

00562  
10  
2ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



## OBTENCION, CARACTERIZACION Y USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL ESTUDIO DE ESTRUCTURA Y FUNCION DE TOXINAS DE ALACRANES

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS  
(BIOQUIMICA)  
P R E S E N T A  
**FERNANDO ZAMUDIO ZUÑIGA**  
MEXICO, D. F. 1989

**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

Una de las fracciones tóxicas del veneno del alacrán Centruroides noxius, además de ser el componente principal, llamado C.n.

II-9.2 aumenta la liberación de GABA radioactivo, de sinaptosomas de cerebro por modificación del flujo de iones sodio. De la fracción II-9.2, se purificaron a homogeneidad dos toxinas llamadas II-9.2.2 y II-9.2.3, se completó la secuencia de aminoácidos de la toxina II-9.2.2 y se determinó la secuencia N-terminal de la toxina II-9.2.3 (hasta el aa 37). Obteniendo lo siguiente: Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val-Glu-Leu-Gli-Tre-Gli-Cis-Lis-Tir-Glu-Cis-Fen-Lis-Leu-Gli-Asp-Asn-Asp-Tir-Cis-Leu-Arg-Glu-Cis-Lis-Ala-Ala-Tir-Gli-Lis-Gli-Ala. Para tratar de relacionar la estructura y la función de la toxina II-9.2.2 se han obtenido anticuerpos monoclonales en contra de la misma.

Las células de bazo de tres ratones Balb/c inmunizados con un conjugado de la toxina C.n.II-9.2.2 y tiroglobulina porcina se fusionaron con células de mieloma de la línea SP2/0-Ag14, los híbridos productores de anticuerpos contra la toxina C.n.II-9.2.2 se detectaron por ELISA y se clonaron en agar semisólido. Seis clones de híbridos independientes llamados BCF1, BCF2, BCF3, BCF7, BCF8 y BCF9 se cultivaron en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c pretratados con pristina. Los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir del líquido de ascitis por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa. Los anticuerpos pertenecen a la clase IgG1 e IgG2a.

Los anticuerpos se unen de manera dosis dependiente a placas de ELISA cubiertas con C.n.II-9.2.2. La especificidad de los anticuerpos por esta toxina se demostró por experimentos de competencia en los que se mostró que la C.n.II-9.2.2 libre puede inhibir la unión de los anticuerpos al soporte sólido cubierto con C.n.II-9.2.2.

La unión de los seis MACs a epitopes distintos o sobrepuestos de la C.n.II-9.2.2 se investigó en ELISA en sandwich probando todos los posibles pares de anticuerpos mostrando que los MACs BCF1 y BCF8 definen un epitope que no se superpone al epitope definido por los anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9.

En ensayos de neutralización in vivo todos los anticuerpos retardan la muerte del animal al inyectar la toxina preincubada con los MACs, encontrando que al menos uno (BCF2) neutraliza totalmente su acción.

Por ensayos de competencia con venenos de otros alacranes del género Centruroides se encontró que existen toxinas en estos que comparten determinantes antigénicos con la toxina C.n.II-9.2.2.

El anticuerpo BCF8, reconoce epitopes, que son compartidos por las toxinas: C.n.II-9.2.2, C.n.II-9.2.3, C.n.II-10, C.n.II-14 y la toxina 1 del veneno del alacrán Centruroides limpidus tecomanus.

## A B S T R A C T

Fraction II-9.2 from the venom of the mexican scorpion C. noxius was purified on CM-cellulose columns giving two pure toxins designated II-9.2.2 and II-9.2.3. The primary structure of component II-9.2.2 was completed by automatic Edman degradation and enzymatic cleavage with V8 protease.

The N-terminal sequence of toxin II-9.2.3 was shown to be: Lis-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Glu-Leu-Gly-Tre-Gly-Cis-Lis-Tyr-Glu-Cis-Phe-Lis-Leu-Gly-Asp-Asn-Asp-Tyr-Cis-Leu-Arg-Glu-Cis-Lys-Ala-Ala-Tyr-Gly-Lis-Gly-Ala.

Toxin II-9.2.2 is a Na channel blocker (Sitges et al., 1987). In order to correlate the structure with function of this toxin, monoclonal antibodies were prepared and characterized. Three Balb/c mice were immunized with toxin II-9.2.2 coupled to thyroglobulin. Spleen cells of the immunized mice were fused with SP2/0-Ag14 myeloma cells. Hybridoma cells producing antibodies, which recognized toxin II-9.2.2, were selected and cloned by ELISA and semi-solid agar techniques. Six independent hybridoma cell lines were obtained (BCF1 to BCF3, BCF7 to BCF9) and used to produce ascites liquid in Balb/c mice. Antibodies from the ascites fluid were purified by ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. They are immunoglobulines of the class G1 and G2a. These antibodies bind to toxin II-9.2.2 attached to the ELISA plates in a dose dependent manner; they are displaced by addition of free toxin. Additional experiments were carried out to show that monoclonal antibodies of the hybrid BCF1 and BCF8 recognized an epitope of toxin II-9.2.2 different from those of the remaining hybrids (BCF2, 3, 7 and 9). Neutralization experiments "in vivo", with all six antibodies preincubated with native toxin, show delay of toxic symptoms in mice injected with the complex (IgG.plus toxin). Only one of the antibodies (BCF2) has a fully neutralizing capacity. Competition experiments conducted with venoms from other species of scorpion of the genus Centruroides show that they contain toxins with similar antigenic determinants as that of toxin II-9.2.2.

## CONTENIDO.

### I/ Introducción.

1. Las toxinas de los alacranes.
2. Los anticuerpos monoclonales.
  - A. Hibridomas
  - B. Principios teóricos.

### II/ Material y Métodos.

1. Obtención de inmunoglobulinas de ratón.
2. Obtención de anticuerpos de conejo anti-ratón.
3. Preparación de conjugado, inmunoglobulina de conejo anti-inmunoglobulina de ratón-peroxidasa (RAM-POD).
4. Purificación de ovoalbumina.
5. Optimización del ensayo Inmuno-enzimático (ELISA).
6. Purificación del antígeno FII-9.2.2 a partir del veneno del alacrán Centruroides noxius.
7. Caracterización química del antígeno
8. Obtención de Anticuerpos Monoclonales.
9. Caracterización de anticuerpos monoclonales.
  - a. Determinación de clase de las inmunoglobulinas
  - b. Ensayos de neutralización
  - c. Determinación del título de los anticuerpos monoclonales.
10. Ensayo Inmuno-Enzimático (ELISA).
  - a. Experimentos de unión.
  - b. Ensayos de competencia.

c. ELISA en sandwich.

### III/ RESULTADOS

1. Purificación de la toxina II.9.2.2.
2. Determinación de la estructura primaria de los componentes II.9.2.2 y II.9.2.3.
3. Optimización del método inmuno-enzimático (ELISA).
4. Obtención de los anticuerpos monoclonales.
5. Caracterización de los anticuerpos monoclonales.
  - a. Determinación del título de los anticuerpos.
  - b. Determinación de la especificidad de los anticuerpos.
  
- c. Competencia entre los anticuerpos monoclonales por la unión a FII-9.2.2.
- d. Presencia de componentes en el veneno de otras especies de alacrán que dan reacción cruzada.
- e. Reacción cruzada de otras toxinas de alacrán con los anticuerpos monoclonales.
- f. Ensayos de neutralización.

### IV/ DISCUSION.

1. Aislamiento y caracterización del antígeno.
2. Obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.
3. Los anticuerpos monoclonales reconocen toxinas de otros venenos.

4. Experimentos de neutralización "in vivo" de la toxina II-9.2.2 por los anticuerpos monoclonales.

V/ CONCLUSIONES.

VI/ REFERENCIAS.

## I/ INTRODUCCION.

### 1. Las toxinas de los alacranes.

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

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., 1960, 1964). Esto estimuló el estudio de una variedad de neurotoxinas de diversos animales, entre ellos las de los alacranes.

Se han publicado diversos trabajos sobre el efecto del veneno de los alacranes sobre tejidos excitables, encontrándose que algunas toxinas actúan sobre canales iónicos dependientes de voltaje (Catterall, 1977), siendo estos polipéptidos de alrededor de 65 aminoácidos. Se han encontrado también polipéptidos más cortos (alredor de 39 aminoácidos) que actúan sobre el canal de potasio (Possani y col., 1982, Carbone y col., 1987).

Los canales de sodio catalizan el paso de iones sodio a través de la membrana plasmática en dirección dirigida por el potencial electroquímico. La permeabilidad mediada por el canal puede ser



caracterizada por dos atributos fisiológicos: apertura-cierre "gating" y selectividad, sin embargo esto no necesariamente corresponde a elementos estructurales separados.

El fenómeno de "gating" se podría resumir planteando tres estados del canal: uno no conductor o estado de reposo, otro conductor o estado abierto y un estado diferente al no conductor, que sería el estado inactivado (Hodgkin y Huxley 1952).

Se han descrito dos diferentes mecanismos de acción para las toxinas que modifican los canales de sodio: las toxinas de alacranes llamados del viejo mundo, representadas por toxinas del veneno de los alacranes Androctonus australis y Leiurus quinquestriatus, actúan afectando el mecanismo de inactivación del canal de sodio (Catterall y Ray, 1976), mientras que las toxinas de los alacranes del nuevo mundo, específicamente las del género Centruroides, afectan los procesos de apertura del canal (Cahalan, 1975, Couraud y col., 1982). En base a estas diferencias Jover Couraud y Rochat (1980) han propuesto el nombre de toxinas alfa para las primeras y toxinas beta para las últimas.

Por varios años, la estructura y función de los canales de sodio sensibles a voltaje han sido estudiados usando neurotoxinas, que se han clasificado en varios grupos de acuerdo a sus propiedades de unión y a sus propiedades farmacológicas. El primer grupo incluye a la tetrodotoxina y la saxitoxina que bloquean el flujo de sodio mediante su unión al sitio 1 del canal. Una segunda clase incluye a la batracotoxina y veratridina, que causan una activación persistente del canal por

su unión al sitio 2. Un tercer grupo consiste en neurotoxinas del veneno de alacranes de la familia Buthidae. Estos polipéptidos (toxinas alfa) inhiben o bajan la inactivación del canal por unión al sitio 3 que es dependiente de voltaje. Jover y col., (1980) han reportado que las neurotoxinas purificadas del veneno de alacranes del género Centruroides (toxinas beta) se unen a un sitio distinto al que se unen las neurotoxinas de la familia Buthidae, y que esta unión no es dependiente de voltaje; se le llamó sitio 4.

Se ha estudiado la estructura química de muchas toxinas del veneno de alacrán, encontrándose que son polipéptidos compactos, estabilizados por la presencia de 4 ó 5 puentes disulfuro (Kopeyan y col., 1974, Dent y col., 1980, Possani y col., 1982, 1984), con una región de hélice alfa y tres estructuras beta plegada, como se ha observado por los datos de difracción de rayos X (Fontecilla-Camps y col., 1980, 1988), y por estudios de dicroísmo circular (Possani y col., 1981a).

Por datos cristalográficos y por comparación de secuencias de aminoácidos, Fontecilla-Camps y col., (1982), han propuesto un modelo estructural para las toxinas de alacrán, en el cual la única región conservada está involucrada en la interacción con el canal de sodio. La región de hélice alfa (residuos 23-32) y la de beta-plegada (residuos 32-35) están incluidas en esta región conservada. Se ha demostrado qué modificaciones químicas de los aminoácidos que se encuentran en esta región inhiben la capacidad de unión de estas toxinas (Darbon y col., 1983, EL Ayeb y col., 1986).

El modelo presentado por Fontecilla-Camps para las toxinas beta, propone la presencia de sitios antigénicos en las regiones variables expuestas, mientras el sitio tóxico lo sitúa en la región conservada, inmunosilenciosa.

Es un hecho que las toxinas difieren en su mecanismo de acción, pero los sitios de unión están estructuralmente relacionados. La superficie hidrofóbica conservada puede ser importante en la unión preliminar de las toxinas a un sitio general, del cual se pueden mover a sitios específicos de unión.

Un análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de las toxinas hasta ahora conocidas, revela varias regiones de homología o de sustituciones conservativas en la estructura primaria, existiendo alta homología entre péptidos del mismo género de alacrán (Possani 1984).

La estructura primaria se alineó de acuerdo a los residuos de cisteína, introduciendo deleciones para aumentar la homología. Estas deleciones ocurren en posiciones diferentes en las toxinas alfa y beta. Las toxinas alfa se caracterizan por dos deleciones, la primera (tres residuos de aminoácidos) comienza en la posición 20, mientras la segunda (dos o tres residuos de aminoácidos) esta localizada en la posición 69. Las deleciones en la posición 46 (4-5 residuos de aminoácidos) son un rasgo común de todas las secuencias de las toxinas beta. Estas diferencias pueden ser el resultado de cambios conformacionales, los que pueden estar relacionados con la capacidad de las toxinas alfa y beta de unirse a sitios diferentes sobre el canal de sodio.

Entre las toxinas beta, se encuentra la toxina II-9.2.2,

polipéptido de 65 aminoácidos extremadamente tóxico para mamíferos, (Possani y col., 1981a), componente principal y de mayor toxicidad del veneno del alacrán Centruroides noxius Hoffmann, con una LD50=5ug/20 g de peso de ratón. Esta toxina aumenta la liberación de GABA radioactivo de sinaptosomas de cerebro de ratón por modificación del flujo de iones sodio. (Sitges y col., 1987).

Para poder caracterizar inmunquímicamente a la toxina II-9.2.2, se obtuvieron seis anticuerpos monoclonales, motivo de este trabajo.

La existencia de un determinante antigénico común en la familia de toxinas beta, permitiría el desarrollo de una seroterapia eficiente en contra de la picadura de alacranes del genero Centruroides.

## 2. Los anticuerpos monoclonales.

Hoy se conoce que la producción de anticuerpos responde a la existencia de tantas como 100 millones de estirpes diferentes de linfocitos B, cada una de las cuales posee en su membrana un receptor específico único, que sólo es capaz de reconocer una zona o determinante antigénico, de un antígeno particular. Esta concepción que se conoce como Teoría de la Selección Clonal, (Burnet, F.M. 1959) sustituyó la llamada Teoría "Instructiva" que propugnaba que el antígeno servía como "molde" para la conformación de un anticuerpo, por lo que cualquier linfocito B, podía en principio, responder ante cualquier antígeno una vez que

éste se pusiera en contacto con el organismo.

La Teoría de la Selección Clonal plantea, por tanto, que los anticuerpos producidos por una estirpe de linfocitos B han sido previamente codificados durante el proceso de ontogénesis del sistema inmune del organismo, a partir de la información asimilada durante la propia evolución de las especies y seleccionada como ventajosa.

La respuesta inmune a la mayoría de los antígenos implica cientos o miles de clones o estirpes de linfocitos, cuyos productos reconocen muchos sitios diferentes sobre la molécula del antígeno. La pequeña zona que se une específicamente al sitio de combinación del anticuerpo se conoce como determinante antigénico (cuando la estructura es conocida suele llamarse epítope) siendo el paratope la parte correspondiente específica de la inmunoglobulina. Cada clona celular reaccionará produciendo un anticuerpo específico para un determinante antigénico, por lo que en la sangre de un animal inmunizado existirá una mezcla de anticuerpos, que conformarán un antisuero policlonal.

Empleando adsorciones apropiadas e inmunizaciones alogénicas uno puede reducir la heterogeneidad de los antisueros; ~~empero~~, aún bajo estas condiciones los antisueros obtenidos tendrán cuatro desventajas principales:

1. los títulos serán bajos.
2. los anticuerpos, aún siendo específicos para un único determinante, serán heterogéneos.
3. el suplemento de suero será limitado y variable aún en un mismo animal.

4. será imposible reproducir la misma combinación de anticuerpos específicos en otro animal.

Por tales razones los antisueros policlonales convencionales no son en muchos casos lo suficientemente sensibles o específicos para los ensayos que se requieren.

A pesar de esto, se ha trabajado durante años sobre la base de los resultados de las reacciones antígeno-anticuerpo empleando antisueros convencionales. Estos han sido empleados para identificar, purificar y detectar un amplio espectro de moléculas, que incluyen enzimas, hormonas y drogas; han servido como marcadores para diferentes tipos celulares.

El reactivo ideal sería la preparación estable y reproducible de anticuerpos uniformes, con especificidad, afinidad y clase conocidas. Esta preparación tendría que ser elaborada, por tanto, a partir de las moléculas producidas por sólo una célula B: un anticuerpo monoclonal.

La posibilidad práctica de lograr esta idea se encontró, hace algunos años cuando George Kohler y Cesar Milstein (1975) inmortalizaron linfocitos B de ratón productores de anticuerpos específicos, mediante su hibridación con un mieloma en cultivo.

El "hibridoma" formado por la fusión de ambas células hereda del linfocito B progenitor la capacidad de producir un anticuerpo específico y de la célula de mieloma el crecimiento indefinido en condiciones de cultivo así como la posibilidad de originar tumores si se inyecta en el animal de origen, lográndose así una alta secreción de inmunoglobulinas. Haciendo una detección adecuada de los sobrenadantes de tales cultivos de hibridoma y

clonando las células que producen el anticuerpo de interés, es posible generar líneas continuas de cultivo que producen anticuerpos homogéneos, (Kohler, G. 1981, Goding, J. 1983).

En la actualidad se emplean en esta técnica mielomas mutantes para la secreción de inmunoglobulinas propias, lo que hace que el hibridoma resultante produzca exclusivamente aquel anticuerpo comandado por el linfocito B normal y no mezclas de inmunoglobulinas normales y tumorales (Kohler, G. 1981, Goding J. 1983).

#### A. Hibridomas.

La generación de hibridomas murinos productores de anticuerpos monoclonales consta de una serie de etapas que van desde la selección del animal donante de los linfocitos B paternos así como del esquema para lograr su inmunización, hasta la adecuada conservación de los híbridos seleccionados según el sistema de detección empleado.

El antígeno utilizado para realizar la inmunización inicial no necesita ser puro, únicamente ser capaz de despertar la respuesta inmune y que exista un sistema de detección que permita seleccionar las clonas productoras del anticuerpo deseado.

El procedimiento para llevar a cabo una fusión típica, y que fue el utilizado en este trabajo, se podría resumir de la siguiente manera: Primero se inoculan ratones con el antígeno correspondiente y unos días después de la última inyección se le extrae el bazo (las células linfoides en etapa de blastos).

Posteriormente una suspensión de los linfocitos del bazo se fusionan con las células de mieloma (fase logarítmica de crecimiento), agregando polietilenglicol (PEG) como fusógeno, y ciertas drogas que se usan para asegurar que las células que crezcan sean únicamente los híbridos producidos entre las células del bazo y las células tumorales. Después de 10 a 20 días de crecimiento, se analizan los sobrenadantes de cultivo, para detectar la presencia del anticuerpo deseado, y las clonas así seleccionadas son cultivadas en masa y posteriormente se inyectan en ratones para la producción de líquido de ascitis del cual se obtendrán los anticuerpos en cantidades del orden de miligramos o gramos, (Hoogenrad, N., y col., 1983).

#### B. Principios teóricos.

Si se fusionan células tumorales con células normales, las células que crecerán rápidamente serán las células tumorales no fusionadas. Por lo tanto, se necesita asegurar de alguna forma que las únicas células que crecerán sean las células híbridas. Hasta ahora la estrategia más utilizada es la trazada por Littfield en (1964) y se basa en el uso de un medio de cultivo, que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT).

Las principales rutas biosintéticas de purinas y pirimidinas pueden ser bloqueadas por la aminopterina, antagonista del ácido fólico, que bloquea a la enzima deshidrofolato reductasa. Sin embargo, la célula aun puede sintetizar ADN por medio de la vía llamada "ruta de salvamento", en la cual los nucleótidos



preformados son reciclados. Así la hipoxantina y timidina del medio de cultivo pueden ser utilizadas para la síntesis de las bases nitrogenadas, requiriéndose para esto las enzimas timidina cinasa (TK) e hipoxantinfosforribosil transferasa (HPRT). Por lo tanto, si a la célula se le administra, como ya se mencionó, timidina e hipoxantina, la síntesis de ADN se lleva a cabo siempre y cuando las enzimas TK y HPRT estén presentes.

Si no existe alguna de estas enzimas, la síntesis de ADN se suspende. Sin embargo, la célula puede ser rescatada por fusión con otra célula, la cual suple a la enzima faltante. De esta manera si las células de bazo (las cuales poseen TK y HPRT, pero mueren en cultivo) se fusionan con células de mieloma carentes de TK y HPRT, únicamente las células híbridas crecerán en el medio conteniendo hipoxantina, aminopterina y timidina.

## II/MATERIAL Y METODOS

### 1.- Obtención de inmunoglobulinas de ratón (Garvey, J.S. y col. 1977).

Se sangraron 100 ratones de la cepa Balb/c de aproximadamente 30 gramos cada uno para obtener el suero correspondiente por centrifugación. Las inmunoglobulinas se precipitaron con sulfato de amonio a 35% de saturación. Se centrifugó a 10000 g y la pastilla obtenida se resuspendió en la mínima cantidad de amortiguador TRIS-HCl 25 mM, NaCl 80 mM, pH 7.95. Se dializó con 4 cambios de 600 ml del amortiguador anterior y despues de la diálisis se centrifugó a 10000 g, eliminando el precipitado obtenido. El sobrenadante se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (30 cm de largo x 1 cm de diametro interno) utilizando como eluyente amortiguador TRIS-HCl 25 mM, NaCl 80mM pH 7.95.

### 2.-Obtención de anticuerpos conejo anti-ratón (Garvey, J.S. y col. 1977).

Se utilizaron 2 conejos adultos de raza Nueva Zelanda, hembras y de aproximadamente 2.5 Kg de peso. Se inculó a cada conejo 500 ug de inmunoglobulina de ratón purificada, emulsificada con 1 ml de adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit Michigan USA) por via subcutánea en diversos sitios. Un mes después se inocularon 250 ug de inmunoglobulina en el mismo adyuvante y por la misma via. Se dejó descansar 3 meses y finalmente se aplicó una última inoculación de 250 ug de

inmunoglobulina. Se verificó la presencia de anticuerpos en contra de inmunoglobulina de ratón por doble difusión.

Posteriormente se sangran los conejos semanalmente durante un mes para la obtención de suero.

El suero de conejo se ultracentrifugó por 30 minutos a 50000 g para eliminar lípidos; la precipitación se realizó a 4 C agregando 6.7 ml de una solución saturada a 4 C de sulfato de amonio a 13.4 ml de suero. Se dejó en agitación durante media hora y en reposo durante toda la noche. Se centrifugó a 1500 g durante 25 minutos y el precipitado se resuspendió en 10 ml de amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.8, más 0.15 M de NaCl y se volvió a precipitar con 5 ml de sulfato de amonio saturado. Esta operación se repitió una vez más. Se centrifugó a 1500 g 25 minutos y el precipitado se resuspendió en 5 ml de amortiguador TRIS-HCl 20 mM, NaCl 20mM pH 7.8 y se dializó contra el mismo amortiguador con 2 cambios de 800 ml.

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (Stanworth, 1960).

### 3.- Preparación del conjugado, Inmunoglobulina de conejo anti inmunoglobulina de ratón-peroxidasa (RAM-POD) (Nakane, P. (1979)).

La técnica consiste en lo siguiente: Se disuelven 5.0 mg de peroxidasa en 1 ml de amortiguador de carbonato de sodio 0.3 M, pH 8.1, recién preparado, y se añaden 100 ul de una solución al 1% de dinitrofluorobenceno en etanol absoluto. Se deja agitando

suavemente durante una hora en la oscuridad y se anade 1 ml de una solución de periodato de sodio 0.08 M, se mezcla suavemente por 30 minutos y se agrega 1 ml de etilenglicol 0.16 M dejando una hora en agitación suave y en oscuridad. Se dializa contra 1 litro de amortiguador de carbonato 0.01 M pH 9.5 por tres veces. Se anaden 7.5 mg del anticuerpo de conejo purificado y se deja en agitación suave durante 3 horas. Se dializa contra un amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.5 y se diluye a 200 ug/ml en PBS pH 7.8 y albúmina sérica bovina (BSA) al 1%. Se guarda en oscuridad a -20 C.

#### 4.- Purificación de ovoalbumina (Alexander, P. y col. 1966).

Se recogen las claras de 10 huevos, se mide el volumen y se agrega el mismo de una solución de sulfato de sodio saturada a 32 C. Se deja agitando por 2 horas, se elimina el precipitado por centrifugación y se agrega una solución de ácido sulfúrico 0.2 N gota a gota hasta alcanzar un pH de 4.6 a 4.8. Posteriormente se agrega sulfato de sodio en polvo lentamente y con agitación hasta la aparición de una opalescencia permanente y se deja una noche a temperatura ambiente. Se centrifuga a 830 g y el precipitado se disuelve en un volumen de agua igual al volumen original de las claras y se llevan a cabo 3 recristalizaciones con sulfato de sodio, requiriéndose aproximadamente de 140 a 180 g de sal por litro de solución. Se dializa contra agua destilada y se liofiliza.

### 5.- Optimización del ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Se probaron 5 diferentes concentraciones de toxina en cuatro diferentes amortiguadores. Las concentraciones utilizadas fueron 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 y 10 ug/ml en los siguientes amortiguadores: bicarbonato de sodio 20 mM, pH 9.2; PBS pH, 7.8; acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 y glicina-HCl 20 mM, pH 2.5.

La solución de lavado utilizada está constituida por PBS, pH 7.8 conteniendo Tween 20 al 0.05%. La solución para diluir es PBS, pH 7.8, 10% suero de caballo, 1% albumina sérica bovina, y Tween 20 al 0.05%.

La solución de saturación es PBS, pH 7.8, 1% ovoalbumina y como sustrato se utilizó, ortofenilendiamina 0.4 mg/ml, hidropéroxido de urea 0.2 mg/ml, disueltos en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 5.

Se colocó 100 ul de una solución de toxina II-9.2.2 en cada una de las muestras a las concentraciones indicadas anteriormente en los diferentes amortiguadores en cada uno de los pozos de una placa de poliestireno de 96 pozos (Costar) y se deja toda la noche a 4 C. Se eliminó esta solución y se lavó con la solución de lavado una vez. Enseguida se colocó en cada pozo 150 ul de la solución de saturación y se dejó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se lavó en 5 ocasiones con la solución de lavado y se agregó 100 ul de la muestra con el anticuerpo y se dejó durante toda la noche a 4 C. Se lavó 5 veces y se colocaron 100 ul de la dilución adecuada del conjugado (RAM-POD) y se dejó incubando por

4 horas a temperatura ambiente y en la obscuridad. Se lavó 5 veces y se agregaron 100 ul de sustrato dejandose reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en la obscuridad. Al al término, se añadieron 100 ul de HCl 6N para parar la reacción y se leyó la absorbencia a 490 nm en un espectrofotómetro para microelisa.

6.- Purificación del antígeno FII-9.2. a partir del veneno del alacrán Centruroides noxius.

El veneno obtenido por estimulación eléctrica del telson del alacrán es resuspendido en agua y centrifugado a 10000 g durante 15 minutos para eliminar restos celulares y material mucoso. El veneno soluble es generalmente liofilizado y guardado a -20 C hasta su uso. El esquema de purificación utilizado fue originalmente descrito por Possani y col. 1981, y consiste brevemente en los siguientes pasos: Una solución conteniendo 0.5 g de veneno es colocada en una columna de Sephadex G-50 de 2.9 x 170 cm equilibrada con acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 y es eluida con el mismo amortiguador a un flujo de 50 ml/hr. En esta cromatografía se obtienen tres fracciones principales de las cuales la fracción I y III no son tóxicas en ratones hasta una concentración de aproximadamente 120 ug por 20 g de peso inyectado intraperitonealmente. La fracción II constituye el 63 % del veneno recuperado y resulta letal en ratones. Esta fracción es posteriormente separada en una columna de carboximetilcelulosa (CM-32, Whatman) en presencia del mismo amortiguador de acetato

de amonio 20 mM pH 4.7.

De la separación en esta resina se obtienen por lo menos 14 fracciones diferentes de las cuales 8 resultan ser tóxicas en mamíferos, (Possani y col., 1981). Usualmente una tercera etapa cromatografica es necesaria para obtener las toxinas en forma homogénea. De manera arbitraria se nombraron las toxinas de acuerdo a su patrón de elución. Por ejemplo la fracción II-9, que es el principal componente tóxico se recromatografió en una columna de carboximetilcelulosa, en presencia de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, obteniéndose así la fracción II-9.2.

#### 7.- Caracterización química del antígeno.

La secuencia amino terminal de la toxina pura se determinó por medio de la degradación automática de Edman (Edman y col. 1967) en un microsecuenciador Beckman 890 M. La reducción, alquilación y digestión enzimática de la toxina y subsecuentemente la separación de los péptidos resultantes, por medio de cromatografía líquida de alta presión, se llevó a cabo por técnicas descritas para otras toxinas (Possani y col. 1985).

#### 8.- Obtención de los anticuerpos monoclonales.

a) Esquema general de trabajo: Utilizamos la técnica descrita originalmente por Franssen y col., (1981), con algunas modificaciones, como se describen mas adelante.

Para poder inmunizar a los animales con el antígeno (FII-9.2,)

es necesario conjugarlo a una proteína acarreadora para aumentar su inmunogenicidad. Se utilizó el método de acoplamiento mediante el uso de carbodiimida (Goodfriend y col., 1964).

Una vez obtenido el conjugado se inmunizaron a los ratones de acuerdo a un esquema de inmunización que nos permitió una respuesta inmune óptima (ver más adelante). Paralelamente se montó la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos anti-toxina (ver inciso No. 5).

Habiendo obtenido una buena respuesta por parte de los animales inmunizados se procedió a realizar la fusión celular entre las células de bazo de estos animales y las células de mieloma para la obtención de los hibridomas productores. Estos se sometieron a una clonación con el fin de separar las clonas productoras de las no productoras. Una vez obtenidas las clonas se procedió a la producción de anticuerpos in vitro e in vivo, por inoculación en ratones. Del líquido de ascitis obtenido se purificaron los anticuerpos monoclonales por medio de cromatografía de intercambio iónico.

b) Acoplamiento de la toxina II-9.2 a tiroglobulina

Se disolvieron 10 mg de tiroglobulina y 20 mg de toxina en 0.5 ml de agua. A esta mezcla se le agregó 150 mg de carbodiimida recién disuelta en 0.25 ml de agua. La reacción se terminó por diálisis contra agua por 24 horas (un solo cambio de 1 litro de agua).

c) Esquema de inmunización.

Se usaron ratones hembras de la cepa Balb/c de aproximadamente 6



semanas de edad, criados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El esquema de inmunización utilizado se puede apreciar en la tabla No. 1.

d) Medio de cultivo:

El medio de cultivo utilizado en este trabajo fue el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), el cual se prepara de acuerdo a las instrucciones del distribuidor, disolviendo en agua recién destilada, ajustando la concentración de glucosa a 4.5 g/l y de bicarbonato de sodio a 3.7 g/l y ajustando el pH a 7 con CO<sub>2</sub>.

Se esterilizan en doble filtro Millipore de 0.22µm, bajo presión positiva de nitrógeno y se guardan en alícuotas de 100 y 500 ml a 4 C en la oscuridad. Al momento de usarlo se suplementa de acuerdo a las necesidades, según Franssen y col. 1981

e) Congelación de células:

Las células de 5 ml de medio con crecimiento óptimo se centrifugan y resuspenden en 1 ml de medio DMEM completo al que se añade 5% de suero fetal bovino y 10% de dimetil sulfoxido a 4 C. Se colocan en un criotubo en una caja de poliestireno con paredes de 1 cm de espesor, la cual se guarda a -80 C por 24 horas y posteriormente, los criotubos se transfieren a un tanque de nitrógeno líquido. Las células en estas condiciones se mantienen por tiempo indefinido.

f) Aislamiento de macrófagos.

Antes de sacrificar al ratón es necesario tener preparada una jeringa con 5 ml de sacarosa 0.34 M estéril a 4 C; dar un baño de alcohol al ratón después de matarlo para poderlo introducir dentro de la campana de flujo laminar, inyectarlo intraperitonealmente con la solución de sacarosa y dar masaje. Puncionar la cavidad peritoneal con una aguja No. 18, recuperar el fluido con los macrófagos en un tubo estéril y colocarlos en hielo. Centrifugar a 500 g por 10 minutos y resuspender en el medio adecuado. Si se recuperan los 5 ml originales se obtienen aproximadamente 2 millones de células por ratón. Si se utilizan placas de 96 pozos se siembran 5000 células por cada 100 ul.

g) Aislamiento de células de bazo.

Para la obtención de las células de bazo se sacrifica al ratón siguiendo el procedimiento descrito en el inciso (f) y se extrae el bazo, se coloca en una caja Petri conteniendo medio RPMI y por perfusión se obtienen las células. Se colocan en un tubo y se dejan reposar para aislar partículas grandes de tejido. Se pasa el sobrenadante a otro tubo y se centrifuga a 500 g por 10 minutos. Se lava 3 veces con el mismo medio. Se cuenta la viabilidad de las células por tinción con azul de tripano (Sigma) y en base a esto, se mezcla la cantidad adecuada en un tubo con las células de mieloma.

TABLA No. 1: ESQUEMA DE INMUNIZACION.

Immunización	ug de conjugado	Adjuvante	Vía de administración
1	200	completo	subcutánea
2	200	completo	subcutánea
3	200	completo	subcutánea
4 (día -7)	1	---	intraperitoneal
*5 (día -4)	50 100 200	---	intraperitoneal
*6 (día -3)	50 100 200	---	intravenoso

Entre la inmunización 1 y 2 hubo un intervalo de 2 semanas, entre la 2 y la 3, hubo un intervalo de 3 semanas, entre la 3 y la 4 hubo un intervalo de 2 meses.

\*Por contar solo con tres ratones, se aplicaron diferentes dosis, para evitar que murieran todos en caso de no soportar la dosis mas alta de toxina por vía intravenosa. Entre paréntesis se indican los días antes de la fusión.

## h) Fusión celular.

La fusión se realizó utilizando células de mieloma de la línea SP2/OAg-14 (Fransen y col. 1981) no productora de inmunoglobulinas, y células de bazo de ratones sensibilizados a la toxina II-9.2. Se utilizaron los bazos de 3 ratones Balb/c y como agente fusionante polietilenglicol de peso molecular 3,350 (Sigma).

La relación que se utilizó de células de mieloma:células de bazo para llevar a cabo la fusión fue de 1:4.

Bazo de ratón 1: se obtuvieron 456 millones de células

Bazo de ratón 2: se obtuvieron 315 millones de células

Bazo de ratón 3: se obtuvieron 437 millones de células

El volúmen final de cada lote fue de 10 ml.

De las células de mieloma se obtuvieron 2 lotes:

Lote 1: 40 millones de células

Lote 2: 33.5 millones de células

Ambos lotes en un volúmen final de 10 ml.

A partir de los datos anteriores se prepararon 6 tubos conteniendo 30 millones de células de bazo más 7.5 millones de células de mieloma. Se centrifugó a 500 g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de una solución de polietilenglicol al 50%. El contenido fue agitado con una varilla de vidrio durante 90 segundos y se adicionó 0.5 ml de medio de cultivo. Se agitó por 90 segundos más, se añadieron sucesivamente volúmenes dobles de medio de cultivo con intervalos de 90 segundos hasta completar un total de 8 ml. Se centrifugó a 500 g por 10 minutos retirando el

sobrenadante. Las células fueron diluidas en 5 ml de medio completo e incubadas por 2 horas, mezclando con suavidad en forma periódica. Se centrifugó eliminando el sobrenadante. El precipitado fué diluido en 20 ml de medio HAT y se aplicó a placas de poliestireno de 96 pozos que contenían 100  $\mu$ l de mezcla de macrófagos (como células alimentadoras) obtenidos un día antes. Se incubó a 37 C y atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

En los días 5, 6 y 7 posteriores a la fusión se reemplazó la mitad del medio por medio de cultivo fresco, con el fin de eliminar por dilución los posibles anticuerpos producidos por linfocitos B no fusionados, que aún sobrevivieran.

El crecimiento celular a partir de este momento se revisó todos los días hasta observar un crecimiento adecuado, momento en el cual se practicó el método de ELISA a los sobrenadantes de todos los pozos para determinar en que pozos había producción de anticuerpos anti-toxina II-9.2. Posteriormente se fueron expandiendo únicamente las células correspondientes a los pozos positivos, primero en placas de 24 pozos y finalmente en botellas de 5 ml. En el momento que se cambiaba el medio de cultivo se practicaba la detección de anticuerpos en el sobrenadante con el objeto de confirmar que estas células continuaban produciendo el anticuerpo. Después de congelar una alícuota de estas células se procedió a realizar la clonación en medio semisólido.

1) Clonación de los hibridomas en medio semisólido y detección de Inmunoglobulinas.

La preparación del medio de cultivo para la clonación se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Hérion y col. (1981).

El medio de cultivo para clonación es mantenido a 45 C 30 minutos antes de usarse.

Se colocan 10 ml del medio de cultivo para clonación en c/u de 24 cajas Petri y se dejan solidificar en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Se colocan 2 ml de medio HT en c/u de 24 tubos y se adiciona a uno de ellos 200 ul de la suspensión de hibridomas a clonar. Se homogeniza en vortex y se toma una alícuota de 200 ul que se aplican en otro de los tubos con medio (dilución 1:10). Esta operación se repite 2 veces más.

Una vez solidificado el medio de las cajas Petri se agrega 4 ml del medio para clonación a cada uno de los 24 tubos y se vacian en la caja correspondiente, previamente etiquetada. Se deja solidificar a 36 C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Una vez que las clonas pueden ser observadas a simple vista (aproximadamente 15 días después de sembradas) se procede a detectar las clonas productoras de inmunoglobulinas de ratón, cubriendo el agar con una tercera capa, donde se encuentra disuelto un anticuerpo de conejo anti-ratón.

En 24 horas las clonas productoras presentaron un halo de precipitación alrededor de la misma.

El suero de conejo anti-ratón se inactiva a 56 C por 30 minutos, se titula y se diluye en un volúmen equivalente al que se pone de suero de caballo en el medio de cultivo.

j) Producción de líquido de ascitis.

Las clonas productoras que presentan un halo de precipitación y que se aprecian aisladas, se recuperan con una pipeta Pasteur y se siembran en una caja de poliestireno de 96 pozos. El cultivo se expande hasta un crecimiento aproximado de 400,000 células/ml. Posteriormente se centrifuga y lava con medio DMEM, resuspendiéndose en el mismo medio a una concentración aproximada de 10 millones de células/ml. Se inoculan 200 ul de ésta suspensión, intraperitonealmente, a ratones histocompatibles (Balb/c) e inyectados 15 días antes con Pristán (2,6,10,14 tetrametil pentadecano, Sigma).

Cuando los ratones presentan los síntomas del tumor se cosecha el líquido de ascitis por punción en el abdomen. El líquido se deja una hora a temperatura ambiente hasta formar el coágulo de fibrina y se centrifuga a 830xg por 10 minutos en una centrifuga Beckman J21. Esta operación se repitió cada tercer día hasta la muerte del animal.

k) Caracterización de los líquidos de ascitis por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los líquidos de ascitis se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, preparados y aplicados de acuerdo a la técnica descrita por Reisner y col. (1975). Para esto, la muestra se prepara de la siguiente manera:

El líquido de ascitis se diluyó (1:4) en la solución de muestra (amortiguador de tris-HCl pH 8.9, glicerol 1.0% y azul de bromofenol 0.01 %) 4 ul de líquido de ascitis + 16 ul de solución

de muestra) y se aplicó 15  $\mu$ l al gel de poliacrilamida. Se corrió a voltaje constante de 200 V hasta que el colorante alcanzó la parte inferior del gel. Finalmente el gel se tiñó durante 3 horas con azul de Coomassie G-250 y se destiñó con ácido acético al 10%.

1) Purificación de los anticuerpos monoclonales a partir de líquido de ascitis.

Se juntaron las alícuotas de líquido de ascitis de cada clona obtenidas a partir de 3 ratones y se ultracentrifugó a 50000 g durante 60 minutos, con el objeto de eliminar los lípidos. Se diluyó la muestra 1:4 en PBS pH 7.8, precipitando con un volumen igual de solución saturada a 4 C de sulfato de amonio, se dejó reposar durante 1 hora en refrigeración y se centrifugó a 12500 g por 15 minutos, eliminando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 3 ml de amortiguador de Tris 20 mM, NaCl 40mM pH 7.8 y se dializó durante 3 horas contra 100 veces su volumen. Se hizo un cambio y se dejó toda la noche a 4 C. Después de la dialisis se centrifugó a 12500xg por 15 minutos y se leyó la absorbencia a 280 nm.

La purificación de las inmunoglobulinas se hizo por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa. (Whatman).



### 9) Caracterización de los anticuerpos monoclonales.

a) Determinación de la clase de inmunoglobulinas por la técnica de Ouchterlony (Weir, D.M., 1978).

#### b) Ensayos de neutralización.

Se determinó en primer término la dosis letal media (DL50) de la toxina II-9.2, inyectando por vía intraperitoneal, por cada 20 g de peso de ratón de la cepa CD1, las siguientes cantidades de toxina: 6.88 ug, 3.44 ug, 1.72 ug, 0.86 ug, 0.5 ug, 0.43 ug, 0.3 ug y 0.25 ug. (Se utilizaron 5 ratones por dosis). A las 24 horas de inyectados se graficó el porcentaje de ratones muertos en función del logaritmo de la concentración de toxina y el punto obtenido al 50% se definió como la LD50. Finalmente se probó cada uno de los anticuerpos monoclonales purificados en presencia de la toxina, en relación molar: 2:1, 1:1, 1:10 y 1:100 (toxina:anticuerpo), tomando como base la DL50 de la toxina, 0.4 ug/20 g de peso (0.057 nmoles).

Previo a la inyección la mezcla toxina-anticuerpo se incubó durante 1 hora a 37 C, inoculando un volúmen no mayor de 200 ul a cada ratón, por vía intraperitoneal, utilizando lotes de 5 ratones para cada ensayo. Los controles fueron animales inyectados con anticuerpo puro, toxina pura y con una mezcla de toxina-anticuerpo monoclonal inespecífico.

c) Determinación del título de los anticuerpos monoclonales.

Para la determinación del título de los diferentes anticuerpos monoclonales se utilizó el método de Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA), pegando una cantidad constante de toxina FII-9.2.2 a la fase sólida y haciendo reaccionar cantidades crecientes de anticuerpo, utilizando las siguientes concentraciones en ug/ml (0.0, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 100, 300). El título se tomó como la cantidad de anticuerpo que reacciona produciendo la mitad de la absorbencia máxima.

10) Ensayo Inmuno Enzimático (ELISA).

a) Experimentos de unión.

Se utilizaron placas de polivinilo de 96 pozos a las cuales se les pegó la toxina FII-9.2.2 por incubación a 4 C durante toda la noche (100 ul de una solución de 3 mg/l en bicarbonato de sodio 20 mM pH 9.2). Después de saturar con ovoalbumina (1% en PBS, 2 hrs. a temperatura ambiente) a los sitios en que no se pegó la toxina, se agregaron los anticuerpos (diluidos en PBS pH 7.8, Tween 20 0.05%, suero de caballo 10%, albumina sérica bovina 1%) y se incubó toda la noche a 4 C. La unión de los anticuerpos se reveló utilizando un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa (RAM-POD, dejando en incubación 4 horas a temperatura ambiente y luego agregando un sustrato cromogénico, ortofenilendiamina 0.4 mg/ml e hidróperóxido de urea 0.2 mg/ml en buffer de fosfatos 0.1 M pH 5.0.

b) Ensayos de competencia.

Se prepararon placas cubiertas con toxina FII-9.2.2, de la misma forma antes mencionada. Los pozos se llenaron con 50 ul de una dilución del péptido inhibidor, o de veneno total y 50 ul de una dilución del anticuerpo monoclonal correspondiente. Después de dejar la mezcla en incubación toda la noche a 4 C, los anticuerpos que se pegaron a la placa se revelaron como ya se describió previamente.

c) ELISA en sandwich.

Los anticuerpos monoclonales purificados se marcaron con peroxidasa de rábano picante de acuerdo a Nakane, P. (1979). Por otro lado se pegó a placas de ELISA por incubación a 4 C toda la noche el anticuerpo monoclonal purificado correspondiente (4 mg/l en PBS).

Después de saturar los sitios libres de la placa con ovoalbúmina, se agregó la toxina FII-9.2.2 (6 ug/ml en PBS pH 7.8, tween 20 0.05%, suero de caballo 10%, albumina sérica bovina 1%) y se dejó incubando toda la noche a 4 C. El exceso de toxina se eliminó por lavado y se adicionó el anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa (8 mg/l en PBS pH 7.8, Tween 20 0.05%, suero de caballo 10%, albúmina sérica bovina 1%). Después de incubar durante 4 horas a temperatura ambiente, los anticuerpos pegados a la placa fueron revelados usando el substrato cromógeno.

## III/ RESULTADOS.

## 1.- Purificación de la toxina II-9.2.2.

En la figura 1 se muestran los pasos cromatograficos seguidos para la purificación de la toxina II-9.2.2 a partir del veneno del alacrán C. noxius. Las dos primeras separaciones, Sephadex G-50 y CM-Celulosa a pH 4.7 han sido ya reportadas por Possani y col.(1981). Los pasos siguientes de purificación representan modificaciones de la técnica original. El componente II-9 obtenido de la segunda cromatografía, se pasó por una columna de CM-Celulosa a pH 6, obteniéndose el componente II-9.2. Posteriormente, este componente se pasó por la misma columna anterior, pero ahora a pH 8, obteniéndose el componente II-9.2.2 y un componente adicional que se le llamó II-9.2.3, ambos tóxicos para mamíferos. La fracción II-9.2.2 se pasó a través de una columna de fase reversa C18 en un cromatografo líquido de alta presión (HPLC), obteniéndose de esta forma el componente homogéneo (fig.2).

2.- Determinación de la estructura primaria de los componentes II-9.2.2 y II-9.2.3. A la fracción principal, en cantidad (fig.2), (tóxico para mamíferos), se le determinó su composición de aminoácidos de acuerdo al método descrito por Henrikson y col.(1984) y Bidlingmeyer y col.(1984). Además se comprobó la secuencia de aminoácidos amino terminal, que correspondió a la ya reportada con anterioridad (Possani y col. 1981a). Con el objeto de determinar también la secuencia de la región carboxilo

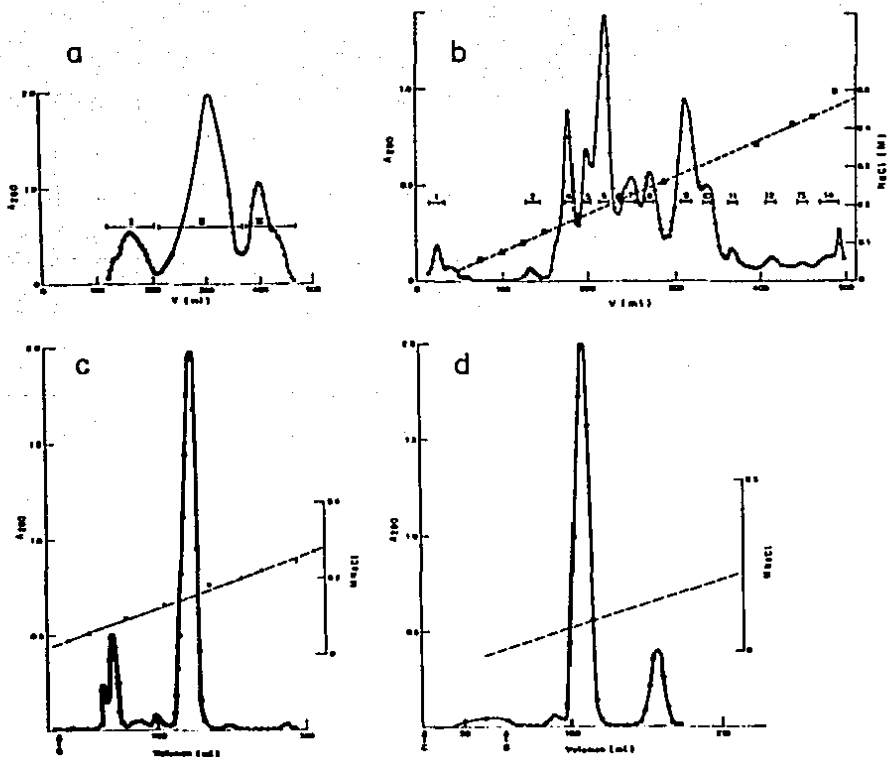


Figura 1: Purificación de las toxinas C.n.II-7.2.2 y C.n.II-9.2.3

a) El veneno soluble se aplicó a una columna de Sephadex G-50 (0.9 x 200 cm) equilibrada y corrida con amortiguador de acetato de sodio 20 mM pH 4.7, a un flujo de 25 ml/h. Se colectaron fracciones de 2.5 ml por tubo. Se obtuvieron tres fracciones, las que se colectaron como lo indican las barras horizontales. Sólo la fracción II es tóxica para *asaíferos*. b) La fracción II se aplicó a una columna de CM-celulosa (0.9x35 cm) equilibrada con amortiguador de acetato de sodio 20 mM pH 4.7, a un flujo de 30 ml/h. Se eluyó con un gradiente salino en el mismo amortiguador de 0.0-0.4 M de Na Cl, colectándose fracciones de 2.5 ml. Se obtuvieron 14 fracciones, de las cuales de la 8 a la 14 son tóxicas para *asaíferos*. c) La fracción II-9 (58 mg) se aplicó a una columna de CM-celulosa (0.9x35 cm) equilibrada con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.0, a un flujo de 30 ml/h. Se eluyó con un gradiente lineal de Na Cl (0.0-0.38 M), 250 ml c/u en el amortiguador de equilibrio. Se colectaron fracciones de 2.5 ml por tubo. La toxina II-9.2 corresponde al 80%. d) Un total de 47 mg de la fracción II-9.2 se aplicó a una columna de CM-celulosa (0.9x35 cm) equilibrada con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.0 y eluido con un gradiente salino de 0.0-0.3 M de Na Cl a un flujo de 30 ml/h. Se colectaron fracciones de 2.5 ml. El componente II-9.2.2 corresponde al 74% y el componente II-9.2.3 al 24%.

C1: corresponde al cargado de la muestra

S1: corresponde al inicio del gradiente salino.

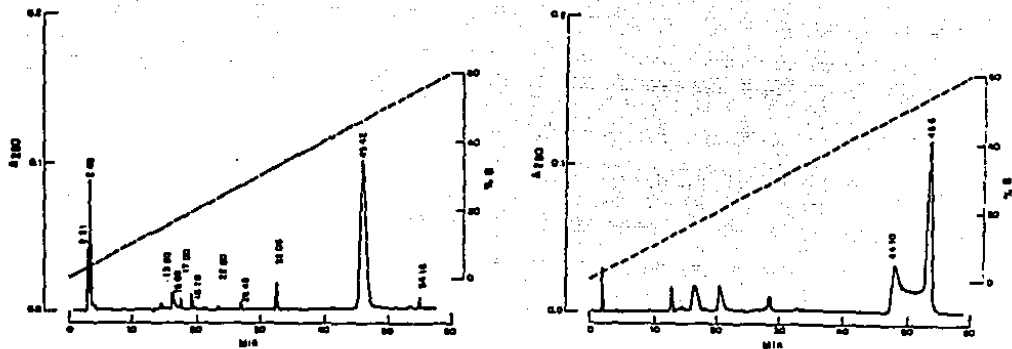


Figura 2: Purificación de las toxinas II-9.2.2 y II-9.2.3 por HPLC. Las toxinas II-9.2.2 (izquierda) y II-9.2.3 (derecha), se aplicaron a una columna C18 equilibrada con 0.12% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y eluida con un gradiente lineal de acetonitrilo con 0.1% de TFA, de 0 a 60% en 60 minutos. Con un flujo de 1. ml/min. Las toxinas puras II-9.2.2 y II-9.2.3 corresponden a los tiempos de retención 45.42 y 46.6 respectivamente.

terminal de esta toxina, se redujo y carboximetiló la proteína, utilizando ácido iodoacético para realizar la alquilación (Possani y col., 1981b). Posteriormente este material reducido y carboximetilado se digirió con la enzima V8 de Staphylococcus aureus, obteniéndose de esta forma una serie de péptidos que se purificaron por HPLC (fig. 3) y que se colectaron para determinar su secuencia de aminoácidos por separado, por medio de una degradación de Edman automatizada utilizando un secuenciador Beckman 890 M de acuerdo al método de Edman y Begg (1967). De los péptidos secuenciados, el péptido cuyo tiempo de retención corresponde a 35.50, resultó tener la secuencia de la región carboxilo terminal (fig. 4). Es importante resaltar que la secuencia ya estaba determinada hasta el aminoácido 63 de los 66 esperados en base a la composición de aminoácidos, es decir que en esta tesis se contribuyó con el hallazgo de los 3 últimos aminoácidos de la región carboxilo terminal, que se sabe por la experiencia en nuestro laboratorio es la porción de la secuencia mas difícil de ser determinada.

Por otro lado el componente II-9.2.3 se procesó de la misma forma para la determinación de la composición de aminoácidos (tabla 2), y secuencia amino terminal consiguiéndose secuenciar hasta el aminoácido No. 37 (tabla 5).

### 3.- Optimización del método Inmuno-Ensayo Enzimático (ELISA)

Para poder detectar de una manera eficiente y específica los anticuerpos monoclonales era necesario seleccionar un método que nos permitiera hacer esto. El método seleccionado fue el de

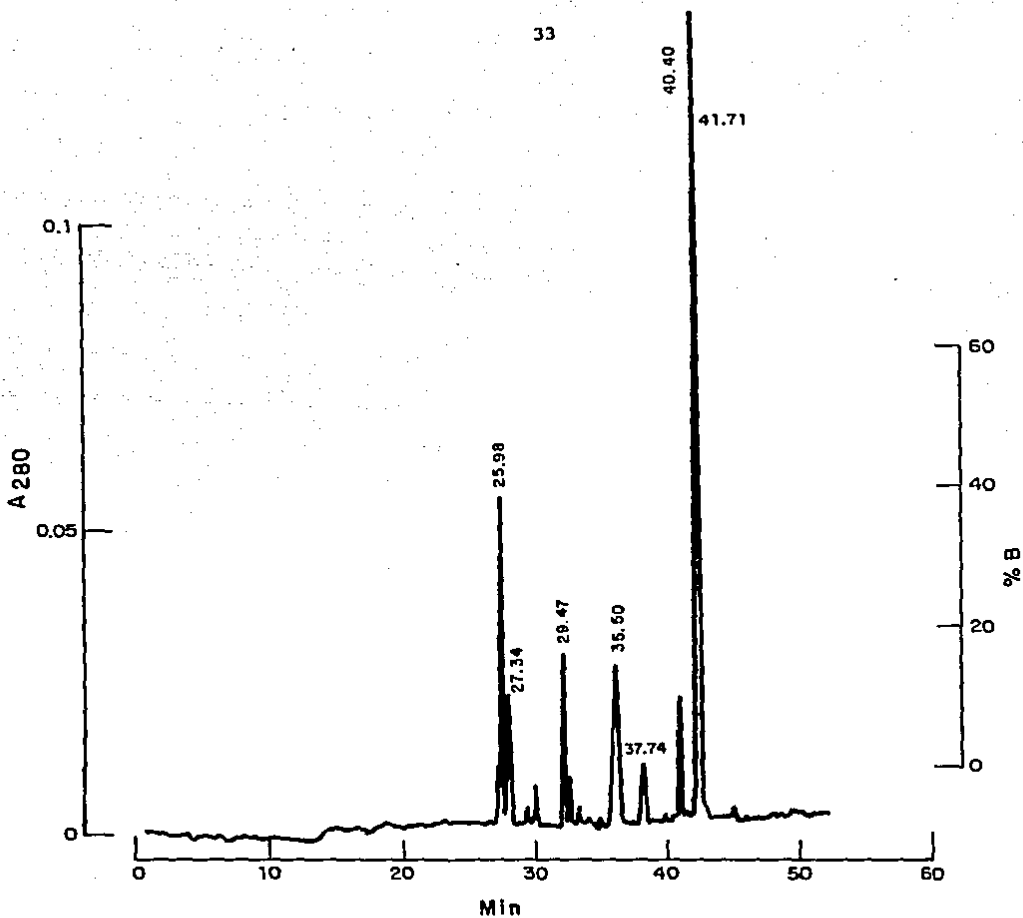


Figura 3: Separación de péptidos, obtenidos por digestión con proteasa V8 de la toxina C.n.II-9.2.2 reducida y carboximetilada por HPLC.

300 ul de la toxina C.n.II-9.2.2 (5 nmoles) tratados con proteasa V8 fueron aplicados a la columna (C18) utilizando las condiciones descritas por Possani y col. (1985). El péptido 35.5 corresponde a la región C-terminal de la toxina.



```

1           5           10           15           20
Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Asp-Lys-Asn-Thr-Gly-Cys-Lys-Tyr-Glu-Cys-Leu-Lys-Leu-Gly-
. . . . . D . . . . . 40->
21          25          30          35          40->
Asp-Asn-Asp-Tyr-Cys-Leu-Arg-Glu-Cys-Lys-Gln-Gln-Gly-Tyr-Lys-Gly-Ala-Gly-Gly-Tyr-
. . . . . D . . . . . 60->
41          45          50          55          60
Cys-Tyr-Ala-Phe-Ala-Cys-Trp-Cys-Thr-His-Leu-Tyr-Glu-Gln-Ala-Ile-Val-Trp-Pro-Leu-
. . . . . D . . . . . V8 . . . . .->
61          65
Pro-Asn-Lys-Arg-Cys-Ser
- - - - - V8 - - - - ->

```

Figura 4: Secuencia completa de aminoácidos de la toxina C.n.II-9.2.2.  
D: significa la secuencia obtenida en forma directa por la degradación de Edman. V8: significa la secuencia del péptido (35.5) obtenido por la digestión con proteasa V8 y separado por HPLC de acuerdo al texto de la figura No. 3.

Tabla 2: Composición de aminoácidos de las toxinas II-9.2.2 y II-9.2.3 del alacrán Centruroides noxius Hoffman.

Aminoácido	Toxina II-9.2.2*	Toxina II-9.2.3
Asx	5.0 (6)	2.1 (2)
Tre	1.9 (2)	4.1 (4)
Ser	0.9 (1)	--- (0)
Glx	6.0 (7)	5.5 (6)
Pro	1.9 (2)	2.2 (2)
Gli	6.9 (7)	7.7 (8)
Ala	4.0 (4)	4.2 (4)
Cis	8.6 (8)	7.1 (7)
Val	2.0 (2)	3.0 (3)
Met	--- (0)	--- (0)
Ile	--- (1)	0.7 (1)
Leu	6.0 (6)	7.1 (7)
Tir	6.3 (6)	6.1 (6)
Fen	1.4 (1)	3.3 (3)
His	--- (1)	--- (0)
Lis	7.3 (8)	7.4 (7)
Arg	1.9 (2)	3.7 (4)
Trp	n.d. (1)	n.d.
Total	65	64

n.d.= no determinado

\*)= Los valores entre parentesis, fueron obtenidos por secuencia de aminoácidos.

inmuno-ensayo enzimático. Dado que cada antígeno requiere de condiciones específicas de reacción para su detección, en la figura No. 5 se pueden apreciar las condiciones óptimas de concentración y pH para esta toxina (antígeno).

#### 4.- Obtención de los Anticuerpos Monoclonales.

Se obtuvieron 6 clonas independientes de hibridomas que se nombraron de la siguiente manera: BCF1, BCF2, BCF3, BCF7, BCF8 Y BCF9. Cada una de estas clonas se inoculó en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c tratados previamente con Pristan. Los anticuerpos monoclonales se purificaron del líquido de ascitis por medio de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. La figura No. 6 muestra los resultados del análisis de los 6 anticuerpos monoclonales purificados en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida, en donde se observa una sola banda de inmunoglobulina en cada preparación. Además, se puede apreciar que el corrimiento electroforético de algunos de los anticuerpos es diferente.

#### 5.- Caracterización de los Anticuerpos Monoclonales.

##### a) Determinación del título de los anticuerpos.

El primer ensayo para caracterizar los anticuerpos obtenidos fue la determinación del título de cada uno de ellos. Como se muestra en la figura No. 7, los 6 anticuerpos monoclonales se unen en forma dependiente de dosis a placas de ELISA con FII-9.2.2 pegada, mientras que no se observa unión con IgG normal de ratón.

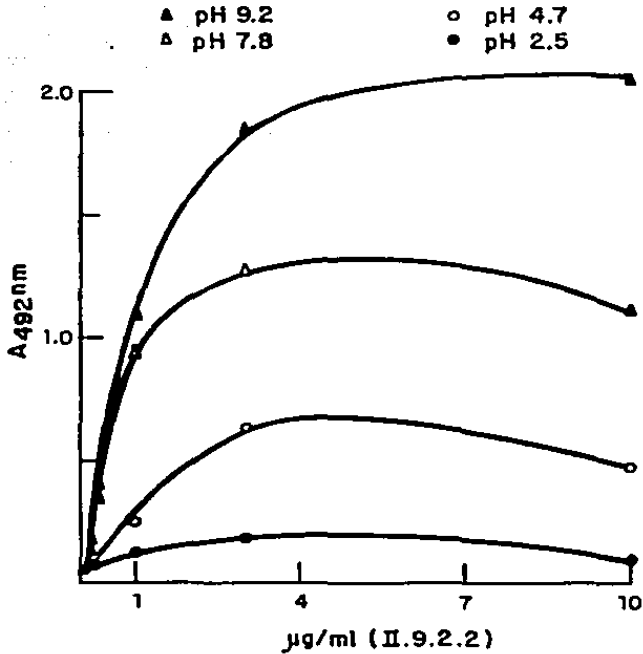


Figura 5: Optimización del Método de ELISA.

Placas de polivinilo se recubrieron con diferentes concentraciones de toxina C.n.II-9.2.2 en diferentes amortiguadores: glicina-HCl 20 mM pH 2.5 (●), acetato de amonio 20 mM pH 4.7 (○), fosfato de sodio 20 mM pH 7.8 (△) y bicarbonato de sodio 20 mM pH 9.2 (▲). La toxina se hizo reaccionar con un suero policlonal de ratón anti-C.n.II-9.2.2 en una dilución 1:5000. La reacción se reveló con un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa (conejo anti-ratón). Se observó que el pH óptimo para pegar el antígeno a la placa de polivinilo es de 9.2. La concentración óptima de antígeno resultó ser de 3 µg/ml.

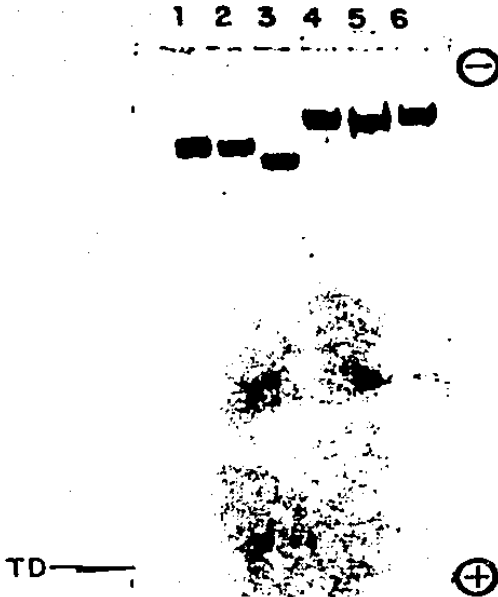


Figura 6: Análisis electroforético de los anticuerpos monoclonales anti-C.n.II-9.2.2 purificados. Se utilizó la técnica de Reisner, A.H. y col. (1975). (geles de poliacrilamida al 7.5% pH 8.9.) Se aplicaron 30 ug de cada anticuerpo monoclonal: BCF1 (carril 1), BCF3 (carril 2), BCF2 (carril 3), BCF7 (carril 4), BCF9 (carril 5) y BCF8 (carril 6). Después de la electroforesis, el gel fue teñido con azul de Coomassie G250.

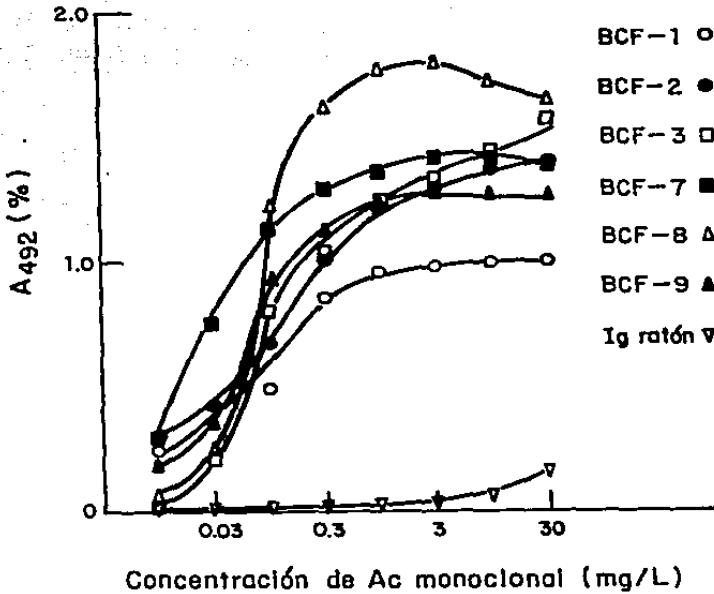


Figura 7: Titulación de los anticuerpos monoclonales anti-C.n.II-9.2 por ELISA. Diluciones seriadas de los anticuerpos monoclonales purificados, o IgG normal de ratón (control), fueron incubados en las placas de ELISA con la toxina C.n.II-9.2 pegada. La unión de los anticuerpos se reveló usando anticuerpos de conejo anti-ratón conjugados a peroxidasa. Los resultados son promedio de triplicados.

La concentración de anticuerpo requerida para obtener 50% del máximo de unión varió entre 0.03 y 0.1 mg/l.

b) Determinación de la especificidad de los anticuerpos.

La especificidad de los anticuerpos monoclonales para la FII-9.2.2 fué demostrada en experimentos de competencia (fig. 8) en los cuales se muestra que la toxina libre puede inhibir la unión de los 6 anticuerpos monoclonales a la toxina unida a la fase sólida. La concentración de toxina requerida para producir 50% de inhibición varía entre 0.1 y 3 mg/l para los diferentes anticuerpos.

El componente FII-9.2.3 fue capaz de inhibir sólo la unión de los anticuerpos BCF1 y BCF8, no así la de los anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9 (fig. 8) hasta las concentraciones probadas (30 mg/l).

La concentración de la toxina II-9.2.3 requerida para producir el 50% de inhibición fue de 1.58 mg/l para el anticuerpo BCF1 y de 0.28 mg/l para el anticuerpo BCF8, muy similar a las requeridas para la toxina II-9.2.2 para obtener la misma inhibición (BCF1, 2.5 mg/l; BCF8, 0.25 mg/l). Esto parece indicar que los anticuerpos 1 y 8 reconocen con la misma afinidad un determinante antigénico que es compartido por estas dos toxinas. Además, estos resultados indican también que estos dos componentes son diferentes entre sí, puesto que los anticuerpos 2,3,7 y 9 no reconocen a uno de ellos.

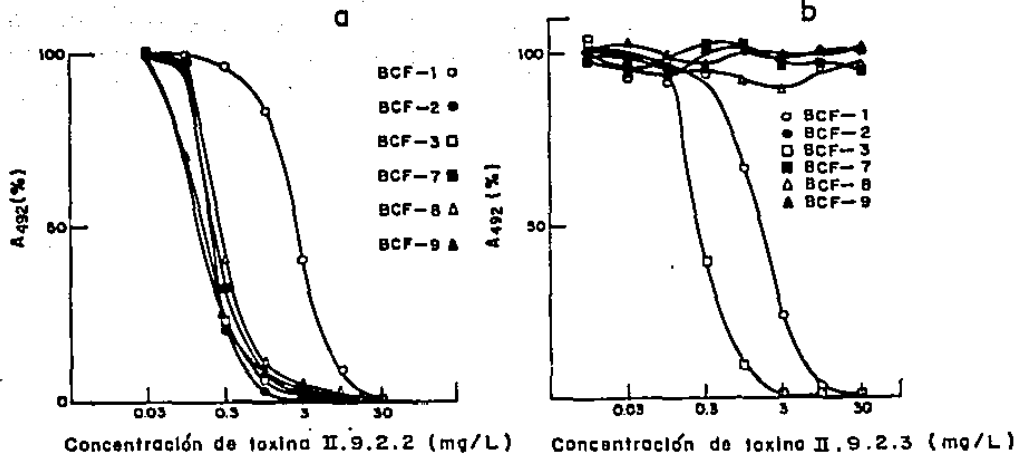


Figura 8: Especificidad de los Anticuerpos Monoclonales.

Placas de ELISA se cubrieron con toxina C.n.II-9.2.2. Los anticuerpos monoclonales puros (○): BCF1, 1 mg/l; (●): BCF2, 3 mg/l; (□): BCF3, 3 mg/l; (■): BCF7, 1 mg/l; (△): BCF8, 1.5 mg/l y (▲): BCF9, 1 mg/l, se incubaron en los pozos junto con diluciones seriadas de C.n.II-9.2.2 (fig. 8a) o C.n.II-9.2.3 (fig. 8b). Los anticuerpos unidos a la fase sólida se revelaron usando anticuerpos de conejo anti-ratón conjugados a peroxidasa, seguido de la incubación con el sustrato cromógeno. La absorbancia se registró a 492 nm. La relación entre la absorbancia en presencia de toxina libre y la absorbancia en su ausencia, se graficó contra la concentración de toxina.



c) Competencia entre los anticuerpos monoclonales por la unión a FII-9.2.2.

La unión de los 6 anticuerpos monoclonales a epitopes distintos o compartidos de la toxina II-9.2.2 fue investigado en un ELISA en sandwich, en el cual uno de cada par de anticuerpos utilizado fue inmovilizado a la placa de ELISA y el otro fue marcado con peroxidasa y usado para detectar el complejo de FII-9.2.2 con el anticuerpo inmovilizado. Se probaron todas las posibles combinaciones entre los anticuerpos; por ejemplo, el anticuerpo BCF1 con el BCF2, BCF1 con BCF3, BCF1 con BCF7, BCF1 con BCF8 y BCF1 con BCF9, mostrándose que el anticuerpo BCF1 es capaz de unirse a la toxina II-9.2.2 aún cuando ésta esté unida a cualquiera de los anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9. Esto no sucede cuando ésta está unida al anticuerpo BCF8, lo que indica que este anticuerpo (BCF1) reconoce un determinante antigénico diferente al que es reconocido por los otros anticuerpos, pero éste es el mismo o muy cercano al reconocido por el anticuerpo BCF8. El mismo comportamiento se observa con el anticuerpo BCF8. Los anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9 inhiben su unión a la toxina entre sí, indicando que éstos pudieran reconocer el mismo determinante antigénico o determinantes muy cercanos (fig. 9).

d) Presencia de componentes en el veneno de otras especies de alacrán que dan reacción cruzada.

Se llevó a cabo un experimento de competencia en ELISA, en el cual la unión de los anticuerpos monoclonales BCF2, BCF3, BCF7,



BCF8 y BCF9 a la FII-9.2.2 se ensayó en presencia de venenos de varias especies de alacrán. Con los anticuerpos BCF2 y BCF7, se observó la presencia de componentes que producen reacción cruzada en el veneno de C. limpidus limpidus, C. limpidus tecomanus, C. limpidus acatlanensis, C. suffusus suffusus y C. infamatus infamatus. No así para los venenos de los alacranes Tityus y C. elegans (fig. No. 10a y 10c).

Con el anticuerpo BCF3, se encontraron componentes que cruzan en todos los venenos de las especies Centruroides probadas, excepto para C. elegans. El veneno de Tityus serrulatus no muestra inhibición (fig. No. 10b).

Con los anticuerpos BCF9 el veneno de C. limpidus acatlanensis reacciona tan bien como el veneno de C. noxius. El veneno de C. limpidus tecomanus y C. limpidus limpidus fueron alrededor de 3 veces menos potentes y la reacción con los venenos de los alacranes C. infamatus infamatus y C. suffusus suffusus fue de 30 a 100 veces menos potente. Por último los venenos de C. elegans y T. serrulatus no dan inhibición significativa (fig. No. 10e). Por otro lado los venenos de todas las especies de Centruroides contienen niveles muy similares de componentes que cruzan con el anticuerpo BCF8 (fig. No. 10d).

e) Reacción cruzada de otras toxinas de alacrán con los anticuerpos monoclonales.

Para poder explorar una posible relación inmunoquímica entre toxinas del mismo veneno así como entre toxinas de otras especies de Centruroides, se llevaron a cabo experimentos de competencia

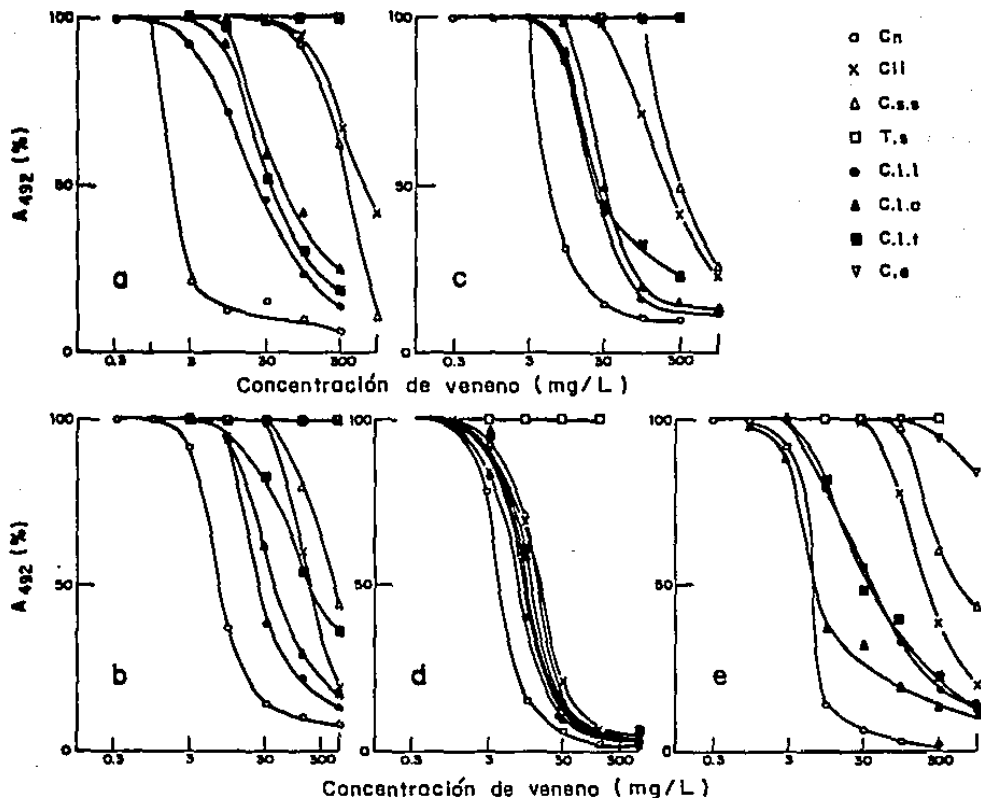


Figura 10: Reacción cruzada con componentes de venenos de otras especies de alacranes.  
 La unión de los anticuerpos monoclonales BCF2 (fig. 10a), BCF3 (fig. 10b), BCF7 (fig. 10c), BCF8 (fig. 10d) y BCF9 (fig. 10e) a la toxina C.R.II-9:2-2 se probó en presencia de diluciones seriadas de venenos de los alacranes: *C. notus* (a), *C. lipidus lipidus* (b), *C. lipidus tacomenus* (c), *C. lipidus ecateñense* (d), *C. elapsus* (e), *C. infamatus infamatus* (x), *C. suffusus suffusus* (Δ) y *Tityus serrulatus* (a). Los anticuerpos unidos se revelaron de la manera acostumbrada. Los resultados son el promedio de triplicadas.



con los anticuerpos monoclonales y toxinas puras. Los resultados obtenidos indican que las toxinas del alacrán C. noxius II-9.2.2, II-10, II-14 así como la toxina 1 del alacrán C. limpidus tecomanus, compiten casi de manera idéntica por la unión al anticuerpo BCF8 (fig. 11), no observándose reconocimiento con los otros anticuerpos.

f) Ensayos de neutralización.

Grupos de 5 ratones de la cepa CD1 fueron inyectados por vía intraperitoneal con mezclas de 7.5 DL50 de toxina II-9.2.2 previamente incubadas con cada uno de los anticuerpos monoclonales en una relación molar 1:10 (toxina:anticuerpo) por una hora, a 37 C. Normalmente debería haberse utilizado una concentración de toxina que correspondiera a una dosis de LD50. Sin embargo, queríamos estar seguros que nuestros anticuerpos monoclonales eran capaces aún de neutralizar a una dosis letal 100%. Revisando la literatura (Jean-Claude Boulain y col. 1982, Bahraoui E., y col., 1988), encontramos que varios autores han utilizado varias dosis LD50 para sus ensayos. Al realizar estos experimentos de neutralización se observa que todos los anticuerpos retardan la acción letal de la toxina en comparación al control inoculado solo con la toxina o con la toxina incubada con un anticuerpo no relacionado (BNTX16). De los cinco ratones inoculados con la mezcla de toxina-BCF2, 3 de ellos tardaron en morir 15 horas y los dos sobrevivientes se mantuvieron en observación durante 3 semanas haciendo pensar que este anticuerpo tiene acción neutralizante. (Tabla 3).

**TABLA No. 3: Ensayo de neutralización in vivo de anticuerpos monoclonales.**

<b>Mezcla inyectada</b>	<b>sobrevivientes</b>	<b>Tiempo promedio de sobrevivencia. Solo de los ratones que murieron</b>
C.n. II-9.2.2	0/5	20 minutos
C.n. II-9.2.2 + BNTX16	0/5	20 minutos
C.n. II-9.2.2 + BCF1	0/5	60 minutos
C.n. II-9.2.2 + BCF2	2/5*	60 horas
C.n. II-9.2.2 + BCF3	0/5	15 horas
C.n. II-9.2.2 + BCF7	0/5	60 minutos
C.n. II-9.2.2 + BCF8	0/5	60 minutos
C.n. II-9,2,2 + BCF9	0/5	60 minutos
Solo anticuerpos monoclonales	5/5	

\* Los 2 ratones que sobrevivieron se mantuvieron en observación durante 3 semanas.

BNTX16 es un anticuerpo monoclonal dirigido contra una toxina no relacionada.

7.5 LD50 de toxina C.n. II-9.2.2 fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal en una relación molar 1:10 (toxina-anticuerpo) e inyectadas por vía intraperitoneal en 5 ratones.

## IV/ DISCUSION.

En la discusión de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, queremos analizar algunos puntos específicos. Para esto vamos a dividir esta sección en algunos apartados:

## 1. Aislamiento y caracterización del antígeno.

En esta tesis reportamos una estrategia para la separación homogénea de dos toxinas del veneno del alacrán C. noxius, la elucidación completa de la estructura primaria de la toxina II-9.2.2 y la secuenciación de la región N-terminal de la toxina II-9.2.3.

La purificación de la toxina II-9.2.2 fue publicada anteriormente por Possani y col. (1981), partiendo del veneno total pasado por una columna de filtración molecular seguido de dos columnas de intercambio iónico. En este trabajo se adicionó un paso más de purificación, en una columna de CM-celulosa a pH 8 obteniéndose un segundo componente al que se le llamó II-9.2.3. Este fue tóxico para mamíferos en dosis de algunos microgramos (6 ug) por 20 gramos de peso de ratón. Tanto el componente II-9.2.2 como el componente II-9.2.3 se pasaron por HPLC para comprobar su pureza. (fig. 2).

Se comprobó la secuencia amino terminal de la toxina II-9.2.2 y se determinó la secuencia carboxilo terminal que aún no había sido reportada, haciendo una digestión con proteasa V8 de estafilococo y secuenciando cada uno de los peptidos obtenidos de esta digestión, armando así el mapa peptídico (fig.3 y 4).



De la nueva toxina II-9.2.3 se determinó la secuencia de aminoácidos amino terminal llegando hasta el aminoácido 37, encontrando que ambas toxinas difieren en los aminoácidos: 7, 8, 9, 17, 31, 32, 33 y 34 (tabla 5).

Como discutiremos mas adelante, el antígeno inicialmente utilizado para la generación de las líneas celulares híbridas productoras de anticuerpos monoclonales fue la toxina II-9.2, la cual, contiene dos toxinas: la II-9.2.2 y la II-9.2.3.

## 2. Obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

Se obtuvieron seis líneas de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la toxina II-9.2 del veneno del alacrán Centruroides noxius. Los seis anticuerpos fueron capaces de unir en forma dependiente de dosis a la toxina II-9.2.2 difiriendo en la concentración requerida para obtener el 50% de unión máxima, como se discutirá mas adelante.

Por los ensayos de ELISA en sandwich se puede observar que los anticuerpos llamados BCF1 y BCF8 reconocen un determinante antigénico diferente al que es reconocido por los anticuerpos llamados BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9. Aparentemente los anticuerpos BCF1 y BCF8 reconocen el mismo determinante antigénico o determinantes antigénicos muy cercanos que por impedimento estérico no permiten la unión de los dos anticuerpos a la vez; o posiblemente se produce un cambio de conformación al reaccionar el primer anticuerpo con la toxina, el cual enmascara el segundo determinante antigénico. Lo mismo puede suceder entre los

anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9.

Puesto que el antígeno usado para producir y detectar los anticuerpos monoclonales había sido la fracción II-9.2 original se decidió probar el reconocimiento de los anticuerpos por las dos nuevas fracciones encontrando que los anticuerpos BCF1 y BCF8 son los únicos capaces de reconocer a la toxina II-9.2.3, (fig.8). Se podría pensar que puesto que se usó como antígeno una mezcla de dos toxinas, los anticuerpos llamados BCF1 y BCF8, podrían ser una mezcla de dos anticuerpos. Para descartar esta posibilidad, se utilizaron dos columnas de afinidad, pegando en una, toxina II-9.2.2 a Sepharosa 4B, por el método de bromuro de cianógeno (Porath, H. 1968, Axen R. y col., 1967) y la otra pegando la toxina II-9.2.3 por el mismo método. Por cada una de estas columnas se pasaron primero el anticuerpo BCF1 y, tanto lo que se pegó a la resina como lo que se eluyó de ésta, con ácido acético 0.1 M, se probó el reconocimiento en ensayos de ELISA.

Para las dos columnas, ambas fracciones, siguieron reconociendo a las dos toxinas, lo mismo se realizó con el anticuerpo BCF8, obteniéndose resultados similares, por tanto, podemos estar seguros de que no es una mezcla de anticuerpos y que estas toxinas comparten determinante(s) antigénico(s). Además, se comprueba una vez más que estos anticuerpos son diferentes a los anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9.

3. Los anticuerpos monoclonales reconocen toxinas de otros venenos.

Al probar estos anticuerpos con otros venenos de alacranes del

género Centruroides y del género Tityus se observa que estos reconocen a algun(s) componente(s) en la mayoría de los venenos de los alacranes del género Centruroides no así del veneno de los alacranes del género Tityus. Existe un comportamiento similar entre todos los anticuerpos excepto para el anticuerpo BCF8, el cual reconoce perfectamente todos los venenos del género Centruroides y se puede obtener una inhibición completa en una escala de concentración muy similar al del veneno de Centruroides noxius (fig.10 ), demostrando así la presencia de un componente análogo en diferentes concentraciones o con distinta afinidad por los anticuerpos monoclonales en los venenos probados.

En vista de estos resultados se decidió probar algunas toxinas puras con las que se contaba en el laboratorio, frente a estos anticuerpos. Al hacer reaccionar los anticuerpos con toxinas puras del veneno del mismo alacrán (II-10 y II-14) y del alacrán Centruroides limpidus tecomanus (toxina 1), sólo el anticuerpo BCF8 fue capaz de reconocer estas tres toxinas (fig. 11). Ello podría explicar su comportamiento ante los diferentes venenos (curvas de desplazamiento muy semejantes) ya que está reconociendo a más de un componente en un mismo veneno y la concentración absoluta de éste aumenta. Además, esto comprueba que este anticuerpo está reconociendo un determinante antigénico diferente al que reconocen los otros anticuerpos.

Alineando la secuencia de las toxinas II-9.2.2, II-10, II-14 y toxina 1 y haciendo una comparación de las graficas de hidrofobicidad obtenidas por un análisis de acuerdo a Hopp y Wood (1984), podemos imaginar que posiblemente la región que comparten

sea la región que se encuentra entre los aminoácidos localizados en la posición 16 y 19 ya que se encuentra muy conservada entre estas toxinas (fig.12 ).

Lo mismo podemos hacer con respecto a los anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9, puesto que a pesar de que estas cuatro toxinas presentan alta similitud en cuanto a la secuencia de aminoácidos y en cuanto a patrones de hidrofobicidad, éstos no son capaces de reconocerlas, por lo que inferimos que estos anticuerpos reconocen precisamente la región que es diferente entre la toxina II-9.2.2 y las otras toxinas. La región común podría estar situada entre los aminoácidos 6 a 9 y 30 a 35 con respecto a la secuencia y entre la posición 1 a 11 con respecto a hidrofobicidad (fig.12, tabla 4). En relación a las toxinas II-9.2.2 y II-9.2.3 podemos decir que los anticuerpos BCF1 y BCF8 podrían reconocer las regiones más parecidas entre las dos toxinas y que los anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9 reconocen las regiones que varían entre éstas.

Sumando estos datos de secuencia (II-9.2.3) con los datos ya obtenidos en la reacción de los anticuerpos con las otras toxinas, se podría sugerir la posibilidad de que los anticuerpos BCF1 y BCF8 reconocen una zona que abarca a la región amino terminal. (aminoácidos 1 al 6) y los anticuerpos BCF2, BCF3, BCF7 y BCF9 una región que involucre los aminoácidos 7, 8 y 9 y los aminoácidos de la región 30-35. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, puesto que todavía nos falta determinar la región C-terminal de la toxina II-9.2.3.

4. Experimentos de neutralización "in vivo" de la toxina II-9.2.2 por los anticuerpos monoclonales.

Se probó la capacidad neutralizante de estos anticuerpos, inyectando intraperitonealmente una mezcla de toxina II-9.2.2 y anticuerpo (relación molar 1:10) usando 7.5 DL50 (en base a lo que se mencionó en el inciso (f) de material y métodos), Se observó que todos los anticuerpos retardan la muerte del animal, en comparación con el control, (tabla 3) notandose que el anticuerpo BCF2 retardó la muerte a 3 de 5 ratones por 15 horas, y los dos sobrevivientes se mantuvieron vivos durante 3 semanas. Se podría decir que este anticuerpo tiene la capacidad de neutralizar la actividad de esta toxina. Experimentos previos de inhibición de unión de la toxina marcada con yodo radioactivo a sinaptosomas de rata hechos en el laboratorio por Georgina Gurrola, indicaron que ciertamente el anticuerpo BCF2 es el que produce una inhibición del pegado mayor que la que producen los otros anticuerpos (92%) aunque todos los anticuerpos muestran inhibición del pegado (70 y 80 %) por lo que podría pensarse que este anticuerpo esta reconociendo el sitio de unión de la toxina a su receptor o una región muy cercana a éste que por impedimento estérico o cambio de conformación no permite la unión de la toxina al receptor.

Es importante notar que todos los anticuerpos obtenidos en este trabajo fueron capaces de reconocer a alguno(s) componente(s) de otros venenos de alacranes del género Centruroides por lo que si alguno de estos tiene capacidad neutralizante (BCF2) esto indicaría que existe una alta probabilidad de que neutralice

TABLA 4: Secuencias de aminoácidos de toxinas de diferentes alacranes mexicanos.

	1	5	10	15	20
C.n.II.9.2.2	Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val	Asp-Lis-Asn	Tre-Gli-Cis-Lis-Tir-Glu-Cis	Leu-Lis-Leu-Gli-	
C.l.t. 1	Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val-Asn-His-Ser		Tre-Gli-Cis-Lis-Tir-Glu-Cis	Glu-Lis-Leu-Gli-	
C.n.II.14	Lis-Asp-Gli-Tir-Leu-Val-Asp	---	Ala-Lis-Gli-Cis-Lis-Lis-Asn	Cis-Tir-Lis-Leu-Gli-	
C.n.II.10	Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val-Asn-Leu-Tir		Tre-Gli-Cis-Lis-Tir-Glu-Cis	Fen-Lis-Leu-Gli-	
	21	25	30	35	40
C.n.II.9.2.2	Asp-Asn-Asp-Tir-Cis-Leu-Arg-Glu-Cis		Lis-Gln-Gln-Gli-Tir	Lis-Gli-Ala-Gli-Gli-Tir-	
C.l.t. 1	Asp-Asn-Asp-Tir-Cis-Leu-Arg-Glu-Cis-Arg-Gln-Gln		Tir-Gli-Lis-Gli-Ala-Gli-Gli-Tir-		
C.n.II.14	Lis-Asn-Asp-Tir-Cis-Asn-Arg-Glu-Cis-Arg		Met-Lis-His-Arg-Gli-Gli-Ser-Tir-Gli-Tir-		
C.n.II.10	Asp-Asn-Asp-Tir-Cis-Leu...				
	41	45	50	55	60
C.n.II.9.2.2	Cis-Tir-Ala-Fen-Ala-Cis-Trp-Cis-Tre-His-Leu-Tir-Glu-Gln-Ala-Ile		Val-Trp-Pro-Leu-		
C.l.t. 1	Cis-Tir-Ala-Fen-Gli-Cis-Trp-Cis-Tre-His-Leu-Tir-Glu-Gln-Ala-Val		Val-Trp-Pro-Leu-		
C.n.II.14	Cis-Tir-Gli-Fen-Gli-Cis-Tyr-Cis-Glu-Gli-Leu-Ser-Asp-Ser-Tre-Pro-Tre		Trp-Pro-Leu-		
	61	65			
C.n.II.9.2.2	Pro-Asn-Lis-Arg-Cis-Ser				
C.l.t. 1	Pro-Asn-Lis-Tre-Cis-Ser				
C.n.II.14	Tre-Asn-Lis-Tre-Cis				

TABLA 5: Comparación de secuencias de aminoácidos de las toxinas C.n.II.9.2.2 y Cn.II.9.2.3.

	1	5	10	15	20
C.n.II 9.2.2	Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val	Asp-Lis-Asn	Tre-Gli-Cis-Lis-Tir-Glu-Cis	Leu	Lis-Leu-Gli-
C.n.II.9.2.3	Lis-Glu-Gli-Tir-Leu-Val	Glu-Leu-Gli	Tre-Gli-Cis-Lis-Tir-Glu-Cis	Fen	Lis-Leu-Gli-
	21	25	30	35	40
C.n.II.9.2.2	Asp-Asn-Asp-Tir-Cis-Leu-Arg-Glu-Cis-Lis	Gln-Gln-Gli-Tir	Lis-Gli-Ala-Gli-Gli-Tir-		
C.n.II.9.2.3	Asp-Asn-Asp-Tir-Cis-Leu-Arg-Glu-Cis-Lis	Ala-Ala-Tir-Gli	Lis-Gli-Ala-...		
	41	45	50	55	60
C.n.II.9.2.2	Cis-Tir-Ala-Fen-Ala-Cis-Trp-Cis-Tre-His-Leu-Tir-Glu-Gln-Ala-Ile-Val-Trp-Pro-Lau-				
	61	65			
C.n.II.9.2.2	Pro-Asn-Lis-Arg-Cis-Ser				

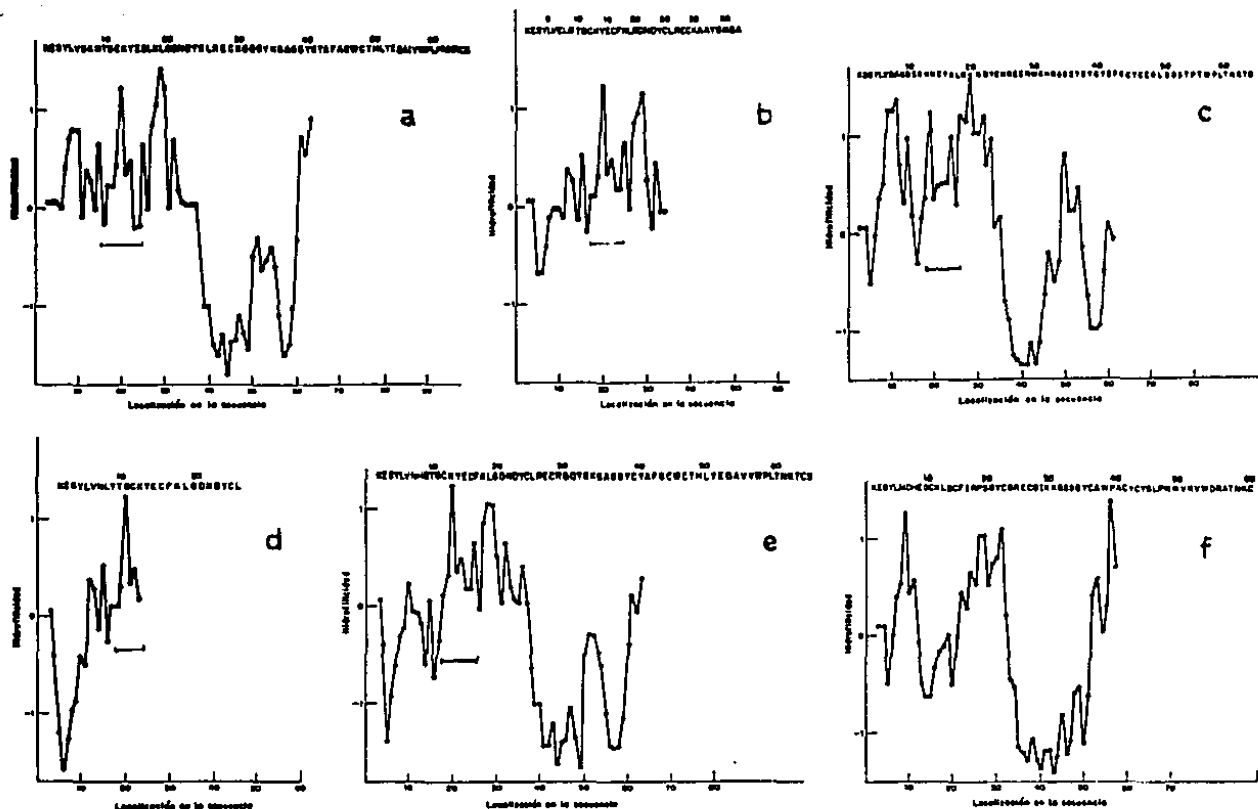


Figura 12: Graficas de hidrofilicidad de las toxinas: C.n.II-9.2.2 (a), C.n.II-9.2.3 (b), C.n.II-14 (c), C.n.II-10 (d), C.1.t. toxina 1 (e) y toxina gamma de *Tityus serrulatus*. (f). Los valores de hidrofilicidad se calcularon de acuerdo al método de Hopp y Woods (1981) y se graficó el promedio de hidrofilicidad contra la posición en la secuencia de aminoácidos. Las barras horizontales indican la región que conserva mayor similitud entre las toxinas.



también el efecto de este o estos componentes análogos (posiblemente otras toxinas que actúen sobre el canal de sodio) por lo que sería un anticuerpo de una alta capacidad para neutralizar la acción no sólo por picadura de C. noxius sino también para la picadura de cualquier alacrán del género Centruroides. Además, estos anticuerpos también sirven para hacer columnas de afinidad y purificar en un sólo paso las toxinas análogas que existen en otros venenos.

Se ve clara la necesidad de determinar las constantes de afinidad de estos anticuerpos por las toxinas para poder realizar con mayor precisión los experimentos de inhibición de la unión a sinaptosomas y poder correlacionar las constantes de afinidad por los anticuerpos como la constante de afinidad de la toxina por el receptor con los experimentos de neutralización (mayor tiempo de sobrevivencia), ya que posiblemente el factor determinante entre el anticuerpo BCF2 y los otros anticuerpos sea una mayor afinidad por la toxina.

Solo faltaría saber con certeza que región de la toxina es reconocida por cada uno de estos anticuerpos, para lo que, conociendo ya la secuencia de la toxina II-9.2.2 y las otras toxinas análogas II-9.2.3, II-10, II-14 y toxina 1 de C. l. tecomanus, y con lo ya comentado al principio se piensa sintetizar péptidos que involucren regiones que principalmente difieran en secuencia de aminoácidos (posiciones 6 - 9 y 30 - 35) así como regiones de la toxina que por su análisis de hidrofobicidad indiquen un comportamiento diferente, por lo que también se vería involucrada la región amino terminal,

aminoácidos 6 al 9.

Pensando que tal vez los determinantes antigénicos que están reconociendo estos anticuerpos están influenciados por la presencia de los puentes disulfuro (ya que al reducirse la toxina no es reconocida por ellos, experimentos realizados por Georgina Gurrola) se ha pensado también en sintetizar péptidos que involucren las dos regiones mencionadas y que estén unidos por los respectivos puentes disulfuro.

Como mencionamos en la introducción, la posición de los puentes disulfuro ha sido determinada para otras toxinas beta (toxinas de C. sculpturatus. Fontecilla-Camps y col. 1982), y por existir alta homología en secuencia y conservar la posición de la cisteína, hemos pensado que los puentes disulfuro son una característica muy conservada en la estructura de todas las toxinas de tipo beta, por lo que pensamos que sintetizar estos péptidos sería una buena aproximación para la caracterización completa de estos anticuerpos y por lo tanto aumenta la posibilidad de un mejor conocimiento de todas las toxinas de tipo beta, principalmente las existentes en los venenos de los alacranes del género Centruroides.

Un mejor conocimiento de este tipo de toxinas implicaría una mejor herramienta para el estudio bioquímico y farmacológico de los canales de sodio afectados por estas toxinas.

Desde un punto de vista médico, el encontrar anticuerpos neutralizantes con alta afinidad por la toxina ayudaría en los problemas de picadura de alacrán del género Centruroides (el género venenoso existente en México), ya que esta toxina es una

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

de las que tiene la menor DL50 y además la que se encuentra en mayor cantidad en el veneno (30 %). Además si se toma en cuenta que en el mundo los accidentes por picadura y mordedura de animales ponsonozos son todavía frecuentes y que en nuestro país la mortalidad más elevada en este campo es, quizá, a causa de la picadura de alacrán. De aquí la importancia de este trabajo.

## V/ CONCLUSIONES.

1. Se obtuvieron seis anticuerpos monoclonales contra la toxina C.n. II.9.2.2, llamados BCF1, BCF2, BCF3, BCF7, BCF8 y BCF9.
2. Los anticuerpos BCF1 y BCF8 reconocen un determinante antigenico que es compartido por las toxinas C.n. II.9.2.2 y C.n. II.9.2.3.
3. Tanto las toxinas C.n. II.9.2.2, C.n. II.10, C.n. II.14 como la toxina 1 de C.l.t., compiten a niveles identicos por la unión al anticuerpo BCF8.
4. Los venenos de los alacranes de todas las especies de Centruroides contienen componentes que tienen reacción cruzada con los anticuerpos monoclonales BCF2, BCF3, BCF7, BCF8 y BCF9.
5. Solo el anticuerpo BCF2 tiene capacidad neutralizante.
6. Se obtuvo la secuencia completa de aminoácidos de la toxina C.n. II.9.2.2.
7. Se determinó la secuencia de aminoácidos amino-terminal de la toxina C.n. II.9.2.3.

## V/ REFERENCIAS.

- Alexander, P., Lundren, H. P. Eds. (1966). A laboratory manual of analytical methods in protein chemistry including polypeptides, Vol 4, Pergamon Press, New York.
- 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. Biophys. 164, 694-706.
- Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J., Darbon, H., Elayeb, M., Granier, C., Marvaldi, J. and Rochat, H. (1988). Monoclonal Antibodies to Scorpion Toxins. The Journal of Immunology. 141. 214-221.
- Boulain, J., Menez, A., Couderc, J., Faure, G., Liacopoulos, P. and Fromageot P. (1982) Neutralizing monoclonal antibody specific for Naja nigricollis toxin alfa: Preparation, characterization, and localization of the antigenic binding site. Biochemistry, 21, 2910-2915.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Travin, T.L. (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. J. Chromatogr. 336, 93-104.
- Burnet, F.M. (1959) The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Cambridge University Press.
- Cahalan, M.D. (1975). Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by Centruroides sculpturatus scorpion venom. J. Physiol., 244, 511-534.
- Carbone, E., Prestipino, G., Spadavecchia, L., Franciolini, F. and Possani, L. D. (1987) Blocking of the Squid Axon K Channel by Noxiustoxin: a toxin from the venom of the scorpion Centruroides noxius. Pflügers Arch. 408, 423-431.
- Catterall, W. A. (1977). Activation of the Action Potential Na Ionophore by Neurotoxin. J. Biol. Chem. 252, 8669-8676.
- Catterall, W., Ray, R. and Morrow C. (1976). Membrane Potential Dependent Binding of Scorpion Toxin to Action Potential Na Ionophore Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2682-2686.
- Couraud, F., Jover, E., Dubois, J. M. and Rochat, H. (1982). Two Types of Scorpion Toxin Receptor Sites, one Related to the Activation, the other to the Inactivation of the Action Potential Sodium Channel. Toxicon, 20, No. 1. 9-16.

- Darbon, H., Jover, E., Couraud, F. and Rochat, H. (1983). Photoaffinity Labeling of and Scorpion Toxin Receptors Associated with Rat Brain Sodium Channel Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 415-421.
- Dent, M., Possani, L. D., Ramirez, G. and Fletcher, P. L. Jr. (1980). Purification and Characterization of two Mammalian Toxins from the Venom of the Mexican Scorpion Centruroides noxius Hoffman. Toxicon 18, 343-350.
- Edman, P. and Begg, G. (1967). A Protein Sequenator. Eur. J. Biochem. 1, 80-91.
- El Ayeb, M., Darbon, H., Bahraqui, E., Vargas, O. and Rochat, H. (1986). Differential effects of defined chemical modification on antigenic and pharmacological activities of scorpion alfa and beta toxins. Eur. J. Biochem. 155, 289-294.
- Fontecilla-Camps, J. C., Almasy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D. D. and Bugg, C. E. (1980). Three Dimensional Structure of a Protein from Scorpion Venom: a new structural class of neurotoxins. Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 77, 6496-6500.
- Fontecilla-Camps, J. C., Almasy, R., Suddath, F.L., and Bugg, C.E. (1982). The three dimensional structure of scorpion Centruroides sculpturatus neurotoxins. Toxicon, 20, 1-8.
- Fontecilla-Camps, J. C., Habersetzer-Rochat, C. and Rochat, H. (1988) Orthorhombic Crystals and three-dimensional Structure of the potent toxin II from the scorpion Androctonus australis Hector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 7443-7447.
- Franssen, J. D., Hérion, P. and Urbain, J. (1981) Selection of myeloma lines suitable for hybridoma. Protides of the Biological Fluids (Edited by Peeters H.) XXIX, 645. Pergamon Press, Oxford.
- Garvey, J.S., Cremer, N.C. and Susdorf, D.H. (1977). Methods in Immunology. W.A. Benjamin, Reading. MA.
- Goding, J. W. (1983). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press. New York San Francisco, London.
- Goodfriend, L. T., Levine, L., Fasman, G. D. (1964). Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. Science, 144, 1344-1346.
- Heinrikson, R. L. and Meredith, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase High-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. Anal. Biochem. 136, 65-74.

- Hérion, P., Franssen, J.D. and Urbain, J. (1981). A study of hybridoma soft agar cloning. In *Protides of the Biological Fluids* (Edited by Peeters H.) Vol. 29, p. 627 Pergamon Press, Oxford.
- Hodgking, A.L., Huxley, A.F. (1952). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Lohao. *J. Physiol.* 116: 497-506
- Hoogenrad, N., Helman, T. and Hogenrad, J. (1983). *J. Immunol. Meth.* 61, 317.
- Hopp, P.T., and Woods, R.K. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 No. 6: 3824-3828.
- Jover, E., Couraud, F., and Rochat, H. (1980). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, No. 4, 1607-1614.
- Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- Köhler, G. (1981) *J. Immunol. Methods.* 11, 285.
- Kopeyan, C., Martinez, G., Lissitzky, S., Miranda, F. and Rochat, H. (1974). Disulphide bonds of toxin II of the scorpion Androctonus australis Hector. *Eur.J. Biochem.* 47, 483-489.
- Littlefield, J.W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145: 709-710.
- Nakane, P. (1979) en "Immunoassays in the clinical laboratory" (R.M. Nakamura, W.R. Dito, and E. S. Toker, III, Eds), p 81. Liss, New York.
- Narahashi, T., Deguchi, T., Urakawa, N., Ohkuba, Y. (1960). Stabilization and rectification of muscle fibers membrane by tetrodotoxin. *Am.J. Physiol.* 198, 934.
- Narahashi, T., Moore, J.W., Sealt, W.R. (1964). Tetrodotoxin Blockage of sodium conductance increase in lobster giant axon. *J. Gen. Physiol.* 47, 963-974.
- Possani, L.D., Dent, R.A., Martin, M.B., Maelicke, A. and Svendsen, I.B. (1981a). The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion Centruroides noxius Hoffman. *Carlsberg Res. Commun.* 46, 207-214.

Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J. and Svendsen (1981b) Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Carlsberg Res. Commun. 46, 195-205.

Possani, L.D., Steinmetz, W.E., Dent, M.A.R., Alagón, A.C. and Wuthrich (1981c). Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American Scorpions. Biochim. Biophys. Acta 669, 183.

Possani, L.D., Martin, M.B., Svendsen, I.B. (1982). The primary structure of Noxiustoxin: A K channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffman. Carlsberg Res. Commun. 47, 285-289.

Possani, L.D. (1984). Structure of Scorpion Toxin. In: Handbook of Natural Toxins (A.T. Tu Editor) Vol. 2 p.p. 513, Marcel Dekker Inc., N. York.

Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., Rode, G.S. and Erickson, B.W. (1985). Toxins from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello: Primary structure and sequence comparison by metric analysis. Biochem. J. 229, 739-750.

Reisner, A.H., Nemes, P. and Bucholz. (1975). The use of Coomassie brilliant blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 64, 509.

Sitges, M., Possani, L.D. and Bayon, A. (1987). Characterization of the action of toxins II-9.2.2 and II-10 from the venom of the scorpion Centruroides noxius on transmitter release from mouse brain synaptosomes. J. Neurochem. 48. 1745-1751.

Stanworth, D.R. (1960), A rapid method of preparing pure serum Gamma-Globulin. Nature (Lond). 188, 156-157.

Weir, D.m. (E.d.) (1978) Handbook of Experimental Immunology, 3rd edn., Blackwell, Oxford.