

03044

2
2ej.

FALLA DE ORIGEN

Este trabajo fué realizado en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani Postay en el Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología UNAM.



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.

AGRADECIMIENTOS

Con el cariño más grande a mis padres y hermanos por haberme dado todo su apoyo.

Al Dr. Lourival D. Possani Postay por sus enseñanzas, su profunda paciencia y todo el apoyo que me ha brindado.

A todos los compañeros y amigos que de una u otra forma colaboraron en este trabajo, principalmente a Delia Cuevas, Georgina Gurrola, Fernando Zamudio, Fredy Coronas, Angelina Ramírez, Elizabeth Mata, Sergio González, Pedro Saucedo, Sandra Contreras, Silvia Landa.

Al jurado de esta tesis que con sus observaciones mejoraron la calidad de la misma.

Presidente: Dr. Lourival D. Possani Postay.

Secretario: Dr. Miguel Lara.

Vocal: Dr. Jesús Martín Polo.

Suplente: Dr. Carlos Larralde.

Suplente: Dra. Yolanda López Vidal.

RESUMEN

El veneno de algunas especies de alacranes mexicanos del género Centruroides poseen toxinas que afectan la permeabilidad iónica de membranas excitables de mamíferos. Entre las toxinas que representan un problema de salud para los humanos picados por alacranes está una familia de polipéptidos de alrededor de 65 aminoácidos que bloquean a canales de sodio, como es el caso de la toxina II-9.2.2 del veneno del alacrán de Nayarit Centruroides Noxius Hoffmann. Esta es una de las toxinas más potentes conocidas (LD50= 125 ng/20 g de ratón, cepa CD1). Por esta razón existe interés en conocer los sitios activos de la toxina y los determinantes antigénicos de la misma.

La presente investigación tuvo por objeto la síntesis química de péptidos correspondientes a la secuencia de la toxina II-9.2.2 y la caracterización inmunológica de los mismos, para tratar de encontrar los determinantes antigénicos más importantes de la molécula, que induzcan la producción de anticuerpos que reconozcan a la toxina nativa y la neutralicen.

En este trabajo se describe la síntesis, purificación y caracterización química de 12 péptidos de la secuencia de la toxina II-9.2.2. Siete de ellos que corresponden a los aminoácidos de posición 1-10, 1-14, 1-14 modificado, 1-27, 22-36, 30-40, 61-65C2 fueron caracterizados inmunológicamente mediante la obtención de sueros antipéptido por la inyección de los péptidos solos o acoplados a una proteína acarreadora en ratones CD1.

La caracterización inmunológica consistió: 1) Determinación de la reactividad y título de los sueros antipéptido contra el péptido solo o acoplado a un acarreador diferente con el que se inmunizó. 2) Determinación de la reactividad y titulación de los sueros antipéptido que contienen anticuerpos que reconocen a la toxina II-9.2.2. 3) Pruebas de neutralización de la toxina II-9.2.2 por los anticuerpos antipéptido en terceros ratones. 4) Desafío directo de los ratones inmunizados con la toxina II-9.2.2.

Los resultados indican que los péptidos del extremo amino de la toxina II-9.2.2 (aminoácidos 1-14V, 1-14N, 1-27T, 1-27S) inducen anticuerpos que reconocen a la toxina nativa.

Por otra parte se puede observar que el reconocimiento de los anticuerpos antipéptido a la toxina nativa incrementa conforme aumenta el número de aminoácidos de la cadena peptídica.

Sin embargo a pesar de que los anticuerpos antipéptido de la región amino terminal reconocen a la toxina nativa no son capaces de neutralizarla en experimentos de neutralización en terceros así como en el desafío directo de los ratones inmunizados. Así mismo, nuestros datos sugieren que los epitopes neutralizantes posiblemente sean conformacionales.

SUMMARY

The venom from the Mexican scorpion Centruroides noxius contains a series of toxic peptides that affect ion channels of excitable membranes. Among these peptides is toxin II-9.2.2, a 65 amino acid residues long, extremely toxic to mammals (LD50 = 125 ng/20 g mouse weight, strain CD1) and a potent Na⁺ channel blocker.

This thesis describes the chemical synthesis of 12 peptides corresponding to the amino acid sequence of toxin II-9.2.2. Seven of them (fragments at position 1-10, 1-14, 1-14 modified, 1-27, 22-36, 30-40, 61-65C2) were synthesized, purified by high performance liquid chromatography and injected into mice (coupled to thyroglobulin) in order to: i) determine their immunological properties with respect to the synthetic peptides; ii) determine their reactivity and titre towards the native toxin II-9.2.2; iii) verify the neutralizing capacity of the sera anti-synthetic peptides incubated with native toxin and injected into non immunized mice; and iv) to challenge in vivo the immunized mice (against synthetic peptides) with native toxin II-9.2.2. Some of the relevant results indicate that the fragments corresponding to the N-terminal part of the toxin (synthetic peptides 1-14, 1-14 modified and 1-27) are capable of recognizing native toxin, the longest peptide has more affinity for toxin II-9.2.2, but none of them produce neutralizing antibodies. Furthermore, it is suggested that possible neutralizing antibodies should correspond to conformational epitopes of the toxin.

Abreviaciones utilizadas en este trabajo

Aa	aminoácido
BSA	albúmina sérica bovina
C18	octadecil
DCC	díciclohexil-carbodiimida
DCU	dícidourea
DL50	dosis letal media
ELISA	ensayo inmunoenzimático
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
IgG	inmunoglobulinas
IgG	inmunoglobulina G
mg	miligramos
mL	mililitro
mM	milimolar
mbc	mínimo cambio de bases
PBS	amortiguador de fosfatos salino
RAM-POD	rabbit anti-mouse peroxidase
TFA	ácido trifluoroacético
µg	microgramos
µM	micromolar

CODIGO DE UNA LETRA PARA AMINOACIDOS

A	alanina
C	cisteína
D	ácido aspártico
E	ácido glutámico
F	fenilalanina
G	glicina
H	histidina
I	isoleucina
K	lisina
L	leucina
M	metionina
N	asparagina
P	prolina
Q	glutamina
R	arginina
S	serina
T	treonina
V	valina
W	triptofano

CONTENIDO

I.- INTRODUCCION

1. Generalidades	7
2. Toxinas del veneno de alacranes	9
3. La toxina II-9.2.2 del veneno del alacrán <i>Centruroides noxius</i> Hoffmann.	11
4. Aspectos inmunológicos de los venenos y toxinas de alacranes.	12
5. Antecedentes de nuestro laboratorio.	18
6. Objetivos de la tesis	19

II.-MATERIALES Y METODOS

1. Síntesis química de péptidos	21
2. Acoplamiento	21
3. Desprotección	21
4. purificación de péptidos	22
5. Análisis de aminoácidos	22
6. Acoplamiento de péptidos a proteínas acarreadoras	23
7. Protocolo de inmunización	23
8. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	23
9. Titulación de sueros antipéptido	24
10.Obtención de inmunoglobulinas de ratón	25
11.Preparación de conjugado, inmunoglobulina de conejo-anti-inmunoglobulina de ratón-peroxidasa.	25
12.Determinación de la dosis letal media (DL50) de la toxina II-9.2.2	26
13.Ensayo de neutralización en terceros	26
14.Desafío de ratones inmunizados.	26

III.- RESULTADOS

1. Síntesis y purificación de péptidos	27
2. Caracterización inmunológica de péptidos	35
a) Obtención de anticuerpos antipéptido	35
b) Titulación de sueros antipéptido	38
c) Reconocimiento de la toxina nativa	38
3. Pruebas de neutralización de la toxina II-9.2.2 por anticuerpos antipéptido	43
4. Desafío <u>in vivo</u> de ratones inmunizados	43

IV.-DISCUSION

1. Síntesis, purificación y caracterización de péptidos correspondientes a la toxina II-9.2.2	43
2. obtención y caracterización de anticuerpos antipéptido sintético	52
3. Desafío de ratones con suero inmune antipéptido y desafío <u>in vivo</u> con toxina nativa.	55
4. Conclusiones	58

V.-Bibliografía.	60
-----------------------	----

I. INTRODUCCION

1.-Generalidades

En el mundo los accidentes por picadura y mordedura de animales ponzoñosos son todavía frecuentes. En nuestro país la mortalidad más elevada en éste campo es debido a la picadura de alacranes (Alagón, A., Lopez, Acuña., Dehesa, M. 1979).

Los alacranes fueron de los primeros artrópodos que invadieron el hábitat terrestre. Los alacranes de importancia médica se encuentran distribuidos en el viejo y nuevo mundo, en cuanto al primero se localizan en Africa, Medio Oriente e India, en cuanto al segundo se distribuyen en el sur de Estados Unidos, México y América del Sur.

El problema del escorpionismo en México ha sido revisado extensamente encontrándose que los estados más afectados son: Colima, Guerrero, Nayarit y Morelos (Hoffman, 1932; Mazzotti y Bravo-Becherella, 1963).

De las 19 especies del género Centruroides citados por Stahnke y Calos, 1977, para México, 6 son de importancia médica: C. suffusus denominado alacrán de Durango el cual presenta 2 subespecies, C. suffusus suffusus reportado en el sur de Durango, noreste de Zacatecas y este de Sinaloa y C. suffusus chiaravigli distribuido al norte de la mesa central; C. noxius conocido como el alacrán de Nayarit se le ha reportado en Nayarit y sureste de Sinaloa; el C. limpidus conocido como el alacrán de Guerrero, presenta 2 subespecies, C. limpidus limpidus distribuido en la región central del estado de Guerrero sureste de Puebla, Morelos, sureste

del estado de México y sureste de Michoacán, y C. limpidus tecomanus conocido como alacrán de Colima localizado en Colima unicamente; C. elegans con 2 subespecies, C. elegans elegans que habita en el estado de Jalisco y áreas costeras de Nayarit, Sinaloa, Guerrero, Oaxaca y C. elegans insularis distribuido en las Islas Marias; C. infamatus que habita en el centro del país, desde el sur de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Michoacán, Jalisco y una porción de Xalapa en el estado de Veracruz y presenta 2 subespecies C. infamatus infamatus y C. infamatus ornatus; y finalmente C. sculpuratus el cual se localiza al sur de Arizona y norte de Sinaloa. Cabe mencionar al C. margaritatus por su amplia distribución en todo el país aunque no es tan venenoso como las otras especies mencionadas.

En general el veneno de los alacranes es de apariencia lechosa opalescente y con un pH de alrededor de 7 y en el laboratorio es obtenido por estimulación eléctrica del telson del alacrán.

El veneno 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 inorgánicas y aminoácidos libres.

2.-Toxinas del veneno de alacranes

Las toxinas de alacrán constituyen familias de proteínas básicas que son responsables del efecto neurotóxico del veneno (Rochat, et al. 1979; Catteral, 1980). Ellas generalmente están compuestas de 60-70 aminoácidos (Aa) y tienen 6 ó 8 cisteínas que forman 3 ó 4 puentes disulfuro.

Las neurotoxinas producen la depolarización de las membranas uniéndose a canales iónicos de las membranas excitables (Catteral, 1980). Dos mecanismos diferentes de acción han sido propuestos para esas pequeñas proteínas: las toxinas de alacrán del viejo mundo actúan afectando el mecanismo de inactivación del canal de sodio mientras que las toxinas de alacranes del nuevo mundo específicamente toxinas del alacrán Centruroides afectan el proceso de activación del canal de sodio (Cahalan, 1975). Sobre estas diferencias Jover, et al. (1980) ha propuesto el nombre de toxinas alfa a las toxinas de alacranes del viejo mundo y toxinas beta a las del nuevo mundo. Más recientemente se ha demostrado que venenos de alacranes del nuevo mundo también poseen toxinas del tipo alfa (Meves, et al. 1986., Yatani, et al. 1988., Kirsch, et al. 1989). Asimismo se ha descubierto una nueva familia de toxinas de alacranes que bloquean a canales de potasio de membranas excitables (Carbone, et al. 1981; Possani, et al. 1982; Miller, et al. 1984).

Rochat, et al. 1970 clasificó a las toxinas de alacrán que afectan a canales de sodio de mamíferos en 5 grupos siguiendo las homologías de sus secuencias y composición de aminoácidos; las secuencias fueron alineadas con respecto a las cisteínas. Estudios inmunológicos soportan esta clasificación. El antisuero preparado

contra una de las toxinas de un grupo dado puede reaccionar con toxinas del mismo grupo pero puede dar resultados negativos cuando es ensayada con toxinas de otro grupo (Delon, et al. 1981). Toxinas de insectos y otras moléculas más pequeñas fueron clasificadas separadamente (Rochat, et al. 1979).

Possani, et al. (1985) propusieron una clasificación de las toxinas del veneno de alacranes basada en el método más riguroso del análisis métrico lo cual ha permitido dividir estas toxinas en 5 grupos con diferencias de 30 mbc (cambio mínimo de bases) configurando 3 poblaciones estructurales distintas de toxinas de alacranes. Por un lado las toxinas del veneno de alacranes del continente Norteamericano que presentan toxinas con deleciones de aminoácidos en la región C-terminal, cuando éstas son comparadas con la secuencia de aminoácidos de las toxinas de alacranes del viejo mundo, que presentan ausencias de aminoácidos en la región N-terminal. Los alacranes sudamericanos poseen toxinas con ambos tipos estructurales presentando deleciones tanto en la región amino-terminal como carboxilo-terminal.

Actualmente se están utilizando algunas de estas toxinas como nuevas herramientas bioquímicas para ayudar a esclarecer el funcionamiento del sistema nervioso y de las membranas celulares.

Así mismo ha aumentado el interés sobre la problemática del envenenamiento por picadura de alacrán debido a que ocasiona serios trastornos en la salud que pueden llevar inclusive hasta la muerte, sobre todo en menores de edad (Dehesa, 1989).

3.-La toxina II-9.2.2 del veneno del alacrán Centruroides noxius Hoffmann

Como mencionamos en el inciso de las generalidades uno de los alacranes peligrosos de la República Mexicana es el Centruroides noxius Hoffmann, también conocido por el nombre de alacrán de Nayarit. En realidad, éste alacrán posee el veneno más potente de los alacranes mexicanos (Dent, et al. 1979). La dosis letal media es de 5 ug/20 g de peso corporal de ratón (veneno total). El veneno de este alacrán ha sido estudiado extensivamente por el grupo del Dr. Possani (Dent et al. 1982; Possani, et al. 1981, 1982; Carbone, et al. 1982; Possani, et al. 1984, 1985). Entre los hallazgos más importantes de los trabajos arriba mencionados está el hecho de que este veneno contiene por lo menos dos familias de péptidos tóxicos: a) cadena larga con cerca de 65 aminoácidos que bloquean a canales de sodio, como la toxina II-9.2.2, II-10, II-13 y II-14; y b) cadena corta de cerca de 39 aminoácidos como la noxiustoxina, primera toxina descrita con propiedades bloqueadoras de canales de potasio (Carbone, et al. 1982, Possani, et al. 1982).

El componente más importante en cuanto a cantidad en el veneno y uno de los más tóxicos es la II-9.2.2 (Zamudio, 1989).

Esta toxina contiene 66 aminoácidos y está estabilizada por 4 puentes disulfuro. Es una toxina que reconoce a canales de sodio de membranas excitables (Sitges, et al. 1986). Su dosis letal media es del orden de 125 ng/20 g de peso corporal. Se han obtenido 6 anticuerpos monoclonales que reconocen a esta toxina (Zamudio, 1989). Por ser una de las toxinas más importantes del veneno del alacrán de Nayarit, y una de las mejores estudiadas elegimos esta como modelo para los estudios objeto de esta tesis, como lo mencionaremos más adelante.

4.-Aspectos Inmunológicos de los venenos y toxinas de alacranes

Hasta el momento el mejor antídoto que se ha utilizado para contrarrestar los efectos del veneno de los alacranes es utilizando un antisuero el cual se produce en caballos por la inyección de pequeñas cantidades de una mezcla de venenos de varias especies de alacranes.

Este suero antialacrán es una mezcla de anticuerpos policlonales en donde se encuentran una gran variedad de diferentes anticuerpos (Acs) que están dirigidos contra los diferentes determinantes antigénicos de las toxinas presentes en la mezcla.

Para aumentar la calidad y especificidad de los sueros (Delori, et al. 1981), diseñaron una estrategia en donde los sueros fueron producidos a partir de una mezcla de toxinas purificadas y específicas para mamíferos. Al comparar la capacidad neutralizante de estos nuevos sueros provenientes de la proteína purificada contra los obtenidos tradicionalmente se encontró una notable diferencia con una mayor capacidad neutralizante de los sueros obtenidos a partir de toxinas purificadas.

Actualmente se están tratando de encontrar los determinantes antigénicos más importantes en estas proteínas o aún el determinante antigénico involucrado en la actividad biológica (sitio activo) de estas toxinas, para posteriormente producir anticuerpos específicos contra esta región y de esta manera obtener sueros de mayor calidad que no contengan una mezcla muy grande de anticuerpos inespecíficos que reduzcan la calidad y eficiencia del antisuero.

Esto ha sido posible gracias, por un lado a las nuevas técnicas y métodos de

purificación, secuenciación de proteínas y de las técnicas de clonación y secuenciación de DNA. El uso conjunto de estas metodologías ha permitido obtener información útil en el diseño y síntesis de fragmentos de estas macromoléculas para su posterior estudio farmacológico e inmunológico (Aron, 1986).

Actualmente se encuentran disponibles secuencias primarias de muchas proteínas, facilitando así la síntesis de cualquier región seleccionada usando técnicas químicas de laboratorio como la de síntesis en fase sólida de Merrifield (1963) para la síntesis de péptidos ó de procedimientos de ingeniería genética en el caso de segmentos de proteína largas, subunidades o aún toda la proteína. Sin embargo, la técnica sintética puede permitir la selección de un acarreador así como un adyuvante en donde el objetivo es la producción de una vacuna multivalente (Aron, 1986).

A pesar de los grandes avances de la ciencia es difícil alcanzar este objetivo ya que los antígenos (Ag) macromoleculares usualmente expresan un número grande de posibles determinantes antigénicos o epítopes de los cuales únicamente un número limitado de estos son potencialmente importantes para la inmunogenicidad, denominados sitios inmunodominantes. (Aron, 1986).

Es importante distinguir que existen 2 tipos de epítopes: secuenciales y conformacionales. Un epítope secuencial es definido como una secuencia de diversos residuos en su forma no plegada. Un epítope conformacional es definido por un número de residuos de aminoácidos que mantiene una conformación particular, en donde contribuyen a mantener dicha estructura interacciones de alto rango del nivel de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria (Sela, 1969).

Una clasificación paralela introducida por Atassi y Smith (1978) es la de determinantes continuos y discontinuos. Un determinante continuo es definido como una secuencia de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie de una proteína nativa mientras un determinante discontinuo consiste en la yuxtaposición en espacio de residuos de aminoácidos que no son adyacentes en la estructura primaria, pero que forman parte de un epítope.

Se ha encontrado que los parámetros que influyen las propiedades inmunológicas de las diferentes regiones de una proteína son: la conformación espacial y la accesibilidad de los aminoácidos (Shinnick, 1983; Arnon, 1986).

La accesibilidad es crucial puesto que la interacción de un epítope con los anticuerpos ó receptores específicos sobre las células inmunocompetentes necesita su exposición sobre la molécula antigénica.

Se conoce ampliamente que la conformación espacial juega un papel decisivo determinando la especificidad antigénica.

Existe evidencia de que un cambio drástico en propiedades antigénicas ocurren por desnaturalización de la proteína nativa ó desdoblamiento de sus cadenas polipeptídicas. Esto ha llevado a la conclusión de que muchos de los determinantes antigénicos de las proteínas son determinantes conformacionales. Anticuerpos hacia tales determinantes pueden reaccionar con péptidos aislados derivados de la molécula nativa lo cual puede ser atribuido al hecho de que la flexibilidad de los péptidos en solución pueden mimetizar el desorden local en segmentos cortos de la proteína. (Arnon, 1986., Shinnick, 1983., Walter, 1986).

Existen varias estrategias para tratar de encontrar los determinantes antigénicos de una proteína, por ejemplo: a) por fragmentación de la proteína por proteólisis controlada o ruptura química. Los fragmentos resultantes son entonces seleccionados por sus componentes biológicamente activos que puedan unirse a anticuerpos y que interfieren con su interacción con el antígeno intacto. b) estudios cristalográficos de la estructura tridimensional de la proteína sirven como una fuente adicional de información en la determinación de la estructura antigénica.

Varios modelos computacionales han sido sugeridos para analizar la hidrofobicidad o flexibilidad de las diferentes regiones en una molécula para determinar los posibles determinantes antigénicos (Hopp and Woods, 1981; Karplus and Schultz, 1985).

Anticuerpos contra péptidos cortos químicamente sintetizados son de gran uso en la detección de proteínas y el estudio de su estructura. La alta frecuencia con la cual estos anticuerpos reaccionan con la proteína intacta ha sugerido diversas especulaciones interesantes. Una de ellas analiza la diferencia entre anticuerpos hechos contra proteínas intactas y anticuerpos antipéptidos. La preparación de anticuerpos antiproteína involucra inyección de uno de los estados conformacionalmente más restringidos de la molécula, por lo tanto cuando los anticuerpos resultantes son probados para ver su reactividad contra proteína o péptidos, es en un estado de igual o menor orden. La unión de estos anticuerpos es por lo tanto sensitivo a perturbaciones de la estructura protéica tales como fragmentación y desnaturalización. Contrariamente, anticuerpos antipéptido son hechos contra un sitio de la proteína conformacionalmente menos restringida y probados contra una molécula protéica la cual es casi siempre más ordenada. En conclusión anticuerpos a péptidos cortos y flexibles frecuentemente reaccionan con moléculas más ordenadas

y anticuerpos antiproteína difícilmente reaccionan con péptidos (Tainer, *et al.* 1984). Un método nuevo para identificar epitopes que reaccionan cruzadamente con antígenos particulares, fué sugerido por Geysen, *et al.* (1984). Esta estrategia para identificar determinantes antigénicos secuenciales en una proteína involucra la síntesis sistemática de todos los posibles heptapéptidos y la medición de su reactividad con anticuerpos contra la proteína nativa. Los epitopes con más reactividad presumiblemente contienen epitopes secuenciales (Geysen, *et al.* 1984).

Una alternativa diferente consiste en tener un anticuerpo monoclonal en contra de una proteína nativa e intentar por síntesis sistemática de todos los péptidos cortos posibles alguno que tenga la propiedad más alta de unión. Tal péptido puede parecerse poco ó aún tener ninguna relación directa con el epítpe original, pero que mimetiza su habilidad para unirse específicamente al anticuerpo y es llamado "mimétope" (Geysen, *et al.* 1986).

El paso más difícil e importante en la producción de anticuerpos antipéptido, es la selección de una región de la secuencia de aminoácidos de la proteína que de lugar a anticuerpos los cuales reaccionen tanto con la proteína nativa como desnaturalizada (Walter, 1986).

El primer punto a considerar es que la secuencia seleccionada debe estar localizada en la superficie de la molécula proteica. De esta manera se debe tratar de encontrar las regiones que estén compuestas principalmente de residuos de aminoácidos polares ya que este tipo de aminoácidos predominantemente se localizan sobre la superficie de la molécula la cual hace contacto con el medio

acuoso, mientras que los residuos hidrofóbicos se sitúan en la parte interna de la misma (Kauzman, 1959).

Diversos reportes por Lerner y colaboradores (1984) sugieren que anticuerpos pueden ser fácilmente levantados en contra de casi cualquier parte de la proteína usando péptidos sintéticos como inmunógenos.

Green, *et al.* 1982, produjeron anticuerpos contra 20 péptidos correspondientes a un 75% de la secuencia de la hemaglutinina del virus de la influenza y encontraron que anticuerpos contra 18 de los 20 péptidos reaccionaron con la hemaglutinina nativa.

En cuanto a las toxinas de alacrán, a pesar de que son proteínas muy pequeñas no se ha podido determinar en donde está situado el sitio antigénico que está involucrado en el mecanismo de neutralización de la toxina. Al parecer esto es debido a que son proteínas con una estructura muy compacta.

Bahraoui, *et al.* 1988, obtuvieron 2 anticuerpos monoclonales (4c1 y 3c5) neutralizantes en contra de la toxina AaHII del alacrán Androctonus australis Hector. El anticuerpo 4c1 tiene una afinidad hacia la toxina de 0.8 nM y el 3c5 de 0.6 nM. El anticuerpo 4c1 no es capaz de reconocer a la toxina AaHII reducida y metilada ni tampoco péptidos sintéticos de AaHII. Esto muestra que el anticuerpo 4c1 parece estar dirigido contra un epítipo discontinuo cuya inmunoreactividad depende de la conformación nativa de la toxina. Asimismo, la supresión de la carga positiva de la lisina 58 da como consecuencia una toxina modificada sin ningún cambio conformacional mayor pero con un decremento considerable del 99.95 % en su reactividad hacia el anticuerpo 4c1. Si la modificación no cambia la carga eléctrica del residuo 58, su antigenicidad es retenida totalmente y su actividad biológica disminuye en un

99%. Esto claramente muestra que el epítoto requiere la presencia de una carga positiva para alcanzar una alta afinidad hacia el parátoto del anticuerpo 4c1.

En conclusión al parecer los residuos 54 ó 64 por una parte y los residuos 10, 51 y 64 por otra contribuyen a la definición del epítoto reconocido por el anticuerpo 4c1.

5.-Antecedentes de nuestro laboratorio

En el laboratorio en el cual efectué mi trabajo de tesis ya se han trabajado algunos aspectos inmunológicos de las toxinas del veneno de alacranes, incluyendo el Centruroides noxius.

El énfasis mayor ha sido dirigido hacia la síntesis química de péptidos que corresponden a fragmentos de 9 a 39 residuos de aminoácidos de la noxiustoxina (Gurrola, et al., 1989). En este trabajo se determinó que el nonapéptido N-terminal es tóxico per se, mientras que otros segmentos hacia el carboxilo terminal son inmunogénicos y no tóxicos. El trabajo de tesis de Luis Vaca (1989) versó sobre la síntesis de todos los dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y hexapéptidos correspondientes a la noxiustoxina. Como se mencionará más adelante este trabajo marcó la pauta para decidir el tamaño de los péptidos sintéticos de toxinas de alacranes que son inmunogénicamente competentes. Finalmente en la tesis de Fernando Zamudio (1989), se describe la obtención de un grupo de híbridomas (seis) productoras de anticuerpos monoclonales en contra de la toxina II-9.2.2 del veneno del alacrán C. noxius.

6.- Objetivos de la tesis

La importancia de lo que parece ser un trabajo repetitivo que parece perder originalidad por tratarse de la purificación y caracterización de cientos de toxinas similares del veneno del mismo tipo de animales toma sentido cuando comparamos su estructura y la correlacionamos con alguna de sus actividades biológicas principales. Algunas de las preguntas interesantes que surgen al trabajar con este tipo de péptidos son por ejemplo: a) ¿porqué los alacranes han seleccionado y conservado durante su evolución muchas moléculas (péptidos) diferentes con funciones similares? b) ¿cuáles son las características conservativas de la estructura primaria que determina su actividad sobre membranas excitables? c) ¿cuáles son las regiones variables que posiblemente definen la especificidad de especie? d) ¿algunas de esas toxinas se originan desde un precursor común? (Possani, 1984) e) ¿cuales son las regiones de la estructura de las toxinas involucradas en la toxicidad y/o inmunogenicidad de estos péptidos?.

Estas son algunas de las preguntas generales que se pretende responder en el laboratorio en donde realicé mi tesis.

Dentro de este contexto, los objetivos particulares de esta tesis fueron:

- 1.-La síntesis química por el método de fase sólida de Merrifield, de péptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de la toxina II-9.2.2 del alacrán Centruroides noxius Hoffmann, tomada como péptido modelo.
- 2.-Purificación y caracterización inmunológica de los péptidos sintetizados.
- 3.-Utilización de los péptidos sintéticos, solos o acoplados a acarreadores, para la generación de anticuerpos policlonales en animales experimentales (ratón).

4.-Caracterización de los anticuerpos obtenidos de ratones inmunizados con los péptidos.

5.-Desafío con toxina II-9.2.2 nativa de ratones pre-inmunizados en contra de péptidos sintéticos.

Como se observa los objetivos específicos de este trabajo de tesis solo ambicionan responder parte de una de las preguntas del laboratorio.

Así mismo, como discutiremos en la sección de los resultados, solo conseguimos responder parcialmente la pregunta de los posibles epítopes de la toxina II-9.2.2, confirmando que más probablemente los epítopes que pueden generar anticuerpos neutralizantes están en la región N-terminal de la molécula y posiblemente son del tipo conformacional.

II. MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos utilizados para este trabajo fueron grado analítico obtenidos de las fuentes indicadas (Gurrola, *et al.*, 1989). El agua utilizada fué bidestilada en cuarzo en el laboratorio.

1. Síntesis química de péptidos

Los péptidos se sintetizaron siguiendo el método descrito por Merrifield, para la síntesis química de péptidos en fase sólida utilizando procedimientos manuales. (Merrifield, *et al.*, 1963., Mitchell, *et al.*, 1978). Todos los N-ter-butiloxicarbonil aminoácidos (Boc-aminoácidos) y los ter-Boc-aminoácidos-Resinas (poliestireno derivatizado con grupos químicos reactivos aminados o halogenados) fueron adquiridos de Península Corporation (California, USA).

2. Acoplamiento

Las reacciones de acoplamiento fueron llevadas a cabo con 3 excesos molares de t-Boc-aminoácido y dicitclohexilcarbodiimida (DCC) ésta última como agente acoplante, hidroxibenzotriazol como agente antirracemizante, diclorometano, 2-propanol y dimetilformamida como solventes.

3. Desprotección

La remoción de los grupos protectores (t-Boc) de los aminoácidos se llevó a cabo con ácido trifluoroacético al 50% en diclorometano por espacio de 30 minutos en

agitación.

Cada uno de los pasos de desprotección y de acoplamiento fueron monitoreados por medio de la prueba de ninhidrina (Sarin, *et al.* 1984). y el ciclo de acoplamiento fué repetido hasta que la prueba de ninhidrina fuera negativa.

Los péptidos sintetizados fueron separados de la resina por tratamiento drástico con ácido fluorhídrico (HF)(10 mL de HF/g de péptido-resina) por 30 minutos a 4 °C usando anisol (1 mL/g de péptido-resina). Posterior a la ruptura, la mezcla de péptido resina fué lavada con 30 mL de eter y finalmente el péptido fué extraído con ácido acético al 5%. El material obtenido fué liofilizado y guardado a -20 °C hasta su utilización.

4.Purificación de péptidos

Los péptidos fueron purificados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) a través de una columna de fase reversa C18 usando un gradiente lineal de 0 a 60 % de acetonitrilo en 60 minutos, la fase móvil para equilibrar la columna fué 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) en agua a un flujo de 1 mL/min en un cromatógrafo líquido de alta presión marca Beckman con un controlador modelo 421A, 2 bombas modelo 114M, un detector de longitud de onda variable UV/VIS modelo 165 y un integrador modelo 427.

5.Análisis de aminoácidos

La composición de aminoácidos de cada uno de los péptidos fué obtenida por análisis de los feniltiocarbamil derivados de los aminoácidos (Brian, *et al.* 1984) después de la hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl) 6 normal a 110 °C por 20 horas.

6. Acoplamiento de péptidos a proteínas acarreadoras

Una cantidad de 2 mg de péptido fué acoplado a 1 mg de albumina sérica bovina (BSA) y tiroglobulina bovina usando 13 mg de agente acoplante (1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocioruro soluble en agua), disuelto en agua. La mezcla se dejó reaccionar por 2 horas con agitación a temperatura ambiente y la reacción se terminó por diálisis contra agua por 24 horas.

7. Protocolo de inmunización

Grupos de 5 ratones hembras (cepa CD1) de 4 semanas de edad fueron inmunizadas subcutáneamente en el lomo con los péptidos sólo ó acoplados a un acarreador (100 µg/ratón). La primera inmunización se realizó con adyuvante completo de Freund e inmunizaciones posteriores cada 15 días con adyuvante incompleto.

Los ratones fueron sangrados cortandoles la punta de la cola después de la tercera inmunización. De la sangre obtenida se separó el suero el cual fué congelado a -20 °C hasta su utilización.

8. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

Reactividad de sueros antipéptido

Placas de vinilo de 96 pozos (Costar 2596) fueron recubiertas con péptido, péptido acoplado a un acarreador (BSA) diferente con el que se inmunizó ó toxina II-9.2.2 (100 µL de una solución de péptido de 50 µg/mL, 100 µL de una solución de conjugado de 5 µg/mL ó 100 µL de una solución de toxina de 3 µg/mL) en amortiguador de bicarbonato de sodio 20 mM pH 9.4. Se saturó la placa con 150 µL de

una solución de 1 % de BSA por 4 horas a temperatura ambiente. Los sueros fueron diluidos (1:50 ó 1:100 veces) en una solución de amortiguador de fosfato salino 20 mM pH 7.8 (PBS). Se colocaron 100 μ L de cada dilución del suero en los pozos correspondientes y se dejó reaccionar por 2 horas a 4 $^{\circ}$ C. Se lavó la placa 5 veces con PBS 20 mM pH 7.8 + 0.1 % de Tween-20, se añadió 100 μ L por pozo del segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (IgG de conejo anti-ratón) dejándolo reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente.

La placa se lavó 5 veces con PBS + 0.1 % de Tween-20 y se reveló con una solución de ortofenilendiamina (0.4 mg/mL con 0.4% de peróxido de hidrógeno). Se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (BIO-RAD 2550). Como control negativo se utilizó suero normal de ratón.

9. Titulación de sueros antipéptido

La determinación del título de los diferentes sueros antipéptido se realizó por el método de Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) adheriendo a la placa una cantidad constante de péptido, (100 μ L de una solución de 50 μ g/mL), péptido acoplado a un acarreador diferente con que se inmunizó, (100 μ L de una solución de 5 μ g/mL) ó toxina nativa II-9.2.2, (100 μ L de una solución de 3 μ g/mL) y las diluciones seriadas de los sueros antipéptido desde 1:50 hasta 1:6400. El título se determinó como la dilución del suero que produjo al menos la mitad de la absorbancia máxima. Como control negativo se utilizó suero normal de ratón.

10. Obtención de inmunoglobulinas de ratón.

Para la obtención de inmunoglobulinas se siguió el método de Garvey. (1977).

Se sangraron 50 ratones de la cepa CD1 de aproximadamente 30 g para obtener el suero correspondiente.

Las inmunoglobulinas se precipitaron con sulfato de amonio al 35% de saturación. Se centrifugó a 10,000 g y la pastilla obtenida se resuspendió en el mínimo volumen de amortiguador tris-HCl 25 mM, NaCl 80 mM, pH 7.95. Se dializó con 4 cambios de 600 mL del amortiguador anterior y al término de la diálisis se centrifugó a 10,000 g eliminando el precipitado obtenido. El sobrenadante se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (30 cm de largo x 1 cm de diámetro interno) utilizando como eluyente amortiguador de Tris-HCl 25 mM, NaCl 80 mM pH 7.95.

11. Preparación de conjugado, Inmunoglobulina de conejo-anti-Inmunoglobulina de ratón-peroxidasa (RAM-POD).

Para la obtención del conjugado (RAM-POD), se siguió el método de Nakame, (1979). Se disolvieron 5 mg de peroxidasa de rábano en 1 mL de amortiguador de carbonato de sodio 300 mM pH 8.1 recién preparado. Se añadieron 100 μ L de solución de dinitrofluorobenceno al 1% en etanol. Se dejó agitando suavemente durante 1 hora en la oscuridad y se añadió 1 mL de solución de periodato de sodio 0.08 M. Se mezcló suavemente por 30 minutos y se agregó 1 mL de etilenglicol 0.16 M dejando una hora en agitación suave en la oscuridad. Se dializó contra 1 litro de amortiguador de carbonato 0.01 M pH 9.5 con tres cambios. Y se añadió 7.5 mg de anticuerpo de conejo anti-ratón purificado y se dejó en agitación suave durante 3 horas. Se dializó contra un amortiguador de fosfatos pH 7.5 y se

diluyó a 200 µg/mL de proteína en PBS pH 7.8 y albumina sérica bovina al 1%, se guardó en la oscuridad a -20 °C.

12. Determinación de la dosis letal media (DL50) de la toxina II-9.2.2

La determinación se realizó inyectando por vía intraperitoneal, en ratones de la cepa CD1, diferentes dosis de toxina (1 µg, 0.5 µg, 0.25 µg, 0.125 µg y 0.065 µg por cada 20 gramos de ratón utilizando 10 ratones por dosis). Se graficó el porcentaje de ratones muertos en función del logaritmo de la concentración de toxina y se determinó el punto obtenido al 50 % (DL50).

13. Ensayos de neutralización en terceros

Grupos de 10 ratones de la cepa CD1 fueron inyectados intraperitonealmente con una mezcla de 200 µL de suero antipéptido que contenía una DL50 de toxina II-9.2.2 previamente incubados a 37 °C por 1 hr con agitación. Los ratones fueron mantenidos en observación por 1 semana.

14. Desafío de ratones inmunizados.

Diez días después del último refuerzo con el péptido cada grupo de ratones fue desafiado con 1 LD50 de toxina nativa.

La inyección fue realizada intraperitonealmente. Como control se inyectaron ratones no inmunizados con la misma cantidad de toxina para comparar la sintomatología de los animales inmunizados.

Los ratones fueron mantenidos en observación durante 15 días.

RESULTADOS

1.- Síntesis y purificación de péptidos

Antes de iniciar la descripción de los resultados obtenidos es oportuno mencionar cuales fueron los criterios utilizados para la selección de los fragmentos peptídicos correspondientes a la toxina II-9.2.2 (Tabla 1). El criterio que prevaleció fué un criterio lógico y experimental, basado en resultados previos del laboratorio obtenidos con la noxiustoxina (Gurrola, 1989., Vaca, 1988).

El primer criterio consistió en seleccionar secuencias sobrelapadas que comprendieran prácticamente toda la estructura primaria de la toxina II-9.2.2.

En segundo lugar el tamaño de los péptidos en cuanto al número de residuos de aminoácidos deberían ser igual ó superior a seis, debido a los resultados previos de la tesis de Luis Vaca, los cuales indicaban que solamente péptidos iguales ó superiores a esta longitud de cadena podían desplazar de forma efectiva el pegado de la noxiustoxina a anticuerpos monoclonales.

Tercero, la región N-terminal había sido demostrada ser el sitio tóxico de la noxiustoxina (Gurrola, 1989) y por lo tanto esta región debería recibir mayor atención. Por otro lado, la región comprendida entre los residuos 50-60 es altamente hidrofóbica. Esto haría muy difícil solubilizar los péptidos para trabajar en solución y por lo tanto, en una primera fase se evitó sintetizar péptidos con esta secuencia de aminoácidos.

TABLA 1: PEPTIDOS CORRESPONDIENTES A LA SECUENCIA DE LA TOXINA II-9.2.2

Péptidos	1	10	20	30	40	50	60	66
II-9.2.2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDNNDYCLRECKQQYKAGGCTCTAFACWCTHLYEQAIWVPLFNKRS							
II-9.2.2 ₁₋₁₀	KEGYLVDKNT							
II-9.2.2 _{1-14V}	K-GTLVDKNTGCKY							
II-9.2.2 _{1-14N}	KEGYLVDKNTGCKY							
II-9.2.2 ₄₋₁₄	YLVDKNTGCKY							
II-9.2.2 ₁₀₋₂₇	TCKYECLKLGDNNDYCLR							
II-9.2.2 ₁₋₂₇	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDNNDYCLR							
II-9.2.2 ₁₇₋₂₅	LKLGDNDYC							
II-9.2.2 ₂₂₋₃₆	NDYCLRECKQQYK							
II-9.2.2 ₃₀₋₄₀	KQQYKAGGCT							
II-9.2.2 ₃₅₋₄₈	KAGGCTAFACW							
II-9.2.2 ₆₁₋₆₅ _{C1}								FNKRS
II-9.2.2 ₆₁₋₆₅ _{C2}								FNKRS

Los péptidos se sintetizaron siguiendo el método reportado por Merrifield, (1963) para la síntesis de péptidos en fase sólida. Los números en los subíndices representan la posición de los aminoácidos en la secuencia de la toxina II-9.2.2. La secuencia del péptido 1-14V carece del ácido glutámico en la posición número 2 por lo que en esta posición se localiza un guión que indica la falta de este aminoácido.

Finalmente, los péptidos sintetizados corresponden al mayor índice de hidrofiliidad, calculado de acuerdo al método de Hoop y Woods (1981), para determinar posibles sitios antigénicos de proteínas.

Con estos criterios se seleccionaron de la secuencia de la toxina II-9.2.2 del aiacrán Centruroides noxius 12 péptidos para su síntesis siguiendo la metodología reportada por Merrifield (1963), para la síntesis de péptidos en fase sólida (Tabla 1). Después de la separación de la resina por tratamiento con HF, los péptidos fueron purificados por cromatografía líquida de alta presión ó alta resolución (HPLC) a nivel analítico y semipreparativo a través de una columna C18 de fase reversa, como se puede ver en los cromatogramas (Fig.1-3).

A excepción del péptido 1-10 y 17-25 en todos los demás obtuvimos un componente cromatográfico principal en HPLC.

Para determinar la pureza de los péptidos sintetizados se determinó la composición de aminoácidos de los péptidos sin purificar así como del pico principal del péptido purificado por HPLC. Como se puede observar en la tabla 2 la composición de aminoácidos obtenido de los péptidos sin purificar es muy cercana a la composición esperada, a excepción del péptido 1-14V al cual le faltó el glutámico 2 por lo cual fue necesario volver a sintetizar este péptido y como se observa el péptido 1-14N si contiene la composición de aminoácidos esperada.

Así mismo como se observa en la tabla 3 la composición de aminoácidos de los picos principales en la purificación por HPLC es muy similar a la composición de aminoácidos esperada.

Estos resultados fueron confirmados por la secuenciación automática del pico principal de algunos de los péptidos sintetizados (1-10, 1-14V, 22-36, 30-40), como

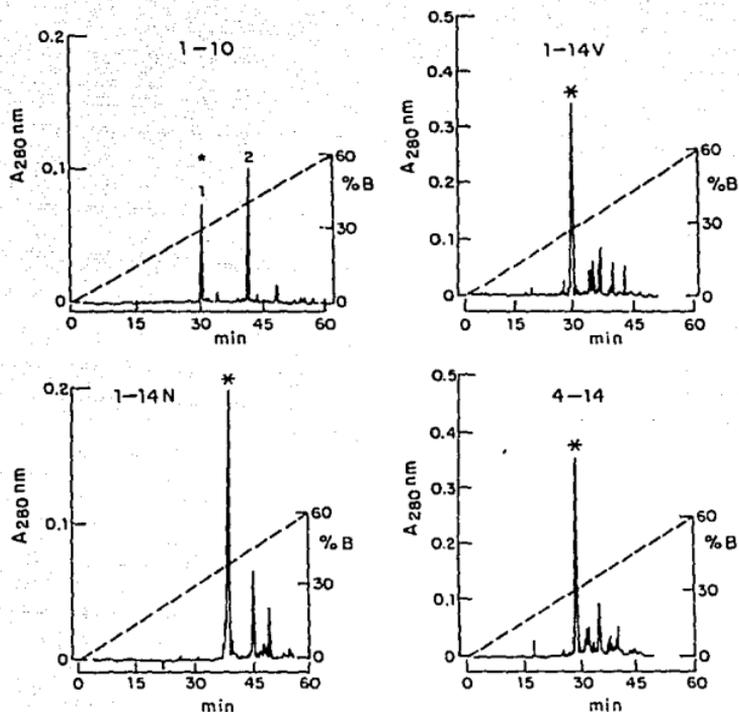


Fig. 1 Purificación por HPLC de los péptidos sintéticos 1-10, 1-14V, 1-14N y 4-14, en una columna de fase reversa C18, aplicándose un gradiente lineal de 0-60% de B en 60 minutos. Fase móvil A: agua con 0.12% de TFA, fase móvil B acetronitrilo con 0.12 de TFA. Se aplicó entre 100 y 250 μ g de cada péptido.
* El asterisco indica el péptido esperado.

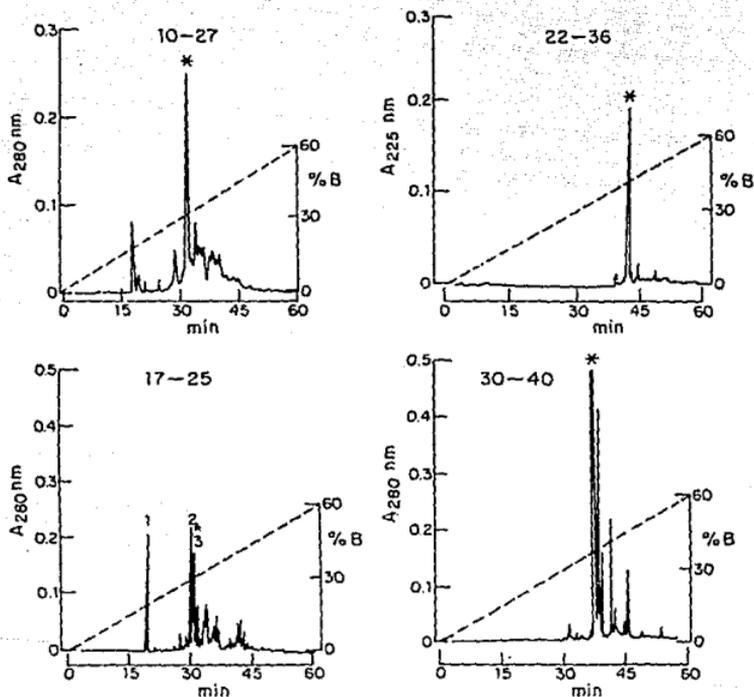


Fig. 2 Purificación por HPLC de los péptidos sintéticos 10-27, 22-36, 17-25 y 30-40, en una columna de fase reversa C18, aplicándose un gradiente lineal de 0-60% de B en 60 minutos. Fase móvil A: agua con 0.12% de TFA, fase móvil B acetoneitrilo con 0.12 de TFA. Se aplicó entre 100 y 250 μg de cada péptido.
* El asterisco indica el péptido esperado.

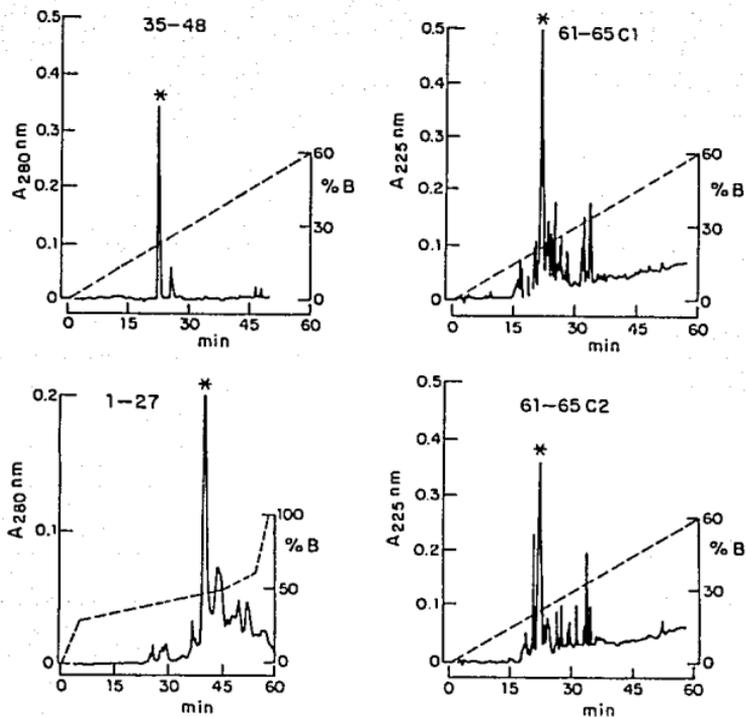


Fig. 3 Purificación por HPLC de los péptidos sintéticos 35-48, 61-65C1, 1-27 y 61-65C2, en una columna de fase reversa C18, aplicándose un gradiente lineal de 0-60% de B en 60 minutos excepto para el péptido 1-27 que fué de 0-30% de B en 5 minutos y de 30-60% de B en 50 minutos. Fase móvil A: agua con 0.1% de TFA, fase móvil B: acetonitrilo con 0.1% de TFA. Se aplicó entre 160 y 750 μ g de cada péptido. *El asterisco indica el péptido esperado.

Tabla 2: Análisis de aminoácidos de los péptidos correspondientes a la secuencia de la toxina II- 9.2.2 del alacrán Centruroides noxius.

Péptido	1-10	1-14M	1-14V	1-27	10-27	22-36	30-40	61-65C1	61-65C2	4-14	17-25	
Aa	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
D	2 1.7	2 2.0	2 1.6	5 5.7	3 3.1	2 1.5	---	1 1.2	1 1.9	2 1.4	3 3.0	
E	1 0.9	1 0.9	1 0.0	2 1.7	1 0.9	3 2.9	2 1.4	---	---	---	---	
S	---	---	---	---	---	---	---	1 1.0	1 0.9	---	---	
G	1 1.0	2 2.4	2 2.2	3 3.7	2 2.8	2 2.6	4 4.6	---	---	1 1.4	1 1.3	
R	---	---	---	1 1.2	1 1.2	1 1.1	---	1 1.0	1 0.9	---	---	
T	1 1.0	1 1.4	1 1.0	1 1.5	1 1.7	---	---	---	---	1 1.4	---	
A	---	---	---	---	---	---	1 1.2	---	---	---	---	
P	---	---	---	---	---	---	---	1 1.3	1 1.1	---	---	
Y	1 0.8	2 1.4	2 1.7	3 2.6	1 1.3	2 1.6	2 1.9	---	---	2 0.4	1 0.3	
V	1 1.0	1 1.0	1 1.1	1 1.0	---	---	---	---	---	1 1.4	---	
C	---	1 0.6	1 0.5	3 2.1	3 1.6	2 1.3	---	1 0.3	1 0.3	1 0.2	1 0.2	
L	1 0.9	1 1.0	1 0.9	4 3.2	3 2.7	1 1.1	---	---	---	1 1.5	2 2.6	
K	2 2.4	3 3.0	3 3.6	4 3.9	2 2.4	2 2.8	2 2.0	1 0.8	1 0.8	2 3.0	1 1.5	

Composición de aminoácidos de los péptidos sintéticos sin purificar obtenida después de la hidrólisis con ácido clorhídrico 6 normal a 110°C por 20 horas.

Aa= aminoácido

E= valor esperado

O=valor obtenido

Tabla 3: Análisis de aminoácidos de los componentes principales de los péptidos purificados por HPLC.

Péptido Aa	1-10		1-14N		1-14V		1-27		10-27		22-36		30-40		61-65C1		61-65C2		4-14		17-25	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
D	2 2.4	2 2.0	2 3.2	5 5.0	3 3.7	2 1.7	---	---	1 1.2	1 1.6	2 2.7	3 3.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	1 0.8	1 1.3	1 0.0	2 1.6	1 0.8	3 2.8	2 1.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 0.9	1 0.9	---	---	---	---	---	---	---	---
G	1 1.2	2 2.7	2 2.0	3 3.5	2 2.5	2 2.0	4 4.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 1.0	1 1.5	---	---	---	---
R	---	---	---	1 1.4	1 1.3	1 1.0	---	---	---	---	---	---	1 0.9	1 1.1	---	---	---	---	---	---	---	---
T	1 1.1	1 1.0	1 1.0	1 1.0	1 1.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 0.8	---	---	---
A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 0.9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 1.7	1 1.3	---	---	---	---	---	---	---
Y	1 0.8	2 1.5	2 1.7	3 2.2	1 1.0	2 1.5	2 1.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2 1.8	1 0.5	---	---
V	1 0.9	1 0.9	1 1.0	1 1.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 1.0	---	---
C	---	1 0.4	1 0.1	3 1.9	3 0.8	2 2.3	---	---	---	---	---	---	---	1 0.1	1 0.1	1 0.3	1 0.2	---	---	---	---	---
L	1 0.6	1 1.1	1 1.0	4 3.7	3 2.7	1 1.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 0.9	2 2.5	---
K	2 2.0	3 2.8	3 3.4	4 5.6	2 2.4	2 2.3	2 2.5	1 1.1	1 1.0	2 2.4	1 0.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Composición de aminoácidos de los componentes principales de los péptidos sintéticos purificados por HPLC obtenidos después de la hidrólisis con ácido clorhídrico 6 normal a 110°C por 20 horas.

Aa= aminoácido

E= valor esperado

O= valor obtenido

se presenta en la tabla 4.

Así mismo en las figuras 1-3 el asterisco arriba del componente cromatográfico del perfil de HPLC indica la posición del péptido esperado.

Debido a problemas de solubilidad el péptido 35-48 no se caracterizó químicamente ni inmunológicamente.

2.- Caracterización inmunológica de péptidos sintéticos

a. Obtención de anticuerpos antipéptido

Debido al número de animales experimentales que tendríamos que manejar si utilizáramos todos los péptidos sintéticos, en esta fase nos concretamos únicamente a caracterizar inmunológicamente 7 de los 12 péptidos disponibles. Estos péptidos son: 1-10, 1-14V modificado, 1-14N sin modificar, 22-36, 30-40, 1-27, 61-65c2 acoplados a tiroglobulina y 1-27 sin acoplar los cuales fueron utilizados para obtener anticuerpos antipéptido con el esquema de inmunización descrito en materiales y métodos.

Después del último refuerzo los ratones fueron sangrados y el suero fué separado y congelado hasta su posterior utilización.

Para determinar si teníamos anticuerpos antipéptido en los sueros obtenidos se probó la reactividad de los mismos contra 5 ug/mL de péptido acoplado a BSA en un ensayo de ELISA, diluyendo el suero 1/100 veces. Como se observa en la figura 4 todos los péptidos fueron capaces de inducir anticuerpos.

Tabla:4 SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE PEPTIDOS PURIFICADOS POR HPLC DE LA SECUENCIA DE LA TOXINA II-9.2.2.

Péptido	Aminoácidos identificados
	1 10
1-10	KEGYLVDKNT
	1 13
1-14V	KGYLVDKNTGCKY
	22 26
22-36	NDYCL
	30 34
30-40	KQQGY

La secuencia de aminoácidos fué obtenida con el componente principal en los péptidos 1-14V, 22-36, 30-40 y con el componente número uno en el péptido 1-10.

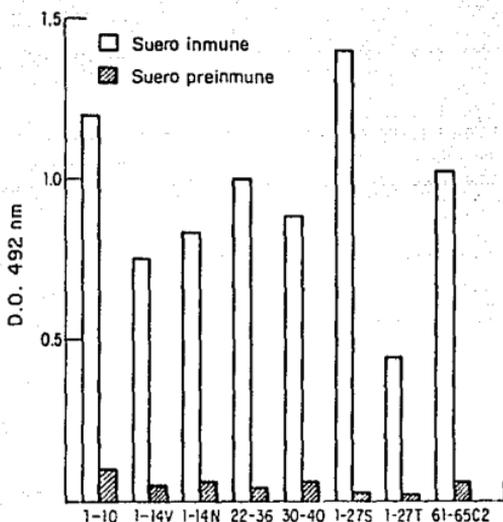


Fig. 4: REACTIVIDAD DE SUEROS ANTIPEPTIDO

Los sueros anti péptido fueron obtenidos en ratones de la cepa CDI inyectando el péptido sólo o acoplado a un acarreador. Los sueros fueron diluidos 1/100 veces y ensayados por ELISA contra 5 µg/ml de péptido acoplado a un acarreador diferente con el que se inmunizó pegado a la placa.

b. Titulación de anticuerpos antipéptido

Los sueros fueron titulados haciendo diluciones seriadas desde 1/100 hasta 1/6400 y ensayados por ELISA contra una concentración fija de péptido acoplado a BSA (5 $\mu\text{g/mL}$). Como se ve en la figura 5 todos los péptidos inducen altos títulos de anticuerpos.

Así mismo se probó la reactividad de los sueros antipéptido contra el péptido solo (50 $\mu\text{g/mL}$) pegado a la placa de ELISA diluyendo el suero 1/50 veces. Como se observa en la figura 6 todos los sueros antipéptido reaccionaron positivamente contra los péptidos solos. El péptido más pequeño (61-65C2) fué el que dió resultados más bajos.

Inmediatamente después los sueros fueron titulados contra una concentración fija de péptido (50 $\mu\text{g/mL}$) haciendo diluciones seriadas desde 1/50 hasta 1/3200 y ensayados por ELISA. Como se puede ver en la figura 7, a excepción del péptido 61-65C2, todos los demás péptidos inducen altos títulos de anticuerpos antipéptido que reconocen al péptido solo.

c. Reconocimiento de la toxina nativa

Con el fin de saber si los anticuerpos antipéptido reconocían a la toxina nativa se valoró la reactividad de los sueros antipéptido a una dilución de 1/50 veces y ensayados por ELISA contra 3 $\mu\text{g/mL}$ de toxina nativa II-9.2.2. Como se ilustra en la figura 8 a ésta dilución la mayoría de los sueros antipéptido reaccionaron positivamente contra la toxina, destacando la reactividad obtenida con el suero antipéptido 1-14N sin modificar y 1-27S obtenido con el péptido sin acarreador.

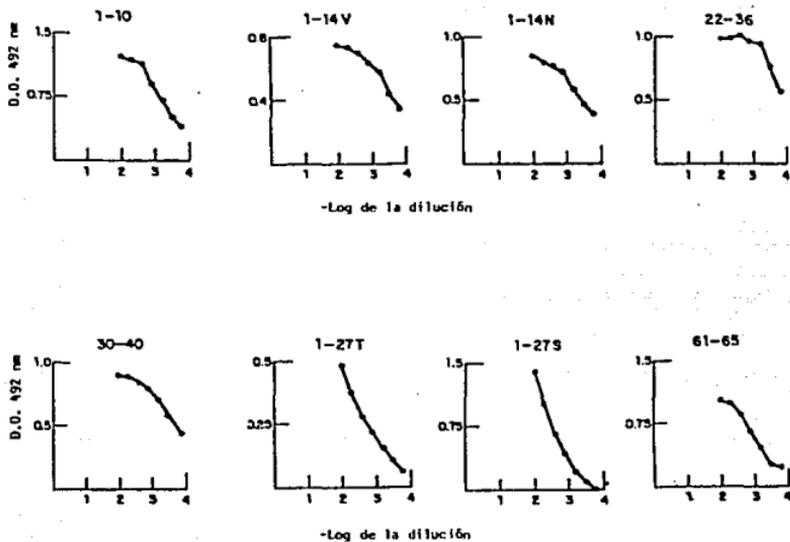


Fig. 5 TITULACION DE SUEROS ANTIPEPTIDO

Los sueros fueron diluidos en diluciones seriadas desde 1/100 hasta 1/6400 y ensayados por ELISA contra 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de péptido acoplado a BSA.

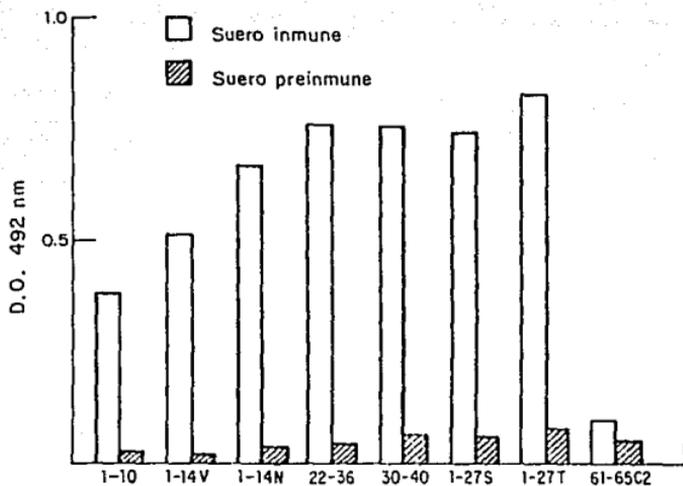


Fig. 6: REACTIVIDAD DE SUEROS ANTIPEPTIDO OBTENIDOS CON ACARREADOR CONTRA EL PEPTIDO SOLO.

Los sueros fueron diluidos 1/50 veces y ensayados por ELISA contra 50 $\mu\text{g/mL}$ de péptido pegado a la placa.
Los valores graficados corresponden a lecturas directas a 492 nm.

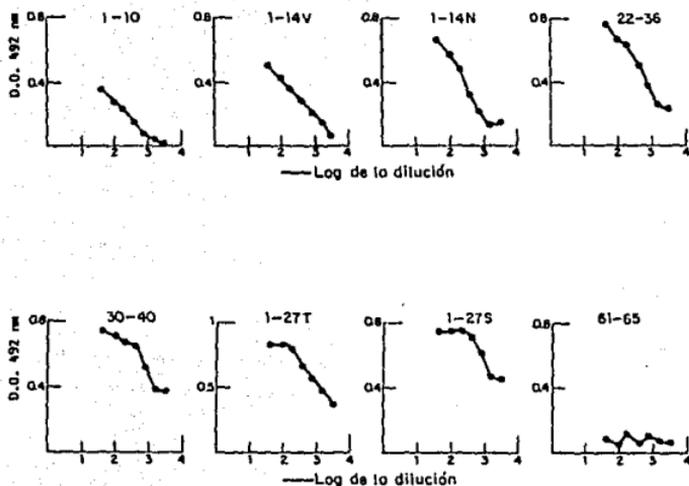


Fig. 7 TITULACION DE SUEROS ANTIPEPTIDO CONTRA EL PEPTIDO SIN ACARREADOR

Los sueros fueron diluidos en diluciones seriadas desde 1/50 hasta 1/3200 y ensayados por ELISA contra 50 μ g/ml de péptido.

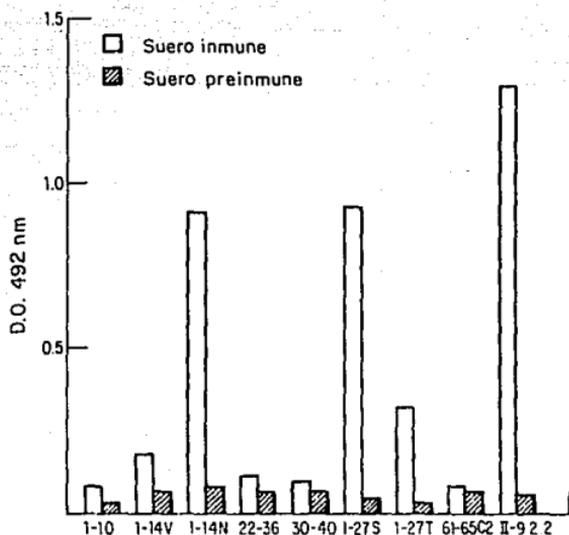


Fig.8: RECONOCIMIENTO DE ANTICUERPOS ANTIPEPTIDO A LA TOXINA II-9.2.2.

Los sueros antipeptido fueron diluidos 1/50 veces y ensayados por ELISA contra 3 $\mu\text{g/ml}$ de toxina nativa II-9.2.2 del alacrán Gentruroides noxius pegado a la placa. Como control positivo se utilizó suero policlonal anti-toxina II-9.2.2 diluido 1/50 veces.

Posteriormente los sueros fueron titulados haciendo diluciones seriadas desde 1/50 hasta 1/6400 y ensayados por ELISA contra una concentración fija de toxina nativa II-9.2.2 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como se observa en la figura 9 únicamente los sueros antipéptido 1-14N y 1-27S tienen altos títulos de anticuerpos que reconocen a la toxina II-9.2.2. Los sueros 1-27T, 1-14V, 1-10 muestran títulos bajos de anticuerpos y los sueros antipéptido 22-36, 30-40, 61-65 C2 no tienen una cantidad importante de anticuerpos antipéptido que reconocen a la toxina.

3.-Pruebas de neutralización de la toxina II-9.2.2 por anticuerpos antipéptido.

Después de obtener el volumen necesario de suero antipéptido se realizó una prueba de neutralización de la toxina II-9.2.2 por los anticuerpos antipéptido en terceros ratones. Para este experimento grupos de 10 ratones de la cepa CD1 fueron inyectados intraperitonealmente con 200 μL de suero que contenía una LD50 de toxina. Esta mezcla fue preincubada con agitación a 37 °C por una hora e inyectada inmediatamente. Como se observa en la tabla 5 únicamente los sueros antipéptido 1-14V modificado, 1-27S y 1-27T parecen contener anticuerpos antipéptido que de alguna manera contrarrestan el efecto de la toxina II-9.2.2.

4.-Desafío in vivo de ratones preinmunizados con péptidos sintéticos.

Finalmente los ratones inmunizados fueron desafiados con una dosis letal 50 de toxina II-9.2.2. Como vemos en la tabla 6 únicamente en el grupo inmunizado con el péptido 1-14V modificado lograron sobrevivir 4 de los 5 ratones inmunizados lo cual parece concordar con el experimento de neutralización en terceros.

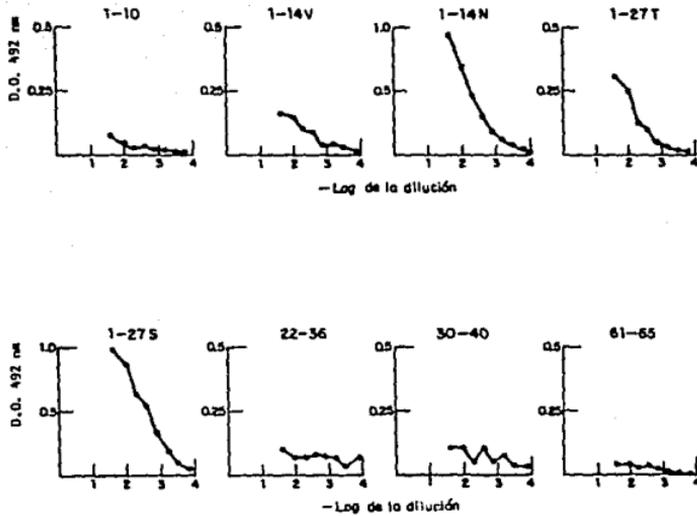


Fig. 9 TITULACION DE SUEROS ANTIPEPTIDO CONTRA LA TOXINA NATIVA II-9.2.2

Los sueros fueron diluidos en diluciones seriadas desde 1/50 hasta 1/6400 y ensayados por ELISA contra 3 $\mu\text{g/ml}$ de toxina nativa II-9.2.2.

Tabla:5 PRUEBAS DE NEUTRALIZACION DE LA TOXINA NATIVA II-9.2.2
CON SUERO POLICLONAL ANTIPEPTIDO EN TERCEROS RATONES

Suero antipéptido	Número de sobrevivientes*
1-10	3/10
1-14N	3/10
1-14V	7/10
22-36	6/10
30-40	1/10
1-27S	7/10
1-27T	8/10
61-65c2	4/10
suero preinmune	5/10

Grupos de 10 ratones de la cepa CD1 fueron inyectados intraperitonealmente con 200 μ L de mezcla de suero antipéptido y una LD50 de toxina nativa II-9.2.2. La mezcla de suero antipéptido y toxina nativa fué incubada con agitación a 37 °C por una hora e inyectada inmediatamente.

Los ratones fueron mantenidos en observación por una semana.

* Indica número de ratones vivos sobre número total de ratones.

Tabla 6: DESAFIO DE RATONES INMUNIZADOS CON PEPTIDOS SINTETICOS
CORRESPONDIENTES A LA SECUENCIA DE LA TOXINA II-9.2.2 DEL
ALACRAN Centruroides noxius.

Péptido sintético	número de sobrevivientes*
1-10	3/5
1-14N	2/4
1-14V	4/5
22-36	3/5
30-40	3/5
1-27S	0/5
1-27T	2/5
Sin péptido	3/6

El desafío de los ratones se realizó con una LD50 de toxina nativa II-9.2.2 inyectada intraperitonealmente. Los ratones se mantuvieron en observación constante por espacio de 4 horas y fueron sacrificados 15 días después del experimento.

El tiempo promedio al cual murieron los ratones control fué de 1 hora.

* Indica número de ratones vivos sobre número total de ratones.

DISCUSION

1.-Síntesis, purificación y caracterización de péptidos correspondientes a la toxina II-9.2.2.

Como se mencionó en la sección de resultados se tomaron varios criterios para la selección de los péptidos sintetizados que corresponden a secuencias de aminoácidos sobrelapadas de la toxina II-9.2.2 del veneno del alacrán Centruroides noxius.

Todos los pasos de acoplamiento y desprotección en la síntesis de péptidos fueron seguidos por la prueba de ninhidrina para detectar grupos aminos libres. En la desprotección con ácido trifluoroacético al 50% se observó que con 30 minutos es suficiente para eliminar el grupo Boc de todos los aminoácidos.

Por otra parte en el paso de acoplamiento de los aminoácidos se encontró que con un ciclo de 2 horas y 3 excesos molares de aminoácido era suficiente para la mayoría de los aminoácidos excepto para la asparagina ó cuando se trataba de 2 aminoácidos muy hidrofóbicos en donde fué necesario algunas veces repetir 3 veces el ciclo de acoplamiento.

El péptido 1-14 fué sintetizado 2 veces debido a que en la primer síntesis desafortunadamente el ácido glutámico 2 no se pegó a la glicina 3 como fué comprobado por análisis de aminoácidos tablas 2 y 3 y por secuenciación automática de Edman tabla 4.

Es importante comentar que los 2 péptidos del extremo carboxilo terminal sintetizados (61-65 C1 y C2) contienen la composición de aminoácidos correspondiente a esa región de la toxina. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos es diferente

como se observó en la tabla 1. Esto se debe a que en el momento en que se realizó la síntesis no se conocía exactamente la secuencia de los últimos 3 aminoácidos de este extremo de la toxina II-9.2.2.

Sin embargo, como se conocía la composición de aminoácidos y la posición de los tres primeros aminoácidos (P-N-K) y la del último (C) se sintetizaron dos secuencias en la cual una sería la verdadera y la otra contendría una inversión interna de posición. Otra razón para sintetizar la región C-terminal es el conocimiento de la estructura tridimensional de la toxina variante 3 del alacrán *C. sculpturatus* (Fontecilla-camps, 1980).

La difracción de rayos-X indicaba que la región C-terminal se encuentra próxima a la región N-terminal y además es una región expuesta de la molécula.

Al purificar los péptidos sintetizados por HPLC en una columna de fase reversa C18 a nivel analítico y semipreparativo con un gradiente lineal de 0-60% de acetonitrilo, a excepción del péptido 1-27, en todos los demás hubo una buena separación. No fué necesario cromatografiar, los componentes separados o modificar el gradiente como ocurrió con el péptido 1-27 en donde fué necesario modificar el gradiente, haciéndolo más rápido al inicio de 0 a 30 % de acetonitrilo en 5 minutos y haciéndolo más lento en la concentración de acetonitrilo en donde salían los componentes sobrepuestos, obteniendo con esto un componente principal bien separado Fig. 3. Por otra parte en 10 de los 12 péptidos se obtuvo un componente cromatográfico principal el cual corresponde por arriba del 60 % del péptido total (señalado con un asterisco en los cromatogramas de las Fig. 1 a 3.

Cuando se determinó la composición de aminoácidos de los péptidos sin purificar como se vió en la tabla 2, la composición de aminoácidos obtenida fué muy parecida a la composición esperada. Para los péptidos que contienen cisteína por lo general en todos los análisis el valor obtenido fué bajo. Esto se debe a que la cisteína se modifica fácilmente de manera que para obtener un valor más exacto es necesario oxidar la muestra antes de hidrolizarla y posteriormente cuantificar las cisteínas como ácido cisteíco.

Como se observó en la tabla 2, al realizar el análisis de aminoácidos de los péptidos no purificados, los péptidos pequeños tienen la composición de aminoácidos muy parecida a la esperada y que la composición va difiriendo de lo esperado conforme aumenta el número de residuos en el péptido.

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.

Al realizar el análisis de aminoácidos de los componentes cromatográficos principales de los 10 péptidos purificados por HPLC en los cuales se obtuvo un componente principal, como se puede observar en la tabla 3, la composición de aminoácidos obtenida fue muy similar a la composición esperada, a excepción de la cisteína, como ya comentamos anteriormente; en este sistema arroja valores bajos.

En los 2 péptidos restantes 1-10, 17-25 (Figs. 1 y 2) en donde obtuvimos más de un componente principal (2 y 3) respectivamente fué necesario realizar el análisis de aminoácidos de cada uno por separado.

En el péptido 1-10 se encontró que el pico 1 es el que tiene la composición correcta y corresponde a la misma cantidad que el segundo pico principal el cual

por este tipo de análisis se encontró que le faltó una lisina.

Con respecto al péptido 17-25 el componente que contiene la composición de aminoácidos esperada es el pico 3.

Para determinar la composición exacta de aminoácidos es necesario realizar el análisis de aminoácidos a diferentes tiempos de hidrólisis de la muestra (20, 40, 72 hrs), con el fin de calcular el porcentaje de degradación de los aminoácidos más lábiles a la temperatura y extrapolarlo a tiempo cero.

Estos resultados fueron confirmados por secuenciación automática de Edman en los péptidos 1-10, 1-14V, 22-36, 30-40. En el caso del componente 1 del péptido 1-10 se comprobó que no falta ningún aminoácido lográndose secuenciar desde el primer hasta el último aminoácido tabla 4. Sin embargo, al tratar de secuenciar el componente 2 de este mismo péptido no se pudo realizar debido a que al parecer se encuentra bloqueado por la ciclización del glutámico 2 comprobándose el resultado del análisis de aminoácidos que el aminoácido que faltaba en este segundo componente es la lisina 1.

Otro péptido que se pudo secuenciar totalmente fué el 1-14V el cual al realizar el análisis de aminoácidos del pico principal obtenido por HPLC como se vió en la tabla 3 se obtuvo un aspártico más de los esperados. Sin embargo, al realizar la secuencia el número de aspárticos fué el esperado. Así mismo se confirmó que falta el glutámico 2 como fue observado en el análisis de aminoácidos del péptido sin purificar y del componente principal obtenido por HPLC.

Con los péptidos 22-36 y 30-40 solamente se logró secuenciar los primeros 5 aminoácidos (NDYCL), (KQQGY) respectivamente. En el caso del péptido 30-40

en donde la composición de aminoácidos la glutamina salió baja se comprobó que si se encuentran las 2 glutaminas esperadas.

Nuestros resultados indican que el análisis químico de la composición de aminoácidos de un péptido obtenido por hidrólisis ácida y la determinación directa de la secuencia por degradación automática de Edman son dos técnicas complementarias, que tomadas en conjunto son suficientes para verificar de forma inequívoca la naturaleza química y la pureza de un péptido sintético.

Infelizmente, por motivos técnicos (el secuenciador dejó de funcionar por un largo periodo de tiempo) no fué posible obtener la secuencia directa de aminoácidos de todos los péptidos sintetizados. Sin embargo, la mayoría de los autores consideran como criterio suficiente de pureza trabajar con péptidos sintéticos separados por HPLC (Tam, 1988., Stewart, et al. 1984). De la misma forma, cuando el análisis de aminoácidos obtenido del péptido purificado por HPLC está cercano al teórico esperado se considera como criterio suficiente para asumir que el péptido sintético corresponde al péptido esperado. Este criterio de pureza es todavía más justificado para estudios de tipo inmunológico, puesto que la obtención de anticuerpos (ó anticuerpo) que reconocen al péptido sintético y a la proteína nativa al mismo tiempo son una indicación funcional que soporta la autenticidad del péptido obtenido, de acuerdo al modelo diseñado. De esta forma, creemos que todos los péptidos diseñados y sintetizados, como objetivos de esta tesis, fueron obtenidos en cantidad y calidad suficiente para justificar plenamente los datos experimentales obtenidos con ellos, de acuerdo a lo que se discutirá a continuación.

2.-Obtención y caracterización de anticuerpos antipéptido sintético.

La inducción de anticuerpos contra péptidos sintéticos muy pequeños es difícil por lo cual fué necesario acoplar los péptidos a una proteína acarreadora. Esto se realizó utilizando carbodiimida soluble en agua como agente acoplante.

De los sueros antipéptido obtenidos mediante el esquema de inmunización mencionado en Materiales y Métodos se determinó la reactividad a una dilución fija del suero y posteriormente se realizó la titulación del mismo contra una concentración fija de péptido acoplado a un acarreador diferente al utilizado para la inmunización. En la figura 4 y 5 se demuestra que todos los sueros tienen una buena reactividad y altos títulos de anticuerpos antipéptido. Sin embargo, ¿toda la reactividad y el título obtenido de los sueros se debe a anticuerpos antipéptido, ó también a anticuerpos anti-dicicloalkilurea obtenida como un subproducto de reacción de la carbodiimida soluble en agua utilizada para acoplar el péptido a la proteína acarreadora y anticuerpos en contra del antígeno modificado químicamente por la carbodiimida soluble en agua.

Una manera de dilucidar esto fué ensayando los sueros antipéptido contra los péptidos pegados directamente a la placa de ELISA. Sin embargo, está reportado que anticuerpos antipéptido obtenidos mediante un acarreador no suelen reaccionar contra el antígeno solo debido a que el antígeno toma una conformación diferente a la que adquiere en solución y que péptidos pequeños difícilmente se pegan a la placa de ELISA. (Edwards, *et al.* 1989). Sin embargo, ésta era la forma más directa de probar si en verdad teníamos anticuerpos antipéptido, anticuerpos anti-agente acoplante ó anticuerpos anti-antígeno modificado.

Al determinar la reactividad y los títulos de los sueros antipéptido contra el péptido sólo como se observó en las figuras 6 y 7 obtuvimos buena reactividad y altos títulos de anticuerpos, aunque es importante comentar que la reactividad y los títulos obtenidos en este experimento fueron más bajos con respecto a la reactividad y títulos obtenidos contra el péptido acoplado a un acarreador.

La única excepción fue el resultado obtenido con el suero antipéptido 61-65 C2. Pensamos que la baja reactividad y título del suero antipéptido 61-65C2 puede deberse a que tal vez como está reportado, el péptido 61-65C2 pudo no haberse pegado a la placa de ELISA en la misma cantidad que los demás péptidos debido a que es un péptido pequeño de solamente 5 residuos de aminoácidos.

Es interesante comentar el resultado obtenido en la determinación de la reactividad y título del suero antipéptido 1-27S obtenido sin acarreador inyectando el péptido solo.

Esperábamos que el suero antipéptido 1-27S diera mejor reactividad y título al ser ensayado por ELISA contra el mismo antígeno sin acoplar que contra el péptido acoplado a un acarreador. Sin embargo, al realizar este experimento obtuvimos lo contrario dando mejores resultados en contra del péptido acoplado a un acarreador que con el péptido solo. Esto podría deberse a varias razones: la primera es que tal vez la cantidad de péptido pegado directamente a la placa de ELISA sea menor que la cantidad de péptido disponible cuando se pega con un acarreador.

La segunda es que al pegar el péptido directamente a la placa de ELISA, el péptido no esté muy accesible a los anticuerpos.

La tercera es que el péptido pegado a la placa tome una conformación diferente a la que toma en solución.

Por otra parte la mejor reactividad y título obtenido al ensayar este suero antipéptido 1-27S contra el mismo antígeno pero acoplado a un acarreador puede deberse:

- Mayor concentración de péptido disponible que cuando se pega directamente el péptido a la placa.
- A que el péptido se encuentra más accesible.
- La conformación que toma sea más parecida a la que presenta cuando se encuentra en solución.

Una vez comprobado que teníamos anticuerpos antipéptido el siguiente objetivo fue ver si estos anticuerpos antipéptido eran capaces de reconocer a la toxina nativa II-9.2.2. La figura 8 demuestra que al probar la reactividad de estos sueros contra la toxina existe en todos los sueros anticuerpos que reconocen a la toxina.

Los sueros antipéptido que mejor reconocen a la toxina II-9.2.2 son 1-14V, 1-14N, 1-27T, 1-27S confirmándose esto cuando realizamos las curvas de titulación con todos los sueros antipéptido obtenidos, (Fig. 9).

Los anticuerpos antipéptido que reconocen mejor a la toxina son los que corresponden a los péptidos del extremo amino de la toxina. Claramente podemos observar que conforme el péptido va siendo más grande (mayor número de residuos de aminoácidos) los sueros antipéptido reconocen mejor a la toxina. Los péptidos de la parte central de la toxina, entre el aminoácido 22-40 y del carboxilo terminal entre el aminoácido 61-65, inducen anticuerpos que no reconocen a la toxina. Si comparamos estos resultados con la estructura tridimensional de una toxina del alacrán Centruroides sculpturatus, variante 3, para la cual ya se conoce el patrón de difracción de rayos-x (Fontecilla-Camps et al. 1980,) y tomamos en cuenta que hay una importante similitud en la secuencia de aminoácidos entre las toxinas de

C. Sculpturatus y la de C. noxius (Possani, 1984) es consistente concluir que la porción central de la toxina II-9.2.2 (residuos 20-40) constituye parte del corazón de la molécula menos expuesta. Esto precisamente se ha demostrado para la variante-3 de C. sculpturatus (Fontecilla-Camps 1980). Con relación al pentapéptido C-terminal (residuos 61-65) es de esperarse, como ya se ha comentado, que por tratarse de un pentapéptido de pocos aminoácidos, con menor probabilidad de estructuración secundaria que la de los péptidos con 14 ó más residuos de aminoácidos, era de esperarse que la respuesta inmune no fuera tan eficiente.

Es interesante notar que el péptido 1-14N sin modificar induce mejores títulos de anticuerpos antipéptido que reconocen a la toxina nativa que el péptido 1-14V (modificado que le faltó el ácido glutámico de posición número 2). Esto también era de esperarse. Así mismo cabe resaltar que el péptido 1-27 sin acarreador induce mejores títulos de anticuerpos antipéptido que reconocen a la toxina, que cuando está acoplado a un acarreador.

3.-Desafío de ratones con suero Inmune anti-péptido y desafío in vivo con toxina nativa.

Antes de desafiar a los ratones inmunizados se decidió hacer pruebas de neutralización en terceros ratones, esto con el fin de obtener resultados que nos ayudaran a ver si alguno de los sueros antipéptido que reaccionó contra la toxina II-9.2.2 era capaz de neutralizarla, ya que in vivo se había observado que el efecto de la toxina es sumamente rápido. Esto indica que la toxina es sumamente afín a su sitio receptor en el organismo por lo cual tal vez aún cuando tengamos anticuerpos

antipéptido no veríamos nada en el desafío directo de los ratones inmunizados. Por lo cual pensamos que preincubando la toxina con el suero se favorecería el reconocimiento de los anticuerpos a la toxina de modo que al inyectar los ratones con esta mezcla posiblemente se podrían obtener resultados más claros. Por ejemplo, si los sueros tienen anticuerpos antipéptido que reconocen a la toxina los animales no morirían, lo cual indicaría que estos anticuerpos antipéptido están reconociendo el sitio de la toxina con el cual se une al sitio receptor en el organismo, además de que la afinidad del anticuerpo antipéptido por la toxina fuese muy fuerte de manera que el complejo toxina anticuerpo antipéptido no se disociara. Por otra parte si el ratón presentara intoxicación después del tiempo en que lo presentan los ratones controles estaría indicando que a pesar de que los anticuerpos antipéptido se pegan a la toxina, la unión es muy débil y el complejo toxina anticuerpo se disocia fácilmente.

Por otra parte si los sueros tienen anticuerpos antipéptido que se pegan en un sitio a la toxina con el cual ésta no se une al sitio receptor del organismo ó anticuerpos antipéptido que no reconocen a la toxina, los animales morirían al mismo tiempo que los organismos controles.

Al realizar estos experimentos como se observó en la tabla 5 únicamente con los sueros antipéptido 1-14V modificado, 1-27T y 1-27S logró sobrevivir más del 50% de la población de los ratones utilizados.

Curiosamente a pesar de que el péptido 1-14N sin modificar induce altos títulos de anticuerpos antipéptido que reconocen a la toxina II-9.2.2, estos anticuerpos no son capaces de proteger a los ratones del envenenamiento con la toxina, de manera contraria el péptido 1-14V modificado a pesar de que no induce altos títulos de

anticuerpos antipéptido que reconocen a la toxina al parecer estos logran contrarrestar el efecto de la toxina. Esto podría deberse a que estos anticuerpos antipéptido 1-14V modificado se unen con mayor afinidad que los anticuerpos antipéptido 1-14N no modificado.

Finalmente el experimento que podría corroborar los resultados obtenidos hasta aquí indudablemente era el desafío directo de los ratones inmunizados con los péptidos sintéticos.

Hasta este punto es claro que todos los péptidos inducen altos títulos de anticuerpos antipéptido, que los sueros antipéptido 1-14N sin modificar 1-14V modificado 1-27S y 1-27T tienen anticuerpos que reconocen a la toxina II-9.2.2 y que en los ensayos de neutralización en terceros, solamente los sueros antipéptido 1-14V 1-27S y 1-27T parecen tener anticuerpos que neutralizan el efecto de la toxina.

Al realizar el desafío directo de los ratones inmunizados como se vió en la tabla 6 únicamente en el grupo inmunizado con el péptido 1-14V modificado logró sobrevivir el mayor número de ratones (80 %) sin embargo no podemos decir que este péptido 1-14V induzca anticuerpos que neutralizan totalmente el efecto de la toxina.

Es importante resaltar que los 5 péptidos del extremo amino terminal inducen anticuerpos que reconocen a la toxina nativa y que por lo menos uno de ellos 1-14V modificado contrarresta ligeramente el efecto de la toxina, lo cual indica que posiblemente es necesario investigar cual es la conformación que toma esta región en la toxina nativa para posteriormente sintetizar esta región tratando de que el péptido tenga esta estructura tridimensional.

4.-Conclusiones

En este trabajo de tesis se reporta la síntesis de 12 péptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de la toxina II-9.2.2 del veneno del alacrán C. noxius. Los péptidos fueron purificados y caracterizados químicamente. Siete de ellos fueron utilizados para inmunizar ratones (albinos, CD1).

Los ratones fueron capaces de producir anticuerpos que reconocieron de forma importante a los péptidos acoplados a un acarreador (distinto del usado para la inmunización). También reconocieron a los péptidos solos (en ensayos de ELISA) y más importante aún, fueron capaces de reconocer a la toxina nativa. Los sueros inmunes antipéptido sintéticos que mejor título presentaron en el reconocimiento a la toxina fueron: 1-14N, 1-27T, 1-27S, correspondientes a la región aminoterminal de la toxina II-9.2.2.

Cuanto mayor el péptido sintético en términos de número de residuos de aminoácidos tanto mejor la respuesta. El péptido amino terminal 1-10 fué el que produjo el título más bajo. El desafío de terceros ratones con complejos suero antipéptido sintético más una LD50 de toxina demostró baja protección antitoxina. El mejor resultado fué obtenido con los péptidos 1-14V, 1-27S, 1-27T. Desafío directo in vivo confirmaron los resultados de neutralización en terceros ratones.

Sin embargo, el diseño de péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de toxinas específicas del veneno de alacranes para su uso posterior como posible "vacuna sintética" necesita ser ampliado.

No obstante que nuestros experimentos produjeron datos valiosos, especialmente en cuanto al tamaño del péptido a sintetizar y a la región de la secuencia de la toxina (amino- terminal), todavía falta responder preguntas importantes, como estas:

a) ¿Cuál es exactamente el mejor fragmento peptídico que se debe utilizar de la región N-terminal de la toxina?

b) ¿ Los epítopes neutralizantes relevantes corresponden a secuencias de aminoácidos lineales ó a regiones conformacionales en la cuál más de una porción subyacente de la estructura primaria de la toxina convergen para producir anticuerpos neutralizantes?. c) ¿ Debe el péptido sintético ser suficientemente largo a fin de permitir una estructuración secundaria de sí mismo, para mejor producción de anticuerpos neutralizantes?. c) ¿ Es posible ensayar una respuesta a esta preguntas mediante experimentos de cultivo *in vitro* con células del sistema inmune (macrófagos presentadores y/o linfocitos B) de ratones pre-inmunizados con toxina nativa?.

Parte de estas preguntas se están intentando responder en el laboratorio en este momento (tesis de doctorado de la M. en C. Emma Calderón).

BIBLIOGRAFIA

Alagón, A., López-Acuña, D. (1979). Comunicado durante la sesión Técnica de la Sociedad Mexicana de Salud Pública, México D.F., citado por Possani y col. *Toxicon* 19, 323-329 (1981).

Appel, J. R., Pinilla, C., Niman, H., Houghthen, R. (1990). Elucidation of discontinuous linear determinants in peptides. *The Journal of Immunology*. 144, 976-983.

Arnon, R. (1986). Peptides as immunogens: Prospects for synthetic vaccines. *Current topics in Microbiology and Immunology*. 130, 1-12.

Arnon, R. (1986). Synthetic peptides as the basis for future vaccines. *TIBS*. 14, 521-524.

Askelof, P., Rodmalm, K., Wrangsell, G., Larsson, U., Svenson, S. B., Cowell, J. L., Undén, U., Bartfai, T. (1990). Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. *Proc. Natl Acad Sci*. 87, 1347-1351.

Atassi, M.Z., Smith, J.A. (1978). A proposal for the nomenclature of antigenic sites in peptides and proteins. *Immunochemistry*. 15, 609-611.

Bahraoui, E., El Ayeb, M., Rietschoten, V., Rochat, H., Granier, C. (1986). Immunology of scorpion toxins: Study with synthetic peptides of the antigenicity of four regions of toxin II of Androctonus australis Hector. *Molecular immunology*. **23**, 357-366.

Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J. M., Darvon, H., Elayeb, M., Granier, C., Marvaldi, J., Rochat, H. (1988). Monoclonal antibodies to scorpion toxins. *The Journal of Immunology*. **141**, 214-220.

Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., Tarvin, T. L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of chromatography*. **336**, 93-104.

Cahalan, M. D. (1975). Modification of sodium Channel gating in frog myelinated nerve fibers by Centruroides sculpturatus venom. *J. Physiol (Lond.)* **244**, 511-534.

Catterall, W. (1976). Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential Na ionophore. *J. Biol. Chem.* **251**, 5528-5536.

Catterall, W. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 15-43.

Couraud, F., Rochat, H., Lissitzky, S. (1980). Binding of scorpion neurotoxins to chick embryonic heart cells in culture and relationship to calcium uptake and membrane potential. *Biochem.* **19**, 457-462.

Dehesa-Dávila, M. (1989). Epidemiological characteristic of scorpion sting in León, Guanajuato, México. *Toxicon*. 27, 281-286.

Delori, P., Rietschoten, J. V., Rochat, H. (1981). Scorpion venom and neurotoxins: an immunological study. *Toxicon*. 19, 393-407.

Dyson, H. J., Lerner, R. A., Wright, P. E. (1988). The physical basis for induction of protein-reactive antipeptide antibodies. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 17, 305-325.

Edwards, R. J., Singleton, A.M., Boobis, A.R., Davis, D. S. (1989). Cross reaction of antibodies to coupling groups used in the production of anti-peptide antibodies. *J. of immunological methods*. 117, 215-220.

Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R. J., Suddath, F. L., Watt, D. D., Bugg, C. E. (1980). Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77, 6496-6500.

Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R. J., Suddath, F. L., Bugg, C. E. (1982). The three-dimensional structure of scorpion neurotoxins. *Toxicon*. 20, 1-7.

Fontecilla-Camps, J., Habersetzer-Rochat, C., 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.

Francis, M. J., Hastings, G. Z., Clarke, B. E., Brown, A. L., Beddell, C. R., Rowlands, D. J., Brown, F. (1990). Neutralizing antibodies to all seven serotypes of foot-and-mouth disease virus elicited by synthetic peptides. *Immunology*. 69, 171-176.

Garvey, J. S., Cremer, N. C. and Susdorf, D. H. (1977). *Methods in immunology*. W. A. Benjamin, Reading, M. A.

Geysen, H.M., Meloen, R. H., Bateling, S.J. (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81, 3998.

Geysen, H.M., Rodda, S.J., Mason, T.J. (1986). In: Porter, H., Whelan, J. (eds) *Synthetic peptides as antigens*, Ciba Foundations Symposium, Pitman, London (in press).

Granier, C., Bahraoui E., Van-Rietschoten, J., Rochat, H., El Ayeb, M. (1984). Synthesis and immunological characterization of two peptides which are models for two of the major antigenic sites of a scorpion toxin. *Int. J. Peptide Protein Res.* 23, 187-197.

Green, N.H., Alexander, A., Olson, S., Alexander, T.M., Shinnick, J.G., Sutcliffe, A. and Lerner, R. A. (1982). Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell*. 29, 477-487.

Gurrola, G. B., Molinar-Rode, R., Sitges, M., Bayon, A., Possani, L. D. (1989). Synthetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this K⁺ channel blocker is located on its amino-terminal portion. *J. Neural Transm.* **77**, 11-20.

Harding, C. V., Unanue, E. (1990). Quantitation of antigen-presenting cell MHC classII/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature.* **346**, 574-576.

Hobbs, R. N. (1989). Solid-phase immunoassay of serum antibodies to peptides. Covalent antigen binding to adsorbed phenylalanine-lysine copolymers. *Journal of immunological methods.* **117**, 257-266.

Hoffmann, C.C. (1938). Nuevas consideraciones acerca de los alacranes Mexicanos. *An Inst. Biol.* **9**, 318-337.

Hopp, T. P., Woods, K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 3824-3828.

Jover, E., Couraud, F., and Rochat, H. (1980 a). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1607-1614.

Jover, E., Martin-Moutot, N., Ccraud, F., and Rochat, H. (1980 b). Binding of scorpion toxin to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potencial, ions and other neurotoxins. *Biochemistry*. **19**, 463-467.

Kauzman, W. (1959). *Adv. Protein. Chem.* **14**, 1-3.

Karplus, P.A., Schulz, G.E. (1985). *Naturwissenschaften* **72**, 212-213.

Kirsch, G. E., Skattebol, A., Possani, L.D., Brown, A. M. (1989). Modification of Na channel gating by an alfa Scorpion toxin from Tityus serrulatus. *J. Gen. Physiol.* **93**, 67-83.

Mao, S.J.T., Yates, M.T., Owen, T.J., Krstenansky, J. L. (1989). Preparation of antibodies to a synthetic C terminus of hirudin and identification of an antigenic site. *Journal of immunological methods.* **120**, 45-50.

Mariuzza, R. A., Phillip, S. E. V., Poljak, R. J. (1987). The structural basis of antigen-antibody recognition. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **16**, 139-159.

Mazzotti, L., Bravo-Becherelle, M. A. (1963). Scorpionism in the Mexican republic in: *venomous and poisonous animals and noxious plant of the pacific area: Keegan and Mac Farlane (Eds) London, New York. Sydney. Pergamon*, 119-131.

Merrifield, R.B. (1963). Solid phase peptide synthesis IV. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 2144.

Meves, H., Simard, J. M., Watt, D. D. (1986). Interactions of Scorpion Toxins with the Sodium Channel. *Annals New York Academy of Sciences.* **479**, 113-132.

Mitchell, A. R., Kent, S. B.H., Engelhard, M., 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.

Nakame, P. (1979). en "Immunoassays in the clinical laboratory" (R. M. Nakamura, W.R. Dito, and E. S. Tucker, III, Eds), Liss, New York. pp 81-86.

Parker, J.M.R., Guo, D., Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray- derived accesible sites. *Biochemistry.* **25**, 5425-5432.

Patarroyo, M. E., Romero, P., Torres, M. L., Clavijo, P., Moreno, A., Martínez, A., Rodríguez, R., Guzmán, F., Cabezas, E. (1987). Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature.* **328**, 629-631.

Patarroyo, M. E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzmán, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L. A., Ponton, G., Trujillo, G. (1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. **332**, 158-161.

Peeters, J. M., Hazendonk, T. G., Beuvery, E. C., Tesser, G. I. (1989). Comparison of four bifunctional reagents for coupling peptides to proteins and the effect of the three moieties on the immunogenicity of the conjugates. *Journal of immunological methods*. **120**, 133-143

Possani, L. D., Steinmetz, W. E., Dent, M. A. R., Alagón, A. C., Wuthrich, K. (1981). Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. *Biochem. Bioph. Acta*. **669**, 183-192.

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

Possani, L. D. (1984). Structure of scorpion toxins. In handbook of natural toxins (Edited by Anthony T. Tu). Marcel Dekker, Inc. New York. pp 513-550.

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

Rochat, H., Rochat, C., Kopeyan, C., Miranda, F., Lissitzky, S., and Edman, P. (1970b). Scorpion neurotoxins: A family of homologous proteins. *FEBS Lett.* **10**, 349-351.

Rochat, H., Bernard, P., and Couraud, F. (1979). Scorpion toxins: Chemistry and mode of action. In *advances in cytopharmacology*. B. Ceccarelli and F. Clementi; (Eds). Raven Press, New York. **3**, 325-334.

Sarin, V. K., Kent, S.B.H., Mitchell, A.R., Merrifield, R. B. (1984). A general approach to quantitation of synthetic efficiency in solid-phase peptide synthesis as a function of synthetic of chain length. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 7845-7848.

Sarin, V. K., Kent, S.B.H., Tam, J. P., Merrifield, R. B. (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* **117**, 147-157.

Sela, M. (1969). Antigenicity: Some molecular aspects. *Science* **166**, 1365.

Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Green, N., Lerner, R. A. (1983). Synthetic peptide immunogens as vaccines. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 425-446.

Stahnke, H. L., Calos, M. (1977). A key to the species of the genus Centruroides Max (Scorpionidae, Butidae). *Ent. News.* **88**, 111-112.

Stewart, J. M., Young, J. D. (1984). Solid phase peptide synthesis. Pierce chemical company. Second edition.

Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Alexander, H., Houghten, R. A., Olson, A. J., Lerner, R. A. (1984). The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature*. **312**, 127-133.

Tam, J. P., Lu, Y. (1989). Vaccine engineering: Enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *Proc Natl Acad Sci*. **86**, 9084-9088.

Tam, J. P. (1988). Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci*. **85**, 5409-5413.

Vaca, L. A. (1989). Síntesis de péptidos correspondientes a la secuencia de la noxiustoxina: Determinantes antigénicos y efectos sobre canales iónicos. Tesis de maestría presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Walter, G. (1986). production and use of antibodies against synthetic peptides. *Journal of immunological Methods*. **88**, 149-161.

Yatani, A., Kirsch, G. E., Possani, L. D., Brown, A. M. (1988). Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. *American Physiological Society*. **254**, 443-451.

Zamudio, F. (1989). Obtención, caracterización y uso de anticuerpos monoclonales para el estudio de estructura y función de toxinas de alacranes. Tesis de maestría presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México. Fac. de Química.