub> -Ile <sub>31</sub>	Tre <sub>140</sub> -Tyr <sub>148</sub>
Leu <sub>12</sub> -Cis <sub>16</sub>	Glu <sub>2</sub> -Cis <sub>16</sub>
Leu <sub>22</sub> -Cis <sub>35</sub>	Ser <sub>31</sub> -Cis <sub>35</sub>
Ser <sub>38</sub> -Asn <sub>52</sub>	Val <sub>45</sub> -Asn <sub>52</sub>
Leu <sub>95</sub> -Leu <sub>109</sub>	Leu <sub>104</sub> -Leu <sub>109</sub>
Cis <sub>144</sub> -Trp <sub>163</sub>	Fen <sub>212</sub> -Ile <sub>226</sub>
Cis <sub>221</sub> -Ile <sub>226</sub>	
Lis <sub>122</sub> -Cis <sub>137</sub>	(C <sub>137</sub> -C <sub>124</sub> )
Ser <sub>117</sub> -Cis <sub>137</sub>	(C <sub>137</sub> -C <sub>124</sub> )
<b>Determinante a del virus de la hepatitis B</b>	
Lis <sub>122</sub> -Cis <sub>137</sub>	
Ala <sub>128</sub> -Fen <sub>134</sub>	
Cis <sub>139</sub> -Cis <sub>147</sub>	
Cis <sub>139</sub> -Fen <sub>158</sub>	Bhatnagar y col., 1982
Tre <sub>140</sub> -Fen <sub>158</sub>	
Glu <sub>145</sub> -Fen <sub>158</sub>	
Ile <sub>150</sub> -Fen <sub>158</sub>	

TABLA 3

La producción de una vacuna multivalente sintetizada químicamente que pueda reemplazar a las vacunas virales y bacterianas comunes, las que muchas veces tienen determinantes antigénicos irrelevantes, proteínas u otros materiales que contaminan el inmunógeno esencial que además puede tener efectos colaterales es uno de los propósitos más importantes.

Para el lector interesado mencionamos tres revisiones recientes sobre este asunto: Lerner, 1983; Sela, 1983 y Zuckerman, 1982.

#### SINTESIS DE DOS PEPTIDOS CORRESPONDIENTES A REGIONES DE TOXINAS DE ALACRANES MEXICANOS

Con relación a la obtención de una posible vacuna sintética en contra del veneno de alacranes peligrosos al hombre, hemos empezado el trabajo con la síntesis de un nonapéptido y un decapéptido, señalados en la tabla 2. Este trabajo, totalmente realizado en México, está en el momento en su fase inicial, pero la Tabla 4 muestra los primeros resultados. Como se observa para

péptidos pequeños (8 a 15 aminoácidos) la síntesis en fase sólida da resultados excelentes.

AMINO ACIDOS	TOXINA NTX <sub>1-9</sub>		TOXINA Cn. II-9.2.2 <sub>1-10</sub>	
	ENCONTRADO	ESPERADO	ENCONTRADO	ESPERADO
ASP	1.12	1	2.00	2
TRE	2.00	2	1.11	1
SER	1.07	1	-	-
GLU	-	-	1.08	1
GLI	-	-	1.15	1
VAL	1.02	1	0.90	1
ILE	1.52	2	-	-
LEU	-	-	1.09	1
TIR	-	-	0.67	1
LIS	1.24	1	1.90	2

TABLA 4

Los análisis de aminoácidos de la Tabla 4 se realizaron con muestras hidrolizadas por 20 horas en HCl (ver Material y Métodos), y se refieren a un análisis sencillo. El valor encontrado para el aminoácido isoleucina (1.52) en el caso del péptido NTX<sub>1-9</sub> es bajo, pero esto es lo que se debería esperar, puesto que el enlace peptídico entre dos aminoácidos hidrofóbicos como la isoleucina necesita hidrolizarse por más tiempo (48 a 90 horas) para la obtención de una mejor recuperación. Igualmente el valor relativamente bajo de tirosina (0.67) para la Cn. II-9.2.2 se puede explicar por la inestabilidad de este aminoácido en las condiciones de hidrólisis. Todos los demás valores están bastante aceptables y concuerdan suficientemente bien con lo esperado.

Cabe notar que no obstante los cuidados mencionados en Material y Métodos sobre la síntesis de los péptidos, siempre hay la posibilidad de error en la síntesis. Lo más común es encontrar un cierto porcentaje de moléculas de péptido sintetizado con falta de un aminoácido en la secuencia. Esta probabilidad de error aumenta con el número de aminoácidos. Otra forma de error es la formación de péptidos con cadenas ramificadas, debido a bloqueo ineficiente de las cadenas laterales de ciertos aminoácidos con grupos reactivos, ejemplo, el grupo epsilon-amino de las lisinas. También se pueden obtener péptidos más cortos que lo deseado, así como péptidos con errores múltiples, si bien que la probabilidad de estos últimos es más baja para péptidos más cortos. De forma general para péptidos como los que nosotros sintetizamos se puede esperar que por lo menos cerca de 50% del péptido sintético final corresponda exactamente al deseado. Sin embargo, como se trata de obtener de una manera fácil y en cantidades que se puedan escalar a varios gramos de péptidos, creemos que el intento de obtención de un antígeno sintético anti-toxina de alacrán debe ser ensayado primeramente con los péptidos tal como se obtienen del aparato que rompe con ácido fluorhídrico

a los grupos protectores. Esto es, sin preocuparse en la obtención de péptidos altamente puros. Es obvio que la posibilidad de purificación en escala semipreparativa a través de la cromatografía líquida de alta presión está considerada y será seguramente usada en el futuro.

Como las secuencias peptídicas de las toxinas son conocidas y el método de síntesis está relativamente bien desarrollado se puede en un corto espacio de tiempo sintetizar un número razonable de péptidos que permitan en una primera instancia obtener informaciones generales sobre el tipo de péptido a sintetizar y de su respuesta inmune. En una segunda etapa prevalecerá la síntesis de algunos de los péptidos, o péptidos modificados, con los cuales se podrán ensayar la purificación mencionada anteriormente y quizás obtener un producto perfectamente definido que sea utilizado con provecho en salud pública.

La información obtenida por vía química, como se acaba de describir, puede sentar los precedentes para la biosíntesis de dichos péptidos "in vivo" por microorganismos, a través de las técnicas de ingeniería genética. Este último renglón debe ser considerado solamente como una posible perspectiva futura de desarrollo.

RESUMEN

En este capítulo se presenta:

1. Una pequeña revisión sobre la composición y función de las toxinas de alacranes mexicanos.
2. Se describen la estrategia y técnicas seguidas para la obtención homogénea de dos toxinas del alacrán de Nayarit (*C. noxius*).
3. Se revisan y discuten los principios del método de síntesis de péptidos en fase sólida.
4. Se revisan datos de la literatura sobre las aplicaciones recientes de este método para la obtención de péptidos referentes a secuencias de toxinas bacterianas o proteínas virales, sus respuestas inmunes y la factibilidad del uso de dichos péptidos como vacunas.
5. Se describen las técnicas y se dan los resultados de la síntesis de un nonapéptido: Tre-Ile-Ile-Asn-Val-Lis-Cis-Tre-Ser, y un decapeptido: Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val-Asp-Lis-Asn-Tre, ambos correspondientes a toxinas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el donativo PCCBBNA-001370 concedido a L.D.P. y al Dr. Bruce W. Erickson de la Universidad Rockefeller, Nueva York (USA) por el entrenamiento de R.M.R. y A.D.Z. También se agradece al Fondo de estudios de investigaciones Ricardo J. Zevada por el donativo referencia 20/83.

REFERENCIAS

1. Atassi, M.Z. y Webster, R.G. Localization, synthesis and activity of an antigenic site on influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1983, 89:840-844.
2. Audibert, F., Jolivet, M., Chedid, L., Alouf, J.E., Bouquet, P., Rivaille, P. y Silfert, O. Active antitoxic immunization by a diphtheria toxin synthetic oligopeptide. *Nature.* 1981, 289:593-594.
3. Audibert, F., Jolivet, M., Chedid, L., Arnon, R. y Sela, M. Successful immunization

- with a totally synthetic diphtheria vaccine. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1982, 79:5042-5046.
4. Ibbin, D.R., Watt, D.D., Goss, S.M. y Mlejnek, R.V. Amino acid sequences of neurotoxic protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch Biochem Biophys.* 1974, 164:694-706.
5. Ibbin, D.R., Watt, D.D., Goss, S.M. y Mlejnek, R.V. Amino acid sequence of neurotoxin I from *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch Biochem Biophys.* 1975, 166:125-134.
6. Balozet, L. Scorpionism in the old world. En *Venomous Animals and their Venoms*, Vol. III, W. Bücherl y E.E. Buckley (Eds.). *Academic Press*, New York, 1971, p. 349-371.
7. Barany, G. y Merrifield, R.B. En *The Peptides*, Vol. 2. Ed. E. Gross y J. Melenhofer, *Academic Press*, New York, 1980, p. 1-284.
8. Beachey, E.H., Seyer, J.M., Dale, J.B., Simpson, A. y Kang, A.H. Type-specific protective immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein *Nature.* 1981, 292:457-459.
9. Bhatnagar, P.K., Pappas, E., Blum, H.E., Millich, D.R., Nitecki, D., Karels, M.J. y Vyas, G. Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1982, 79:4400-4404.
10. Bravo-Becherelle, M.A. y Mazzotti, L. Distribución geográfica de la mortalidad por picadura de alacranes en México, *Rev Inst Salubr Enfer Trop.* 1961, 21:129.
11. Cahalan, M.D. Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by *Centruroides sculpturatus* venom. *J Physiol. (Lond.)* 1975, 244:511-534.
12. Cárabez, A.T. y Possani, L.D. Electron microscopic evidence for scorpion toxin binding to synapses of rat brain cortex. *Neuroscience Lett.* 1982, 32:103-108.
13. Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. y Maelicke, A. Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature.* 1982, 296:90-91.
14. Carbone, E., Prestipino, G., Wanke, E., Possani, L.D. y Maelicke, A. Selective action of scorpion neurotoxins on the ionic currents of the squid giant axon. *Toxicol.* 1983, Suppl. 3:57-60.
15. Catterall, W. Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential Na<sup>+</sup> ionophore. *J Biol Chem.* 1976, 251:5528-5536.
16. Catterall, W. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1980, 20:15-43.
17. Colomer, V., Tapia, R. y Possani, L. Acción del veneno del alacrán *Centruroides elegans* sobre la captación de aminoácidos neurotransmisores en sinaptosomas. *XII Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*, San Luis Potosí, S.L.P. 1978, p. 46.
18. Darbon, H., Rochat, H., Kopeyan, C. y Rietschoten, J.V. Covalent structure of the insect toxin of *Androctonus australis* Hector. *Toxicol.* 1982, 20:64, Abstract.
19. Del Pozo, E.C. Los efectos musculares del veneno de escorpiones mexicanos. *Bol Inst Est Med Biol.* 1948a, 6:59-69.
20. Del Pozo, E.C. The action of the venom of a Mexican scorpion (*Centruroides noxius*, Hoffmann) on cholinesterases. *Br J Pharmacol.* 1948b, 3:219-222.
21. Del Pozo, E.C. Resemblances et différences dans les actions physiologiques des venins des scorpions. *Arch Inst Pasteur Alger.* 1949a, 27:35-38.
22. Del Pozo, E.C. Relaciones entre la actividad anticolinesterásica, las propiedades de activación muscular y la toxicidad de los venenos de diversos alacranes de México. *Rev Inst Salubr Enfer Trop.* 1949b, 10:203-213.
23. Del Pozo, E.C. y Anguiano, G. Physiological action of scorpion venom. *Fed Proc.* 1946, 5:1.
24. Del Pozo, E.C. y Anguiano, L.G. The effects of scorpion venom on striated muscles. *Abstr Commun 17th Inter Physiol Congress.* 1947, 1-2.
25. Del Pozo, E.C., Anguiano, G. y González, J. Acciones del veneno de alacrán sobre el sistema vaso-motor. *Rev Inst Salubr Enferm Trop.* 1944, 5:227-240.
26. Del Pozo, E.C., González, J. y Méndez, T.H. Acciones del veneno de alacrán sobre el aparato respiratorio. *Rev Inst Salubr Enferm Trop.* 1945, 6:77-84.
27. Dent, M.A.R., Possani, L.D., Ramirez, G.A. y Fletcher, P.L. Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicol.* 1980, 18:343-350.
28. Dimiz, C.R. Chemical and pharmacological properties of *Tityus* venoms. En *Venomous Animal and their Venoms*. Eds. Bücherl, W., Buckley, E.E. *Academic Press* 1971, Vol. III, p. 311-314.

29. Dreesman, G.R., Sánchez, Y., Ionescu-Matiu, I., Sparrow, J.T., Six, H.R., Peterson, D.L., Hollinger, F.B. y Melnick, J.L. Antibody to hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides. *Nature*. 1982, 295:158-161.
30. Edman, P. y Bugg, G. A protein sequenator. *Eur J Biochem*. 1967, 1:80-91.
31. Erickson, B.W. y Merrifield, R.B. Solid-phase peptide synthesis. En *The Proteins, Vol. II*. Editores Neurath, H. y R.L. Hill, Academic Press, Inc. Nueva York. 1976.
32. Fontecilla-Camps, J.C., Almasy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D. y Bugg, C.E. Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1980, 77:6496-6500.
33. Freire-Maia, L., Ribeiro, R.M. y Beraldo, W.T. Effects of purified scorpion toxin on respiratory movements in the rat. *Toxicol.* 1970, 8:307-310.
34. Freire-Maia, L., y Diniz, C.R. Pharmacological action of a purified scorpion toxin in the rat. *Toxicol.* 1970, 8:132.
35. Freire-Maia, L. y Ferreira, M.C. Estudo do mecanismo da hiperglicemia e da hipertensão arterial, produzidas pelo veneno de escorpião, no cão. *Mem Inst Osw Cruz* 1961, 59:11-22.
36. Garcia, G.P. Etude des neurotoxines du venin du scorpion Mexicain "*Centruroides suffusus suffusus*". Tesis doctoral presentada a la Université de Nice, Francia, Novembre, 1976, p. 1-73.
37. Gillespie, J.I. y Meves, H.J. The effect of scorpion venoms on the sodium currents of the squid giant axon. *J Physiol. (Lond)*. 1980, 308:479-499.
38. Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T.M., Stuelciff, J.G. y Lerner, R.A. Immunogenic structure of the influenza virus haemagglutinin. *Cell*. 1982, 28:477-487.
39. Grishin, E.V., Soldatova, L.N., Soldatov, N.M., Kbstetskii, P.V. y Ovchinnikov, Yu. A. Amino acid sequence of insecta toxin I-2 from the venom of the Central Asian scorpion *Buthus eupeus*. *Sov J Bioorg Chem (Engl. Transl Bioorg Khim.)* 1980, 5(9): 949-956.
40. Grishin, E.V., Soldatova, L.N., Shakhparonov, M.I. y Kazakov, V.K. 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.)* 1981, 6(5):390-398.
41. Grishin, E.V., Volkova, T.M. y Soldatova, L.N. Toxic components from the venom of caucasian USSR subspecies of scorpion *Buthus eupeus*. *Bioorg. Khim.* 1982, 8: 155-164.
42. Jaimovich, E., Ildofonse, M., Barhanin, J., Rougier, O. y Lazdunski, M. *Centruroides* toxin, a selective blocker of surface Na<sup>+</sup> channels in skeletal muscle: voltage-clamp analysis and biochemical characterization of the receptor. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1982, 79:3896-3900.
43. Jover, E., Martin-Mouton, N., Couraud, F. y Roehat, H. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins. *Biochem.* 1980, 19:463-467.
44. Kenneth, P.W., Barhanin, J. y Lazdunski, M. Specific binding of toxin II from *Centruroides suffusus* to the sodium channel in electropaque membranes. *Biochem.* 1982, 21:5628-5634.
45. Koppenhöfer, E. y Schmidt, H. Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. *Experientia (Basel)* 1968, 24:41-42.
46. Langbeheim, H., Arnon, R. y Sela, M. Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen. *Proc Nat Acad Sci. USA*. 1976, 73:4636-4640.
47. Langbeheim, H., Arnon, R. y Sela, M. Adjuvant effect of a peptidoglycan attached covalently to a synthetic antigen provoking antiphage antibodies. *Immunology*. 1978, 35:573-579.
48. Lazarovici, P., Yanai, P., Pellate, M. y Zlotkin, E. Insect toxic components from the venom of a chaetoid scorpion, *Scorpio maurus palmatus (Scorpioidea)*. *J Biol Chem*. 1982, 257:8397-8404.
49. Leach, S.J. How antigenic are antigenic peptides? *Biopolymers*. 1983, 22:425-440.
50. Lerner, R.A. Synthetic Vaccines. *Scientific American*. 1983, 248:48-56.
51. Lerner, R.A., Green, N., Alexander, H., Liu, F.T., Sutchiff, G. y Shinnick, T.M. Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1981, 78:3404-3407.
52. Liu, T.Y. y Chang, Y.H. Hydrolysis of proteins with p-toluene sulfonic acid. Determination of tryptophan. *J Biol Chem*. 1971, 246:2842-2845.
53. López-Acuña, D. y Alagón, A.C. Comunicación presentada a la sesión técnica

- de la Sociedad Mexicana de Salud Pública realizada en México, D.F., Marzo 1979.
54. Maurer, P.H., Babu, U.M. y Lai, C.H. Contribution of synthetic polymers of amino acids to knowledge of immune response. *Biopolymers*. 1983, 22:441-452.
55. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*. 1963, 85:2144-2154.
56. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis IV. The synthesis of methionyl-lysyl bradykinin. *J Org Chem*. 1964, 29:3100-3102.
57. Meves, H., Rubly, N. y Watt, D.D. Effect of toxins isolated from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus* on the Na currents of the node of Ranvier. *Pflügers Arch*. 1982, 393:56-62.
58. Miranda, F., Kopeyan, C., Roehat, C. y Lissitzky, S. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpions *Androctonus australis* Hector, *Buthus occelatus tuncianus* and *Leiurus quinquestratus quinquestratus*. *Eur J Biochem*. 1970, 16:514-523.
59. Moore, S. y Stein, W.H. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. En: *Methods in Enzymology Vol. VI*, p. 819 Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. (Eds.) Academic Press, Nueva York, 1963.
60. Monroy-Velazco, J. Alacranes venenosos de México. *Rev Mex Cienc Med Biol*. 1961, 1:1.
61. Mozes, E. The T cell receptor as analyzed by functional T-cell lines specific to a synthetic polypeptide antigen. *Biopolymers*. 1983, 22:453-464.
62. Müller, G.M., Shapiro, M. y Arnon, R. Anti-influenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1982, 79:569-573.
63. Narahashi, T., Shapiro, B.I., Degueil, T., Sucka, M. y Wang, Ch.M. Effects of scorpion venom on squid axon membranes. *Amer J Physiol*. 1972, 222:850-857.
64. Nonner, W. Effects of *Leiurus* scorpion venom on the "gating" current in myelinated nerve. *Adv Cytopharmacol*. 1979, 3:345-352.
65. Norman, R.J., Schmid, A., Lombert, A., Barhanin, J. y Lazdunski, M. Purification of binding protein for *Tityus* gamma toxin identified with the gating component of the voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1983, 80:4164-4168.
66. Okamoto, H. Binding of scorpion toxin to sodium channels *in vitro* and its modification by beta-bungarotoxin. *J Physiol*. 1980, 299:507-520.
67. Patterson, R.A. Pharmacologic action of scorpion venom on intestinal smooth muscle. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1962, 4:710-719.
68. Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, Jr. P. L. y Erickson, B.W. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch Biochem Biophys*. 1977, 180:394-403.
69. Possani, L.D., Ramirez, G.A., Fletcher, Jr. P.L. y Gurrola, M.A.H. Isolation of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides elegans* (Thorell). *FEBS Lett*. 1978, 91:261-264.
70. Possani, L.D., Fletcher, Jr. P.L., Alagón, A.B.C., Alagón, A.C. y Juliá, J.Z. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicol.* 1980, 18:175-183.
71. Possani, L.D., Dent, M.A.R., Martín, B.M., Maelicke, A. y Svendsen, I. The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res Commun*. 1981a, 46:207-214.
72. Possani, L.D., Fernández de Castro, J. y Juliá, J.Z. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Cent. noxius* Hoffmann) venom. *Toxicol.* 1981b, 19:323-329.
73. Possani, L.D., Martín, B.M., Mochca-Morales, J. y Svendsen, I. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Carlsberg Res Commun*. 1981c, 46: 195-205.
74. Possani, L.D., Steinmetz, W.E., Dent, M.A.R., Alagón, A.C. y Wüthrich, K. Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. *Biochim Biophys Acta*. 1981d, 669:183-192.
75. Possani, L.D., Martín, B.M. y Svendsen, I. The primary structure of Noxiustoxin: A K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res Commun*. 1982, 47:285-289.
76. Ramirez, G.A., Fletcher, Jr. P.L., Rode, G.S. y Possani, L.D. N-terminal sequence

- of toxin II-6.3 from the venom of the scorpion *Centruroides elegans*. Presentado durante el VII Congreso Internacional de Biofísica y III Congreso Pan-Americano de Bioquímica realizado en México, D.F. Resumen. 1981, p. 157.
77. Rathmayer, W., Ruhlmann, M., Timpulver, M., Walther, C. y Zlotkin, E. 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. 1978, p. 629-637.
  78. Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. y Williams, D.E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 1962, 195:281-283.
  79. Rochat, H., Bernard, P. y Couraud, P. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: *Advances in Cytopharmacology*, Vol. 3, B. Ceccarelli and F. Clementi (Eds.) Raven Press, New York. 1979, p. 325-334.
  80. Romey, G., Abita, J.P., Clucheportiche, R., Rochat, H. y Lazdunski, M. Scorpion neurotoxin: mode of action on neuromuscular junctions and synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* 1976, 448:607-619.
  81. Sarin, K.V., Kent, S.D.H., Tam, J.P. y Merrifield, R.B. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by ninhydrin reaction. *Anal Biochem*, 1981, 117: 147-157.
  82. Sela, M. From synthetic antigen to synthetic vaccines. *Biopolymers*. 1983, 22: 415-424.
  83. Stahnke, H.L. The genus *Centruroides* (Buthidae) and its venom. En: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1978, Vol. 48, Cap. 12, p. 277-307.
  84. Stewart, J.M., Young, J.D. Solid phase peptide synthesis. Libro editado por W.H. Freeman and Company, San Francisco. 1968, p. 1-103.
  85. Vital Brasil, O., Nader, A.C. y Corrado, A.P. Effects and mechanism of action of *Tityus serrulatus* venom on skeletal muscle. *Pharmacol Res Commun*, 1973, 5: 137-150.
  86. Wang, G.K. y Strichartz, G.R. Purification and physiological characterization of neurotoxins from venoms of the scorpions *Centruroides sculpturatus* and *Leiurus quinquestriatus*. *Molecular Pharmacol*, 1983, 23:519-533.
  87. Watt, D.D. Biochemical studies of the venom from the scorpion, *Centruroides sculpturatus*. *Toxicol*, 1964, 2:171-180.
  88. Watt, D.D., Simard, J.M., Habin, D.R. y Mlejnek, R.V. Physiological characterization of toxins isolated from scorpion venom. In: *Toxins: Animal, Plant and Microbial*, P. Rosenberg (Ed.) Pergamon Press, Oxford. 1978, p. 647-660.
  89. Zhdanova, L.N., Adamovich, T.B., Nazimov, I.V., Grishin, E.V. y Ovchinnikov, Yu.A. Amino-acid sequence of insect toxin I-1 from the venom of the Central Asian scorpion *Buthus eupeus*. *Sov J Bioorg Chem*. (Engl Transl Bioorg Khim) 1978, 3(4):366-372.
  90. Zlotkin, E., Miranda, G. y Rochat, H. Chemistry and pharmacology of *Buthinae* scorpion venoms. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 48, S. Bettini (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1978, p. 317-369.
  91. Zlotkin, E., Lester, D., Lazarovici, P. y Pellate, M. The chemistry and axonal action of two insect toxins derived from the venom of the scorpion *Buthotus judaicus*. *Toxicol*, 1982, 20:323-331.
  92. Zuckerman, A.J. Developing synthetic vaccines. *Nature*, 1982, 295:98-99.

## FARMACOCINETICA. PERSPECTIVAS Y POSIBILIDADES

Helgi Jung C.

División de Estudios de Posgrado, Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales, Facultad de Química, UNAM.

Quando un compuesto presenta una actividad farmacológica apreciable, es necesario efectuar una serie de pruebas que permitan definir más claramente su potencial para ser utilizado en la clínica. Estas pruebas incluyen investigaciones extensivas acerca de las propiedades farmacológicas y toxicológicas del compuesto; sin embargo, también los estudios de *Farmacocinética* (entendiéndose lo anterior como el estudio de la cinética de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco en humanos o en animales) y la *Biodisponibilidad* (que es un término utilizado para indicar la cantidad relativa de un fármaco que llega a la circulación general y la velocidad a la cual ésto ocurre), son de gran importancia en cada una de las fases del desarrollo de un fármaco, por lo que deberán ser considerados como parte integral de la investigación clínica, que conducirá directamente a un uso terapéutico más seguro y efectivo del fármaco.

A continuación se describen brevemente los elementos necesarios para realizar los estudios de Farmacocinética y Biodisponibilidad en cada una de las fases del desarrollo de un fármaco.

### Estudios Preclínicos.

La información que deberá obtenerse durante esta fase del desarrollo de un fármaco será:

1. Datos fisicoquímicos del fármaco
2. Metodología analítica
3. Estudios preliminares de Biodisponibilidad y Farmacocinética
4. Estudios metabólicos preliminares.

### I. Propiedades fisicoquímicas del fármaco

Para poder realizar un buen estudio farmacológico, toxicológico y farmacocinético del compuesto, se deberá obtener la siguiente información fisicoquímica: Identidad, pureza, estabilidad en estado sólido y en solución, pKa, solubilidad en agua y coeficiente en partición líquido-agua.

- Las consideraciones preliminares basadas en estos datos, ayudarán a:
- a) Normalizar las propiedades fisicoquímicas, incluyendo estabilidad
  - b) Elegir el vehículo adecuado para la administración del fármaco y función a las características de solubilidad y disociación
  - c) Estar consciente de que aquellos fármacos que presenten baja solubilidad en agua, alto grado de disociación en el rango de pH fisiológico o bajo coeficiente de partición líquido-agua, pueden presentar problemas de absorción.

### II. Desarrollo de metodología analítica

Para realizar estudios de Farmacocinética y Biodisponibilidad, es neces-