



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

NEUTRALIZACIÓN DE ESFINGOMIELINASA D
RECOMBINANTE DE *Loxosceles boneti* CON
VARIAS PREPARACIONES DERIVADAS DE
SUERO HIPERINMUNE DE CABALLO.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

LUCÍA JIMÉNEZ MARTÍNEZ

Asesor:
Dr. Alejandro Alagón Cano

México, D. F.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres, Arturo y Lucy, quienes han sido los mejores padres del mundo, y mis mejores amigos, quienes me aman y a quienes amo profundamente.

Gracias por brindarme la más noble y amorosa historia de vida, por tanto amor demostrado con su trabajo, con su empeño, con su vida misma.

Gracias a sus voces, las cuales se entrelazaron para formar un cántico lleno de palabras sabias, verdaderas, elocuentes, amables, acertivas y comprensivas, repletas de caricias brindadas a mi alma, a mi mente y corazón.

Gracias, porque por amor a Arturito y a mí, nunca se han rendido en el campo de batalla, porque son los guerreros más amorosos, los más limpios, los más puros, los más humanos.

Gracias por ser la fuente de mi inspiración y motivación, de mis alegrías, y de mi felicidad...Gracias eternas...

A mi hermano Arturo, por tu cariñosa compañía, por tu temperamento e inteligencia, sabiduría y amor.

Porque desde pequeño has sorteado valientemente cada obstáculo y dificultad impuestos en tu camino, porque eres la representación del esfuerzo, del trabajo, de la esperanza y la inspiración .

Por tu hermosa forma de ser y de mirar este mundo, por la luz de tus ojos, tus sonrisas, tu alegría, tus enojos y terquedades, porque en todo momento me has demostrado que la felicidad es alcanzable con pequeños pero profundos detalles.

Porque hemos crecido juntos y porque eres el mejor hermano, quien sin duda alguna es el más bello reflejo de que existen cosas ciertas, verdaderas y buenas en esta vida. Te amo por siempre mi querido hermanito...

Agradecimientos:

Y sólo por sí la tesis *per se* no fuese suficientemente grande y larga, a continuación mencionaré a diversa y variada gente, quienes han dejado en mí enseñanzas invaluable del mundo en general, de la ciencia y de los viajes, pero principalmente de la misma poesía de la vida y del amor.

Al Dr. Alagón Cano:

Quien seguramente desarrollará un fuerte y sonoro ciclo de inhalación-exhalación, por la “traqueteada y revoltosa” finalización de lo que parecía una eterna tesis de licenciatura. Tal vez también desarrolle exitosamente, como lo fue la producción de antivenenos únicos en su clase y 100% mexicanos, una tremenda deshidratación, dolor de cabeza y mareos, inducidos por los obscenos volúmenes de líquidos con terminación –OH que llenaran las copas de felicidad levantadas al término de la presentación oral de esta tesis...o al menos así lo espero.

Será fácil encontrarlo observando un cielo lleno de estrellas danzantes, o trabajando hasta altas horas de la noche, contando historias de la vida real o cuentos de amores imaginarios, tal vez, tomándose una foto como Dios lo trajo al mundo con una serie de gente desconocida, dando conferencias científicas alrededor del globo terráqueo, o escuchando a estudiantes desconsoladas porque sus novios las han dejado. Pero qué tal cuando es anfitrión de una fiesta en su casa, o maneja largas horas a otra ciudad para que su gente conozca su “ranchito-paraíso”, o cuando se le encuentra dando terapias físicas a borregos o caballos como parte de un proyecto importantísimo. También se le verá echando tremendos gritos a todo aquél, pobre mortal, que en simples técnicas de laboratorio, no haya podido entender y responder a todas aquellas “locuras del emperador” causales de su frenética búsqueda de la explicación y comprensión de difíciles fenómenos bioquímicos.

Posiblemente lo encontrarás importando una diversa variedad de flores, y semillas exóticas, de diferentes tierras y lugares; sembrarlas, cuidarlas, cultivarlas, hablarles, aconsejarlas, dirigiendo sus hojas y ramas con mucho cariño y dedicación con el único objetivo de sentirse orgulloso de ver su proceso de crecimiento, sus raíces fuertes y sus frutos. Ahora que lo pienso, sucede de la misma manera con cada uno de sus nuevos experimentos, mejor conocidos como sus estudiantes. -¡Vaya Analogía!-, digna de un Premio Nacional de Ciencias y Artes, digna de un tipo muy versátil, sencillo, generoso, algo loco y explosivo, pero finalmente cariñoso, amoroso y muy inteligente. Un excelente amigo, profesor y científico...Gracias por el tiempo, las pláticas, el espacio y dedicación que me otorgaste durante toda esta etapa. Gracias por siempre...

Al alcohol, la música y los cigarros los cuales formaron un trío perfecto, de compañía y generosidad, dispuestos siempre a ayudarme en mi camino del estudio y la filosofía del conocimiento... Gracias por existir.

A las “*niñas-ninfas*” de la casa de México, es decir, Abuelita, Magos y Mela, quienes seguramente vivieron conmigo TODO tipo de sentimientos humanos, sobre todo aquellos de angustia y ansiedad, con mis llegadas tarde a casa, mis conocidos estreses ante algún examen o evento académico, mis lágrimas ante

el conocimiento de la vida y mis muchas otras facetas dramáticas (¿o más bien bipolares?) propias de una joven como yo. Por siempre las tengo en mi corazón y pensamiento. Les agradezco el haberme albergado en su casa durante el estudio de mi carrera. Sin duda alguna, vivir con ustedes marcó mi vida por el resto de la misma.

En esta misma casa incluyo a la ninfa Tere, a Carmen y Huguito, quienes siempre y “a pesar de los pesares” me dieron felices sonrisas, alegrías consuelo, DELICIOSA comida, y momentos imborrables. Sinceramente creo que la canción de Celia Cruz cuyo título es “la vida es un carnaval”, fue inspirada en este trío familiar que forma parte de mis seres muy queridos. Gracias ... por todo.

A mi primo Ricardo, a quien quiero muchísimo y a quien siempre he visto como un hermano mayor. Gracias por tus relatos de vida, de historia y del mundo. Me gusta que no hacen falta las palabras para explicarnos o entendernos, porque seguramente estamos conectados con un lazo que va mucho más allá del sanguíneo...

A Manuel, porque mucho de este trabajo y de mi vida no hubiese sido posible sin tí. Gracias por compartir conmigo el verdadero sentido de la amistad, de la nobleza, de la gratitud, de la lealtad incondicional. Gracias por ser parte de mi familia. Gracias a nuestro destino, porque te conocí, y pude vivir contigo el amor en todas sus facetas. Y es cierto...¡Te liberaste!, pero no al 100%. ¿Será muy amenazador decir que por siempre contarás con mi bipolar presencia?...jajaja

A mi hermosa, y querida novia la M. en C. Blanca Ramos Cerrillo, mejor conocida como Blanchis, Planchis o Blanche, dependiendo del contexto en el cual “la agarres”...jajaja. Hace un momento pensé en una antigua frase que describiría “bondadosamente” a nuestra amistad...”Dios las hace y ellas se juntan”. Sin albur, y confiando en la limpia e inocente mente del lector de estas notas, he de decir que en efecto... nos juntamos... y vivimos mucha de nuestra historia juntas, la cual estuvo y seguirá estando llena de matices, colores y sabores. Misma historia que posiblemente será contada a nuestros nietos (si es que los tenemos), porque cada momento vivido con la Planchis es para recordarse. Gracias por la risa, el llanto, las catarsis, las ironías, los juegos de dominó, las borracheras, los cánticos a Oaxaca, las inolvidables fiestas, las conquistas, los debates científicos (obvio a nuestro nivel), las filosóficas pláticas, por las canciones deprimentes de Johnny Cash, por el sol, arena y mar, por aguantarme, por escucharme, por quererme, porque sin lugar a dudas yo también te quiero y mucho, porque eres hermosa y llena de vida. Como dice la canción que justo ahora estamos escuchando, You are so special...(obvio que tienes que practicar tu inglés...you know what I mean baby?).

A Mabel y Carel (Los cubanos). A Mabel porque sus “enseñanzas bioquímicas” fueron cruciales en el inicio de mi aprendizaje en el laboratorio, porque aprender contigo fue mejor que un mojito cubano preparado por el mismísimo Carel y vaya que eran buenos. Gracias a ambos, por las divertidísimas noches de dominó. Si se esfuerzan algún día lograrán vencer al dúo dinámico (Blanchis y yo)!...jajaja.

A Andreita, por su energía y carisma. Gracias por la noche del tucanazo! O que me dices de la noche de leyendas en Juriquilla!, nunca las olvidaré. Gracias por los interesantes debates sobre el mundo de la moda y la farándula. "Forever Fashion-Police".

A mi querido Roberteke, cuya personalidad es muy parecida a la de Shrek, pues a pesar de ser un monstruo, tipo ogro y muy, "muy malote", es un tipo a todo dar, un "chiquilin" muy inteligente, tanto que a veces me sorprendía (jajaja) y otras veces me hizo tirarme al piso de la risa. Posiblemente una de las personalidades más interesantes que he tenido oportunidad de conocer, sobre todo por su gran parecido con *Bruce Willis*. Gracias Robert por esclarecer mis más chafas "pensamientos científicos", por haber sido un paciente y dedicado profesor, por las fiestas en tu casa y gracias también a mi querida Chayo quien nos soportó hasta tempranas horas de la madrugada.

A Gigio, Gigi, o Chi-chi. Quien básicamente es un corazón con patas, posiblemente uno de los hombres más amorosos que he conocido, todo un príncipe valiente, a quien tengo el honor de conocer y quien tuvo a bien confiar en mí. Gracias por tu honestidad, confianza y amistad. Gracias por escucharme y alentarme. Pero sobre todo gracias por las tardes de gula y lujuria... ¡liuhhhh!. Gracias por la playa.

A la gente que conocí en el laboratorio: Dra. Rosana, Dr. Corzo, Laura Olguín, Saucedo, Pichón, Ariana, Claudia, Irene, Memo, Laura G, Daya y Carlitos quienes siempre estuvieron dispuestos para ayudarme tanto en cuestiones técnicas como en dudas teóricas.

A Felipe y Herli, pues fueron los mejores y más pacientes maestros, los iniciadores de mi aprendizaje en las técnicas bioquímicas que utilicé para la elaboración de esta tesis.

A la gente más reciente del laboratorio a Martha, Elba, Arlen, Melisa y Edgar, quienes han invadido con muy buena vibra el laboratorio. Porque son todos bien bonitos y bien buena onda. Gracias por escuchar cualquier clase de loquera que salía de mi boca. Gracias por haber tenido la confianza de viajar, platicar o echar desmadre conmigo.

Gracias a Consen o Wiki-consen. Siempre con una palabra o frase acertada. Siempre dispuesto a escuchar, siempre calmo y paciente.

A la Señora Leo, Ricardo Mondragón y Angélica (Chaparri), quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en todo lo que se pudiera. Gracias por su trabajo diario, pues con el nos brindan un laboratorio organizado y digno para que todos nosotros podamos trabajar gustosos.

To David & Leonora, who are beautiful, beautiful people, possibly the nicest couple I have ever met. Thanks for opening the doors of your house to me and for all the time and patience you've invested in the last few months, for all the kindly help, advice and care you've given me. Thanks for all the meals and

pleasant evenings, for the laughs till near death and for the trust and belief you've shown and given me. A special thanks to both of you for being the way you are. I love you, guys!

A la banda del "volley-ball": Poder Híbrido, Red-metabólica y Jarritos con quienes aprendí como defenderme mejor y con estilo ante los balonazos.

Al personal administrativo del IBT, particularmente al C.P. Francisco Arcos, a Minerva, Lupita, Roberto y Dago, pues fue un gusto trabajar con todos ustedes, porque siempre sonrientes y alegres me echaban la mano en tiempos de desesperación y locura con mis famosos pedidos imposibles. Gracias.

A las Irmás y sus muchachas, a Anita y Mayra, quienes hicieron de mi alimentación un festival de sabores, por las excelentes tardes de pláticas, por su amor depositado en los más deliciosos cafés.

A todos mis profesores de la FMVZ, particularmente al Dr. Humberto Ramírez Mendoza, quien motivó mi camino hacia la ciencia y la investigación. Gracias por su confianza en mí.

A todos los cuates de la Facultad, pero sobre todo a Paula y Ponchito, Adri, Nany, La tía, Itzel, Isaky, Francesc (Pacorro) y a mi querido club de fans Xime y Nallely, Gracias a todos por compartir momentos tan divertidos durante el estudio de la carrera...

To Grumpy Pitufu, to whom I will not give the satisfaction of reading my writing in English except for these 3 lines. For further translations, please ask The Author in a more appropriate place. Gracias por llegar a mi vida tan inesperada y sorpresivamente, seguramente será todo un proceso conocerte, pero creo que estoy dispuesta a vivir esta nueva aventura junto contigo. Gracias por ser tan espontáneo y divertido, por cuidarme y quererme. Miles de "chiquitos-besos" y mucho amor.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Generalidades de las arañas.....	2
1.2 Morfología.....	3
1.2.1 Prosoma o cefalotórax.....	3
1.2.2 Opistosoma o abdomen.....	5
1.3 Taxonomía.....	7
1.4 Género <i>Loxosceles</i>	8
1.4.1 Comportamiento y Hábitat.....	9
1.4.2 Distribución y Epidemiología.....	10
1.4.3 Componentes del veneno.....	11
1.4.4 Esfingomielinasa D efectos biológicos e inmunocelulares.....	14
1.4.5 Loxoscelismo.....	18
1.4.5.1 Loxoscelismo cutáneo.....	19
1.4.5.2 Loxoscelismo viscerocutáneo (sistémico).....	20
1.5 Isoformas de SMD de <i>Loxosceles boneti</i> y Toxina recombinante....	21
1.6 Historia de los antivenenos.....	22
1.6.1 El caballo, modelo animal para la producción de antivenenos....	24
1.7 Diagnóstico y Tratamiento del loxoscelismo.....	27
1.7.1 Tratamiento inespecífico o de soporte.....	27
1.7.2 Tratamiento específico.....	28
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	29
2.1 Justificación.....	29
2.2 Objetivo.....	29
2.2.1 General.....	29
2.2.2 Particulares.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Estrategia Experimental.....	31
3.2 Materiales.....	31
3.2.1 Suero hiperinmune.....	31
3.2.2 Enzimas.....	32
3.2.3 Sustratos.....	32
3.2.4 Otros reactivos.....	33
3.2.5 Kits.....	33
3.2.6 Equipo.....	34
3.2.7 Soluciones y Buffers.....	35
3.2.7.1 Buffers Generales.....	35
3.2.7.2 Buffers para cromatografías.....	36
3.2.7.3 Buffers para electroforesis en geles de poliacrilamida.....	36
3.2.7.4 Buffers para actividad e inhibición enzimática.....	38
3.2.8 Programas o software computacional.....	38

3.3 Metodologías.....	39
3.3.1 Obtención y preparación de derivados de suero hiperinmune de caballo.....	39
3.3.1.1 Precipitación por ácido caprílico.....	40
3.3.1.2 Cuantificación de proteína.....	41
3.3.1.2.1 Por espectrometría a 280 nm.....	41
3.3.1.2.2 Por el método del Ácido Binciconínico (BCA).....	42
3.3.1.3 Diálisis en membranas.....	44
3.3.1.4 Cromatografía de intercambio iónico (FPLC).....	45
3.3.1.5 Concentración de proteínas (Ultrafiltración).....	47
3.3.1.6 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE al 12.5%).....	48
3.3.2 Optimización de la medición de actividad enzimática de esfingomielinasa D recombinante de <i>Loxosceles boneti</i>	50
3.3.2.1 Ensayo de medición actividad enzimática de rLb Tx1 H6C	50
3.3.2.2 Ensayo de medición de actividad enzimática de Peroxidasa de rábano (HRP).....	58
3.3.2.3 Ensayo de medición de actividad enzimática de Colina Oxidasa (ChOx).....	63
3.3.2.4 Ensayo de inhibición de actividad enzimática de rLb Tx1 H6C.....	68
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
4.1 Obtención de derivados de suero hiperinmune.....	75
4.2 Determinación de la actividad enzimática de HRP.....	82
4.3 Determinación de la actividad enzimática de ChOx.....	83
4.4 Determinación de la actividad de Esfingomielinasa D recombinante (rLb Tx 1 H6C).....	87
4.5 Determinación de la Dosis Efectiva Media (DE50) de cada derivado de suero hiperinmune.....	91
5. CONCLUSIONES.....	95
6. PERSPECTIVAS.....	97
7. REFERENCIAS.....	98
8. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	104

Abreviaturas

ADHP	Amplex tm red, cromóforo 10 acetil-3,7 dihidrofenoxacina
AU	Unidades de absorbancia
BCA	Ácido binciconínico, método de cuantificación de proteínas
BSA	Albúmina sérica bovina
cbp	Cuánto baste para
ChOx	Colina oxidasa
DE50	Dosis efectiva media
dH ₂ O ₂	Agua destilada
DMSO	Dimetilsulfóxido anhidro, para reconstituir el reactivo ADHP
FPLC	Cromatografía líquida de rápida resolución (fast protein liquid chromatography)
g	Gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG(T)	Inmunoglobulina g isotipo t
IgG	Inmunoglobulina g
IgGa	Inmunoglobulina g isotipo a
IgGb	Inmunoglobulina g isotipo b
IgGc	Inmunoglobulina g isotipo c
kDa	Kilodaltons
l	Litro
Lb	<i>Loxosceles boneti</i>
LPA	Ácido lisofosfatídico
m	Mili
M	Molar
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
mpm	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloruro de sodio
n	Nano
nm	Nanómetros
PBS	Buffer salino de fosfato
pH	Potencial de iones hidronio
rLbTx1H6C	Esfingomielinasa d recombinante de la isoforma 1 del veneno de <i>Loxosceles boneti</i> , con 6 histidinas en el extremo carboxilo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida.
SM	Esfingomielina
SMD	Esfingomielinasa d
rSMD	Esfingomielinasa d recombinante
Tris	Tris-(-hidroxil-)-aminometano base
U	Unidad enzimática
U ^{olemin} ⁻¹	Producción de moles por minuto
μ	Micro

RESUMEN

JIMÉNEZ MARTÍNEZ LUCÍA. Neutralización de esfingomielinasa D recombinante de *Loxosceles boneti* con varias preparaciones derivadas de suero hiperinmune de caballo. (Bajo la dirección del Dr. Alejandro Alagón Cano)

La mayoría de los efectos tóxicos (locales y/o sistémicos) causados por la mordedura de arañas del género *Loxosceles* (*L.*), dependen de la actividad de Esfingomielinasa D (SMD), componente principal de su veneno. El suero hiperinmune de caballo fue desarrollado a partir de una mezcla de toxinas recombinantes (inmunógenos) de 3 especies de *Loxosceles*: *L. reclusa*, *L. boneti*, y *L. laeta*. A través de un ensayo colorimétrico *in-vitro* se optimizó la medición de actividad enzimática de SMD, y se caracterizó la potencia neutralizante o de inhibición del suero hiperinmune de caballo así como diversas fracciones de inmunoglobulinas derivadas del mismo: Derivado de IgGs Totales, Derivado enriquecido de IgG(T), y Derivado enriquecido de IgG (a, b, c) o bien no-IgG(T). El derivado de IgGs Totales se obtuvo por precipitación con ácido caprílico, mientras que los otros dos derivados se prepararon a partir de cromatografías de intercambio iónico (Q-sefarosa). La potencia neutralizante se definió como dosis efectiva media (ED50): La cantidad de suero (en ml) o preparado de inmunoglobulinas (en mg) que inhiben 50% de la actividad enzimática de 1 mg de SMD recombinante de *Loxosceles boneti*.

La ED50 (95 % i.c) para suero, IgGs Totales, IgG(T) enriquecida y no-IgG(T) fue de 0.284_(0.23-0.36)ml, 7.35_(6.41-8.41)mg, 2.1_(1.80-2.50)mg y 18.7_(14.3-24.3)mg respectivamente.

De la potencia neutralizante total e inicial dado por el Derivado de IgGs Totales se recuperó 48.3 y 7.9% con los derivados IgG(T) y No-IgG(T) respectivamente. Estos resultados indican que la capacidad neutralizante o de inhibición de los efectos tóxicos de SMD, radica principalmente en los isotipos IgG(T).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las arañas:

Araña: Del latín “*aranea*” cuyo significado es araña o telaraña, del griego clásico ἀράχνη (*aráchné*)⁴⁴.

Las arañas se distribuyen por todo el mundo, principalmente se encuentran en hábitat terrestres y han conquistado cualquier clase de ambiente ecológico¹⁴. A nivel mundial, su diversidad ha colocado a este grupo en el séptimo lugar dentro de los invertebrados, antecedido por cinco órdenes de insectos y el orden *Acari*⁵. Dentro del *Phylum Arthropoda* (animales con exoesqueleto y patas articuladas), son el orden más abundante, pues se han descrito alrededor de 35,000 especies y se considera que éste número sólo representa una cuarta parte del total^{20,24,25}.

Por su mecanismo y tipo de alimentación basado en otros artrópodos (insectos) o pequeños vertebrados las arañas se consideran carnívoras y depredadoras, lo cual les otorga un papel importante en diversos ecosistemas^{9,14,20,25,27,36}. Sin embargo son animales tímidos, nunca agresivos y sólo infligen mordeduras cuando se alimentan, se ven amenazados, si se les toca violentamente o cuando son presionados, casi siempre de forma accidental⁷.

A excepción de las familias *Uloboridae* y *Holoarchaeidae*, las cuales no poseen glándulas de veneno, todas las arañas deben considerarse venenosas²⁶; sin embargo y de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud⁶², sólo cuatro géneros (y/o especies dentro de éstos géneros) tienen

relevancia clínica por causar envenenamientos severos en humanos, entre ellos : *Phoneutria* sp. “araña platanera”, *Atrax* sp. “arañas embudo”, *Latrodectus* sp. “Viuda negra o capulina” y *Loxosceles* sp. “araña violinista”, siendo éstos dos últimos considerados a nivel mundial como los más peligrosos para el humano^{7,19}.

1.2 Morfología

Como cualquier otro artrópodo, las arañas poseen un exoesqueleto rígido cubierto por una capa de cutícula, el cual está conformado principalmente de quitina (polisacárido compuesto por unidades de N-acetilglucosamina²²), éste da protección y soporte al cuerpo y a los músculos que a él se unen, además de reducir significativamente la pérdida de agua.

El cuerpo de una araña se subdivide en dos secciones, el cefalotórax o prosoma y el abdomen u opistosoma, las cuales están unidas por una estructura llamada pedículo o pedicelo.^{14,20,24,27,36,38}(Figura I).

1.2.1 Prosoma o cefalotórax:

Estructura externa e interna:

Cubierto dorsalmente por el caparacho o caparaza y ventralmente por el *sternum*, los cuales se encuentran conectados por una membrana o *pleura*, que permite el movimiento coordinado entre ambos, anterior al *sternum* se encuentra el *labium*, una pequeña placa que conforma el piso de la boca¹⁴.

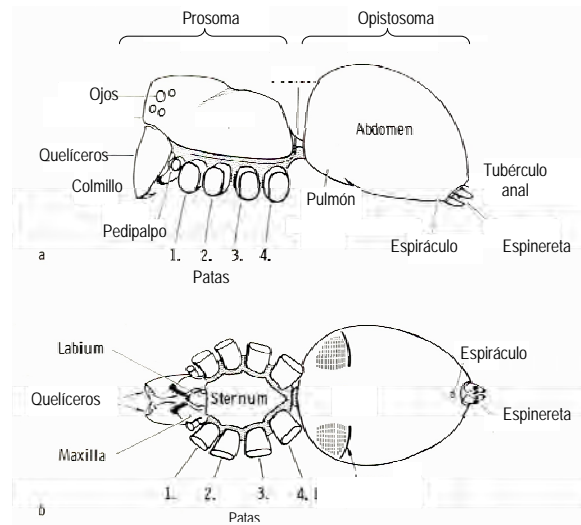


Figura I. Apariencia externa del cuerpo de una araña. a) Vista lateral. b) Vista ventral. Tomado de Foelix, R. F(14)

Entre otros apéndices encontrados en esta región, se encuentran:

*Ojos u ocelos: Ubicados hacia arriba y frontalmente, se disponen por pares, tres o cuatro dependiendo la especie.

Boca: La cual está bordeada lateralmente por los maxilares y ventralmente por el *labium*, ésta se encuentra conectada a la faringe.

*Quelíceros: Son dos y están ubicados en el frente o debajo de la cabeza, según el Orden de la especie. Estos apéndices se constituyen por dos regiones, una basal firme que termina distalmente en un gancho o colmillo articulado. Presentan un conducto que se conecta a una glándula venenosa, lo que facilita la disposición del veneno cuando es inyectado a la presa.

Pedipalpos: Son llamados también palpos y se ubican entre los quelíceros y el primer par de patas. Su función primordial es sensorial o de percepción del medio ambiente, como instrumento de caza y para manipular a la presa. A diferencia de las patas verdaderas éstos apéndices carecen de metatarso y poseen dos modificaciones importantes: la porción distal, o *coxa*,

se transformó en el maxilar, el cual está serrado (*serrula*) para cortar, moler y masticar a la presa, y en las arañas macho son utilizados como instrumento de transferencia de esperma.

Patas: Son 4 pares y están irradiados desde la pleura, entre el caparacho y el *sternum*, cada pata posee siete segmentos: coxa, trocánter, fémur, patela, tibia, metatarso y tarso.

En el interior del cefalotórax (Figura II) se encuentra el sistema nervioso central, representado por los ganglios supraesofágico y subesofágico, un par de glándulas de veneno, musculatura general y parte del tracto intestinal: boca, faringe, esófago y estómago¹⁴.

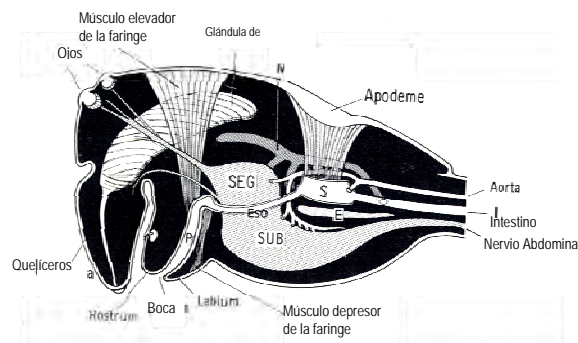


Figura II. Corte longitudinal del cefalotórax. SEG= Ganglio supraesofágico, SUB= Ganglio subesofágico, P= Faringe, S= Estómago. Tomado de Foelix, R.F (14)

*La disposición de éstos apéndices es importante para la clasificación taxonómica de las arañas.

Opistosoma o abdomen.

Estructura externa e interna:

En la superficie dorsal se pueden distinguir 12 segmentos o *tergitos* unidos por una membrana o pleura a los *sternitos*, posicionados de manera

ventral, ambos dan forma y firmeza al abdomen, el que en la mayoría de las arañas es globular, no segmentado internamente, suave y expandible, lo cual les permite el almacén de alimento y el desarrollo de los huevos en el caso de las hembras. Es en esta región se encuentra la musculatura abdominal, las aperturas de los órganos reproductores, así como los sistemas circulatorio y respiratorio, el primero representado por un corazón tubular, el segundo conformado por dos sistemas de uso alternativo: los pulmones “libro” y el espiráculo traqueal; en la parte postero-dorsal del abdomen se encuentra el tubérculo anal a través del cual se excretan los desechos, y anterior a éste se encuentran las hileras o espineretas cuya función es la secreción de la seda¹⁴ (Figura III).

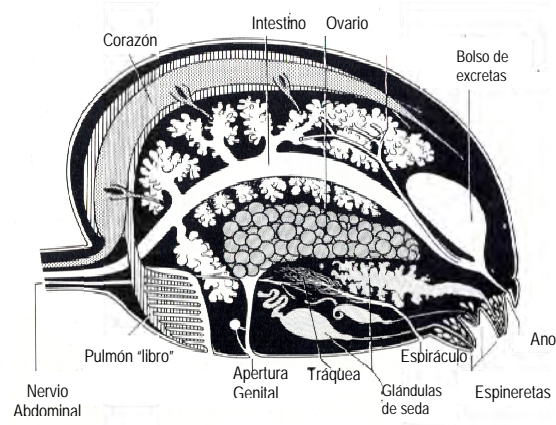


Figura III. Opistosoma de una araña hembra, corte lateral. Tomado de Foelix, R.F,(14)

1.3 Taxonomía

En el presente los taxonomistas reconocen 34,000 especies de arañas las cuales han sido agrupadas en 100 familias^{14,26,39}. A continuación se presenta la clasificación taxonómica de las arañas presentada por Foelix, R. F.¹⁴ y Quintana, J.C.³⁹:

Cuadro A. Taxonomía de las arañas. Tomado del Foelix, R.F(14) y Quintana, J.C. (39)

Reino:	<i>Animalea</i>		
Phylum:	<i>Arthropoda</i>		
Subphylum:	<i>Chelicerata</i>		
Clase:	<i>Arachnida</i>		
Orden:	<i>Aranea</i>		
Suborden:	<i>Mesothelae</i>	<i>Orthognata</i>	<i>Labidognata</i>
Infraorden:		<i>Mygalomorphe</i>	<i>Araneomorphae</i>

Como se muestra anteriormente, existen tres subórdenes en la clasificación taxonómica de las arañas; El suborden *Mesothelae* es el grupo de arañas filogenéticamente más antiguo ya que entre otras características primitivas presentan un abdomen claramente segmentado, la única familia en este suborden es Liphistiidae.

El suborden *Orthognata* Infraorden *Mygalomorphae*, es un grupo de arañas que poseen los quelíceros localizados al frente de la cabeza, con un alineamiento casi paralelo, carecen de espinetas medias y las laterales se encuentran reducidas. Dentro de este grupo se encuentran todas las tarántulas agrupadas en 15 familias, 260 géneros, y cerca de 2200 especies.

El suborden *Labidognata*, Infraorden *Araneomorphae*, incluye el 90% de las especies de arañas descritas, conformado por 90 familias, 2700 géneros y alrededor de 30,000 especies. Es aquí donde se agrupan las consideradas “arañas verdaderas”, que poseen la característica de tener los quelíceros por debajo de la cabeza, encontrados entre sí y con mordida lateral (Figura IV). El género *Loxosceles* se clasifica dentro de este grupo.

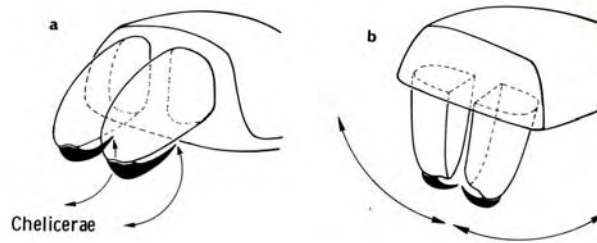


Figura IV. Movimiento de los quelíceros de una araña a) *Orthognata*, b) *Labidognata*.

Tomado de Foelix, R. F¹⁴

1.4 Género *Loxosceles*

Este género pertenece a la familia *Scytodidae*, subfamilia *Loxoscelinae*.

La palabra *Loxosceles* proviene del griego $\lambda\omicron\zeta\omicron\sigma$: curvas y $\kappa\epsilon\lambda\omicron\sigma$: patas,^{7,44} debido al aspecto curvo de las patas que estas arañas poseen. Sin embargo, la característica más representativa de estas arañas es el patrón de coloración del cefalotórax dorsal, en el cual se distingue la forma de un violín, por ello este género ha adquirido el nombre común de “araña violinista” y entre otros, araña café, araña de los rincones, araña homicida⁷.

Estas arañas poseen una coloración café, con diversas tonalidades del mismo dependiendo del estadio y/o de la especie. Son de tamaño medio, en promedio miden de 2 a 4 cm incluyendo las patas, los machos son ligeramente más pequeños. Poseen seis ojos u ocelos dispuestos en tres diadas^{7,9,14,19,27}.

1.4.1 Comportamiento y Hábitat.

De actividad nocturna, su alimentación se basa en pequeños insectos u otros arácnidos, de naturaleza tímida y sedentaria, son sinantrópicas pues se han adaptado a vivir en estrecha cercanía a asentamientos urbanos, tendencia que aumenta en las zonas de climas lluviosos o fríos. Son solitarias, aunque si las condiciones de hábitat son favorables pueden generar infestaciones con numerosos individuos^{7,19,42}.

Dentro de las viviendas es frecuente encontrarla detrás de cuadros o espejos, muebles cercanos a las paredes, ropa sin movimiento frecuente o colgada de las paredes, desvanes, cubre persianas o entre las uniones de los ladrillos^{7,42}.

Los principales lugares fuera de domicilios donde se pueden hallar estas arañas, es en refugios oscuros, secos y aireados, orificios naturales cerca de barrancos, grietas, debajo de troncos de árboles y piedras, en cavernas, bajo pilas de leña o ladrillos^{7,39,42}.

La tela de estas arañas, es utilizada como refugio, más que como trampa, presenta un aspecto algodonoso y desarreglado sin patrón específico alguno. En la parte más densa de la tela se pueden encontrar ootecas (estructuras en las que se depositan los huevos) de formas redondeadas y aplanadas⁷.

De temperamento no agresivo, su comportamiento defensivo se produce cuando no hay alternativa de huida, al ser aplastadas contra el cuerpo, entre los pliegues de la ropa o de las sábanas, por lo cual responderá con su único sistema de defensa que es el mordedura^{7,9,39,42}.

1.4.2 Distribución y Epidemiología.

La distribución de las arañas de este género es mundial, principalmente en regiones templadas o tropicales^{19,26}. América tiene una amplia distribución de las arañas *Loxosceles*, ya que de las 100 especies descritas a nivel mundial, 84 se encuentran en este continente^{15, 37}.

En Norteamérica las especies relacionadas con accidentes humanos son en orden de importancia: *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles arizona* y *Loxosceles deserta*^{6,19}, mientras que en Sudamérica *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* (Brasil), y *Loxosceles laeta* (Brasil, Perú, Chile, Argentina) son consideradas especies de importancia médica¹⁹.

En México se han reportado 39 especies distribuidas a lo largo del país^{37,42}, dentro de las cuales se incluye *Loxosceles boneti*, considerada una de las especies de mayor distribución, con una población abundante en los estados de Guerrero, Puebla y Morelos⁶.

El primer caso documentado de envenenamiento por *Loxosceles* fue en 1879 en Tennessee, USA cuando un hombre de esta región, después de haber sido mordido por una araña desarrolló fiebre, ictericia y hematuria¹⁹.

En 1937, cincuenta y ocho años después, se reportó en Chile otro caso de loxoscelismo el cual fue denominado por Machiavello como “*Mancha gangrenosa de Chile*”, este reporte fue el primer caso en el que se relacionó la necrosis (signo clínico presentado por el individuo afectado) con la mordedura de una araña perteneciente al género *Loxosceles*⁷.

En Estados Unidos de América, en el año de 1957, Atkins reportó accidentes debidos a *Loxosceles reclusa*⁸. En el año 2001, en este mismo país

se documentaron 10,000 probables casos de mordeduras por arañas, de los cuales 2,566 fueron considerados como envenenamientos por *Loxosceles sp.*¹⁹

En Brasil, se describió por primera vez un caso de *loxoscelismo* en 1959⁷ y actualmente el Ministerio de Salud de este país reporta 2100 casos anuales de mordeduras por arañas *Loxosceles* con una gran diversidad en la severidad del cuadro clínico o envenenamiento¹⁹.

En Chile y Perú son pocos los casos registrados de *loxoscelismo*, sin embargo la mayoría de los casos son muy severos (sintomatología sistémica) y son atribuidos a *Loxosceles laeta* la cual es endémica de ambos países¹⁹.

En Argentina los accidentes producidos por las arañas de éste género ocupan el segundo lugar (≈30%) de los accidentes producidos por arañas, lo que representa el 4% del total de accidentes producidos por animales venenosos⁷.

En el caso de México, el reporte epidemiológico de *loxoscelismo* es nulo, en general se reportan de 3000 a 5000 casos anuales por mordedura de araña⁶³. Durante el periodo 1996 al 2006 la Dr. Sánchez Villegas reporta desde el Centro de Información y Asistencia Toxicológica CNMN “La Raza”, veinticinco casos dentro de los cuales 11 niños y 14 adultos resultaron afectados. En ninguno de los casos se determinó el agente causal, sin embargo fueron considerados casos de *loxoscelismo* por la signología clínica presentada⁴⁷.

1.4.3 Componentes del veneno.

Las arañas *Loxosceles* al igual que otras arañas utilizan el veneno para inmovilizar a sus presas y así manipularlas sin ser lastimadas, éstas poseen

glándulas de veneno de secreción apócrina, disgregables, y de poca producción. Se sabe que por estimulación eléctrica y por cada ejemplar se puede obtener un volumen aproximado de 0.15 a 0.45 μ l, con \sim 100 μ g de proteína, mientras que por cada par de glándulas disecadas es posible obtener de 97 a 150 μ g de proteína total⁴⁰.

La composición química de cualquier veneno es cuantitativamente variable lo cual es atribuible en parte a la especie, a la edad, estado fisiológico, y sexo entre otros. En el caso del las arañas del género *Loxosceles* el veneno se compone por una mezcla heterogénea de proteínas así como de componentes no protéicos, cuyo peso molecular se encuentra en un rango de 5 a 60 kDa^{40,41} (Ver Tabla I).

Tabla I. Relación de las fracciones de veneno obtenidas por cromatografía de exclusión molecular (Ramos-Cerrillo 2002)

Fración (Veneno de <i>L. boneti</i>)	Tamaño Molecular Esperado (kDa)	Composición	% Respecto al veneno total (100%= 68.4 mg peso seco)
I	62	Hemocianina	8.39
II	32.5	SMD	19.7
III	16	Proteínas pequeñas	9.74
IV	<16	Acil poliaminas y núcleotidos	62.2

En esta mezcla se encuentran: histaminas, acilpoliaminas, serotonina y ácido gama aminobutírico, enzimas estereasas, hialuronidasas, fosfata alcalina, colagenasas, fosfohidrolasas, ribonucleasas, desoxirribonucleasas, metaloproteasas y esfingomielinasa D^{2, 40, 41, 42}. Aunque se han identificado los componentes principales del veneno aún no ha sido dilucidada algunas actividades o funciones de muchos de ellos, a continuación y de manera general se explicará la función o actividad de algunos:

- Esfingomielinasa D: Principal componente proteico del veneno de las arañas *Loxosceles*, constituye hasta el 50% del material peptídico del veneno, tiene un peso aproximado de 33 kDa. Considerado como único responsable del desarrollo de dermonecrosis en humanos y modelos animales como el conejo, altamente tóxico y letal en ratones^{13,41}. Más adelante se profundizará un poco más sobre los efectos inmunológicos y bioquímicos de la misma.
- Acilpoliaminas: Potentes neurotoxinas paralizantes de insectos ya que son antagonistas de receptores de glutamato. A pesar de no ser considerada dentro de las fracciones tóxicas, ocasionan dolor al ser inoculadas en mamíferos⁴²
- Histaminas: Actúan como un potente vasodilatador.
- Metaloproteinasas: Con un peso molecular entre 20-28 kDa con actividad fibrinogenolítica (Loxosilina A) y con actividad fibronectinolítica (Loxosilina B) ambas descritas en el veneno de *L. intermedia* por Feitosa et al 1998¹⁰.
- Hialuronidasas: Con un peso molecular aproximado de 44 kDa. Hidrolizan el ácido hialurónico presente en la matriz extracelular de tejidos animales, por lo cual se le considera un factor de dispersión ya que facilita la difusión del resto de los componentes del veneno dentro de la víctima^{3,4}.

1.4.4 Esfingomielinasa D, efectos biológicos e inmunocelulares.

Las membranas celulares contienen diferentes clases de lípidos, los cuales se clasifican en dos grandes clases: glicerofosfolípidos (fosfoglicéridos) y esfingolípidos (Figura V). Dentro de los esfingolípidos, se encuentran tres subclases, esfingomielinas, glicolípidos neutrales, y gangliósidos, mismos que en su estructura siempre poseen ceramida y difieren en las cabezas hidrofílicas²².

La esfingomielina un fosfolípido integral, que bien puede contener fosfocolina o fosfoetanolamida como cabeza polar, es abundante en la membrana de muchas células como eritrocitos y células del epitelio vascular, puede representar hasta el 50% de los lípidos de ciertos tejidos, pero casi siempre es menos abundante que la fosfatidilcolina.

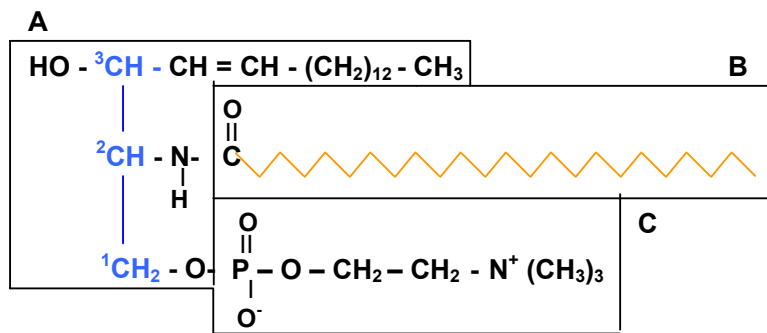


Figura V. Estructura de un esfingolípido. Los primeros tres carbonos en la esfingosina (A), son análogos al glicerol de los glicerofosfolípidos. El ácido graso, puede ser saturado o monoinsaturado con 16, 18, 22, o 24 C (B) se une al grupo amino del C-2 a través de un enlace amido. Los diversos esfingolípidos difieren en la cabeza polar (C) unida a C-1; Aquí se muestra la unión con fosfocolina por lo tanto la estructura presentada corresponde a una esfingomielina.

Las fosfolipasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces éster o fosfodiéster de las cabezas polares de glicerofosfolípidos o esfingolípidos (Figura VI). La “esfingomielinasa D (SMD)” se considera una enzima fosfolipasa tipo D, pues cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster de la esfingomielina, su sustrato²² liberando a partir de éste 1-fosfoceramida⁴⁸ (ceramida-1-fosfato) y colina²¹.

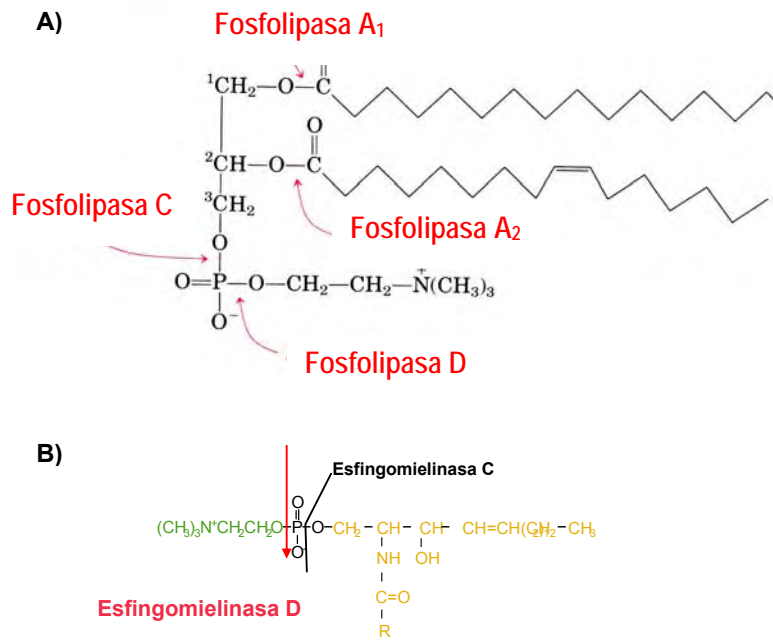


Figura VI. Especificidad de las fosfolipasas. Panel A) Fosfolipasas A₁, A₂ hidrolizan los enlaces éster del glicerofosfolípido en los C-1 y C-2 del glicerol, respectivamente. Fosfolipasas C y D actúan sobre los enlaces fosfodiéster en la cabeza polar, como es indicado. Panel B) Sitio de acción de la SMD sobre la esfingomielina, se indica también el sitio de corte por esfingomielinasa C.

Las esfingomielinasas han sido objeto de estudio desde hace varios años. Se han descrito cinco esfingomielinasas C en tejidos animales: alcalina, ácida, secretora, y Mg²⁺ dependiente e independiente neutras, así como una esfingomielina-fosfolipasa C bacteriana encontrada en diversas especies bacterianas como *Bacillus cereus*, *Listeria ivanovi*, *Leptospira interrogans* *Chromobacterium violaceum*, entre otras¹⁸.

La esfingomielinasa D componente del veneno de arañas *Loxosceles*, no ha sido encontrada en ninguna otra especie perteneciente al reino animal¹⁷, sin embargo existe una exotoxina con actividad de SMD producida por bacterias tales como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, y *C. hemolyticum*, mismas que son patógenas para humanos y animales. A pesar de que tanto la SMD loxoscélica como la bacteriana poseen el mismo peso molecular (32-33 kDa) y comparten hasta un 30% de similitud en sus secuencias aminoacídicas, aun no han sido esclarecidas las bases moleculares que expliquen el desarrollo de tan diversos efectos biológicos, particularmente de la SMD del veneno de las arañas del género *Loxosceles*.

Si bien entonces el mecanismo de acción de SMD se considera un proceso multifactorial que involucra interacciones con la membrana celular así como con la matriz extracelular, promoviendo la activación de complemento, plaquetas, migración de polimorfonucleares, y liberación de citocinas y quimiocinas, alteraciones en los flujos sanguíneo y linfático aunado a los demás componentes del veneno que en menor proporción complementan el desarrollo del cuadro clínico local y/o sistémico^{2,19,54,58} (Figura VII).

En el año de 1984 Rees y colaboradores⁴⁵ propusieron dos hipótesis de cómo la esfingomielinasa D pudiera interactuar con membranas extracelulares: la primera sugiere a la esfingomielina *per se* como un receptor de la enzima, ya que se encuentra de manera abundante en la monocapa externa de la membrana plasmática; la segunda hipótesis sugiere que la esfingomielinasa por su estructura secundaria de carácter anfifílico, se une o adsorbe en la membrana celular, lo cual permite la hidrólisis de la esfingomielina.

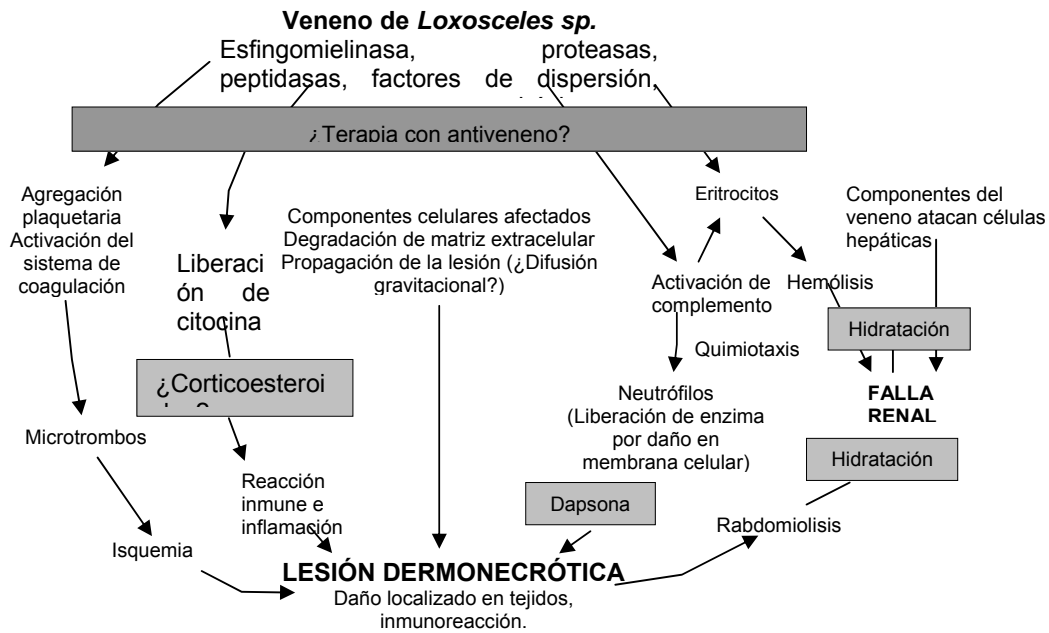


Figura VII. Propuestas de mecanismos de acción del veneno de *Loxosceles* en humano con opciones de tratamiento. Tomado de Hogan et al. 2004¹⁹

Como se ha mencionado anteriormente, no hay certeza ni claridad cuando se enfoca a la esfingomielinasa D como una enzima que genere tal variabilidad y diversidad de efectos biológicos, mucho menos cuando no se considera a la ceramida-1-fosfato (metabolito resultante de la hidrólisis de SMD sobre la esfingomielina de la monocapa externa celular), como una molécula de señalización^{17,58} clásica, en comparación con la ceramida, molécula resultante de la hidrólisis por esfingomielinasas C y a la cual se han atribuido un número importante de funciones biológicas: como regulador del crecimiento y proliferación celular, diferenciación y apoptosis entre otros^{17,28,48}; si bien, recientemente se ha encontrado que la ceramida-1-fosfato tiene efectos muy importantes como un segundo mensajero, regulador de la apoptosis y proliferación celular, implicado en la respuesta inflamatoria y mediador de la fagocitosis¹⁷.

Por otra parte lisofosfatidilcolina (LPC), otro abundante componente del plasma ($\approx 150\mu\text{M}$) y que se encuentra fuertemente unido a albúmina, ha sido estudiado desde hace más de 30 años cuando se descubrió que *C. pseudotuberculosis* era capaz de hidrolizar esta molécula removiendo la colina de su estructura y liberando ácido lisofosfatídico (LPA), el cual actualmente es conocido como un lípido pleiotrópico que actúa en receptores acoplados a proteínas G, y de esta manera induce una serie de respuestas biológicas tales como agregación plaquetaria, hiperpermeabilidad endotelial y demás respuestas proinflamatorias²⁸. Debido a las conocidas funciones del ácido lisofosfatídico varios grupos de investigadores^{29,49,58} descubrieron actividad de lisofosfolipasa D, en presencia de Magnesio²⁺ en los venenos de *Loxosceles laeta*, y *Loxosceles reclusa* lo cual los llevó a la conclusión de que la degradación de LPC a LPA con la consecuente activación de los receptores celulares de LPA, contribuye significativamente en la patofisiología desarrollada por SMD de *Loxosceles*.

1.4.5 Loxoscelismo:

Se define como la condición clínica causada por el veneno de las arañas del género *Loxosceles*.

Existe una fuerte evidencia experimental que indica que la actividad enzimática de SMD es la única responsable de la iniciación de una serie de eventos que dan lugar a necrosis severas (loxoscelismo cutáneo) y en algunas

ocasiones envenenamientos severos de tipo sistémico (loxoscelismo viscerocutáneo) que pueden desencadenar en coma y muerte^{1,13,55}.

Esta evidencia fue demostrada por varios grupos de investigación entre los cuales Tambourghi *et al.* 1995⁵⁴, quien demostró “*in vitro*”, que SMD actúa sobre los eritrocitos dejándolos susceptibles a lisis por activación de complemento; sin embargo la evidencia fehaciente, que caracteriza a SMD como única responsable del desarrollo de Loxoscelismo se encuentra en el estudio de Fernandes-Pedrosa 2002¹³, quien reportó la clonación y expresión de una SMD activa de *Loxosceles laeta*, la cual conservó la actividad enzimática única y necesaria para desencadenar el desarrollo de necrosis en animales experimentales. Esta necrosis en cambio, fue abolida, cuando se incubó el veneno completo o la SMD recombinante con el antisuero generado contra la toxina recombinante.

1.4.5.1 Loxoscelismo cútaneo (local)

Es la manifestación más frecuente (85 a 97% en los casos reportados) en el envenenamiento por *Loxosceles spp.* La mordedura de las arañas de este género pasa desapercibida en la mayoría de los casos. Pocas horas después del accidente (2 a 6 horas) en el sitio afectado se desarrolla un dolor intenso, característico del envenenamiento por estas arañas, junto con signos como edema y eritema localizado, éste último puede evolucionar hacia el tercer o cuarto día como una placa bien delimitada de tipo eritematosa o “marmórea” caracterizada por áreas equimóticas que alternan con áreas pálidas o isquémicas. Hacia el quinto o séptimo día dicha placa puede evolucionar a la

formación de una costra necrótica (escara), la cual se desprende por los bordes y luego de su caída deja al descubierto una úlcera de bordes irregulares, susceptible a infecciones por organismos oportunistas. La cicatrización es lenta y de segunda intención; en ocasiones es tan severo el daño que son requeridos injertos de piel para reparar el área afectada^{7,19,42,55}.

Acompañando al loxoscelismo cutáneo, en algunas ocasiones, se pueden presentar sintomatologías de tipo leve o transitorio tales como fiebre, escalofrío, cefálea, náusea y/o vómito, sudoración y exantema entre otros^{7,42,55}.

1.4.5.2 Loxoscelismo viscerocutáneo (sistémico).

Esta condición se presenta casi siempre acompañada de la presentación cutánea^{8,9,19}, con una alta incidencia en la población pediátrica¹⁹ con la presentación usual de fiebre y artralgia observadas en el cuadro cutáneo del loxoscelismo. Esta variante clínica puede presentarse entre 6 y 24 horas posteriores a la mordedura, y raramente a las 48-72 horas post accidente. Son característicos signos como hemólisis, hematuria, hemoglobinuria e ictericia, anemia, la aparición de petequias y equimosis se pueden relacionar con el desarrollo de coagulación intravascular diseminada (CID). Los casos graves evolucionan a insuficiencia renal aguda de etiología variada: disminución de la perfusión renal, hemólisis masiva, hemoglobinuria, acción de las metaloproteínas que degradan la matriz extracelular y dañan la integridad de las membranas basales de los vasos sanguíneos del riñón y CID, lo que puede conducir a la muerte del individuo afectado⁷.

1.5 Isoformas de SMD de *Loxosceles boneti* y Toxina recombinante

Con el objetivo de saber más sobre la toxicidad del veneno de las arañas del género *Loxosceles*, y ante el conocimiento de la SMD como único responsable de la presentación de cuadros clínicos locales o sistémicos observados en humanos y algunos modelos animales, varios grupos de investigación han purificado y caracterizado, a partir de venenos de diferentes especies de este género, isoformas funcionalmente activas que comparten un porcentaje de identidad en la secuencia aminoacídica de 40-90%^{2,16,40,41} (Tabla II).

Un factor limitante para el estudio y caracterización de SMD es la obtención de grandes cantidades de veneno, ya que de manera práctica se realiza por extracción glandular, estimulación eléctrica, y/o macerado del prosoma lo cual implica una gran cantidad de especímenes. Ante tal limitante se ha recurrido a técnicas de expresión de proteínas recombinantes.

En el caso de SMD de *Loxosceles boneti*, fueron caracterizadas por Ramos-Cerrillo, 3 isoformas, de las cuales las isoformas 1 y 2 presentaron actividad de SMD, mientras que la isoforma 3 no mostró actividad. La isoforma 1 resultó ser la más abundante y la de mayor actividad específica, seguida por la isoforma 2. Los genes codificantes para esta isoforma fueron clonados y expresados como proteínas recombinantes mismas que han mostrado una actividad enzimática y biológica comparables a las isoformas nativas. La purificación de esta proteína se realizó por cromatografía de afinidad en una

columna de agarosa acoplada a níquel, ya que se incluyeron seis histidinas en el extremo amino o carboxilo de la SMD^{40,41}.

Tabla II. Porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídicas de diversas SMD de arañas *Loxosceles* en relación a la isoforma 1 de *L. boneti*.

Nombre (isoforma)	Identidad (%)	Referencia
<i>L. boneti (1)</i>	100	Ramos-Cerrillo et al. 2004
<i>L. boneti (2)</i>	94	Ramos-Cerrillo et al. 2004
<i>L. boneti(3)</i>	36	Ramos-Cerrillo et al. 2004
<i>L. reclusa</i>	91	Barbaro et al. 1996 ²
<i>L. gaucho</i>	58	Barbaro et al. 1996 ²
<i>L. deserta</i>	94	Gomez et al. 2001 ¹⁶
<i>L. laeta</i>	55	Barbaro et al. 1996 ²

1.6 Historia de los antivenenos.

El desarrollo de la inmunología y los avances en la seroterapia han estado muy ligados, de ahí que la producción de “anticuerpos terapéuticos” para tratar envenenamientos puede ser dividida en tres principales etapas^{1,7,32}.

1ª Etapa (Antivenenos de primera generación):

Inicia cuando en 1890 fueron descubiertos los anticuerpos por Behring y Kitasato, al demostrar que el suero (porción fluída de la sangre coagulada) de animales inmunizados con toxina diftérica o tetánica contenía “agentes protectores” que inhibían la aparición de enfermedad, “fenómeno” que fue comprobado tanto en animales como con un niño de padecía difteria.

En París en el año 1894, Emilio Roux utilizó un antitoxina diftérica producido en caballos, de igual manera Albert Calmette, C. Phisalix y G. Bertrand demostraron la utilidad de los sueros equinos en el tratamiento de los individuos mordidos por serpientes europeas y cobras asiáticas. El problema

de esta terapia, surge con la presentación de reacciones alérgicas o de hipersensibilidad tipo I (anafilaxia) aunado muchas veces al desarrollo de hipersensibilidad tipo III (“enfermedad del suero”).

2ª Etapa (Antivenenos de segunda generación):

Ésta, corresponde al desarrollo de metodologías de fraccionamiento o separación del suero hiperinmune a través del uso de diversas sales o agentes precipitantes con el objetivo de obtener inmunoglobulinas (Figura VIII) y descartar aquéllas proteínas o componentes séricos de nula importancia terapéutica o bien capaces de inducir reacciones alérgicas, como es el caso de la albúmina. Los productos enriquecidos y constituidos por inmunoglobulinas corresponden a la seroterapia de segunda generación, la cual fue un gran avance para el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo aun se asocian a reacciones de hipersensibilidad.

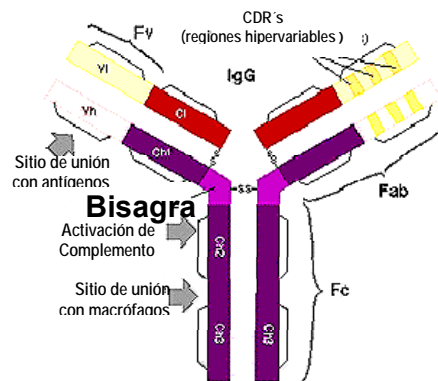


Figura VIII. Representación esquemática de una inmunoglobulina G. **Fab**, “Fragment antigen binding”, es el sitio de unión con el antígeno, ambos brazos son idénticos y **Fc**, “Fragment crystallizable”, esta zona interactúa con moléculas o células efectoras.

Tercera Etapa (Antivenenos de tercera generación):

Inicia en la década de los 40-50's, cuando se estudió el efecto de diversas enzimas proteolíticas sobre las inmunoglobulinas. La modificación proteolítica

reduce el tamaño de las inmunoglobulinas así como sus propiedades antigénicas e inmunogénicas, por lo cual se obtienen fragmentos inmunoglobulínicos tipo $F(ab')_2$ o Fab (Figura IX), los cuales mantienen su potencia neutralizante y han erradicado prácticamente las reacciones de hipersensibilidad (anafilaxia o enfermedad del suero). Es en esta etapa y hace unos cuantos años, cuando el Doctor Alejandro Alagon Cano introduce los términos de “Faboterapia” y “Faboterápico”, con el fin de reemplazar los de seroterapia o antisuero, ya que éstos eran asociados por médicos y pacientes a reacciones secundarias de alta peligrosidad.

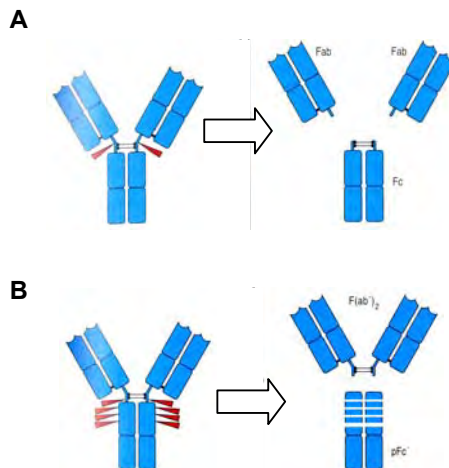


Figura IX. Efecto de dos enzimas proteolíticas sobre IgG. A) Papaína, obtención de 2 fragmentos Fab y un Fc B) Pepsina, obtención de 1 $F(ab')_2$ y pequeñas piezas de Fc. Tomado de Immunobiology 5ª ed. de Charles A. Janeway

1.6.1 El caballo, modelo animal para la producción de antivenenos.

Los sueros hiperinmunes (SH) se pueden producir en caprinos, ovinos e incluso gallinas para extraer anticuerpos o inmunoglobulinas de uso terapéutico, sin embargo, el animal tradicional de uso para la fabricación de estos productos es el equino, ya que en comparación con los otros animales,

éstos son buenos productores de anticuerpos, pueden ser sangrados en volúmenes importantes, son fácilmente condicionados para ser manejados, y pueden servir como productores de SH por muchos años⁶.

El uso frecuente de los caballos como productores de antivenenos ha motivado el estudio y la investigación de los anticuerpos terapéuticos (inmunoglobulinas G principalmente) que se encuentran en el mismo⁵⁹, así como el papel que juegan en la neutralización de toxinas de diversos venenos animales¹¹.

Desde hace más de 20 años, se han descrito cuatro isotipos de inmunoglobulinas G (IgG) en el suero y otros fluidos corporales de los caballos las cuales han sido designadas como IgGa, IgGb, IgGc⁵⁹, e IgG(T)⁶¹ por sus propiedades electroforéticas^{11,12,51,52,57,59}, sin embargo, y a pesar de la larga experiencia en las terapias con antivenenos, se conoce relativamente poco sobre los isotipos de IgGs del caballo y el papel que desempeñan en la neutralización de diversas toxinas o venenos animales, pese a que idealmente sólo los isotipos efectivos (en términos de capacidad neutralizante o inhibitoria de actividades tóxicas) deberían ser administrados a individuos con envenenamiento^{11,12}.

Recientemente la Dra Wagner, B. (2006)⁵⁹ designó una nueva nomenclatura de tipo numérica a estos isotipos de inmunoglobulinas, de acuerdo a los genes que codifican la cadena pesada (IGHC), siendo siete los genes codificantes de los cuatro isotipos (Tabla III). Estos isotipos se encuentran en diferentes concentraciones y en diversos fluidos corporales en equinos adultos sanos (Tabla IV).

Tabla III. Nomenclatura de inmunoglobulinas de acuerdo al gen codificante de la cadena pesada constante. Tomado de Wagner, B. 2006⁵⁸.

Nomenclatura original	Gen codificante	Nomenclatura actual
IgGa	IGHG1	IgG1 o IgG2
IgGb	IGHG4	IgG4
IgGc	IGHG6 o IGHG7	IgG6 o IgG7
IgG(T)	IGHG3 o IGHG5	IgG3 o IgG5

El isotipo IgG(T) o bien IgG 3-5, es de particular interés ya que éste se produce en grandes cantidades en caballos hiperinmunizados^{60,61} y es considerado como un isotipo que juega un papel mayoritario y altamente eficiente en la capacidad neutralizante de los antivenenos^{7,11,12,30,57}. A este mismo isotipo (IgG(T)) se han asociado otras características biológicas tales como que no fijan complemento, no intervienen en reacciones de hipersensibilidad mediada por células, no son precipitantes (solamente co-precipitan en presencia de otros isotipos de IgG) y son altamente glicosiladas⁷.

Tabla IV. Distribución de inmunoglobulinas (mg/ml) secretadas en diversos fluidos corporales de caballos sanos. Tomado de Wagner 2006.

Fluido corporal	IgG1	IgG4	IgG3+IgG5	IgG6
Suero	3.40 ± 0.60	19.2 ± 5.20	4.00 ± 2.50	0.20 ± 0.10
Lágrimas	0.16 ± 0.03	-	0.03 ± 0.03	-
Calostro	82.0 ± 44.00	183.0 ± 38.0	44.0 ± 25.00	0.30 ± 0.10
Leche (Día 1)	1.60 ± 1.00	3.1 ± 1.6	0.80 ± 0.60	0.06 ± 0.06

Los antivenenos se producen actualmente en muchos laboratorios alrededor del mundo⁵⁶ con diferentes protocolos de inmunización y metodologías de purificación de inmunoglobulinas. Algunos grupos de investigación han profundizado el estudio y la purificación de los isotipos inmunoglobulínicos, en particular la IgG(T). Tal es el caso del grupo de Fernandes *et al*^{11,12} quienes demostraron que el isotipo IgG(T) fue el de

mayor capacidad protectora contra los efectos tóxicos y letales del veneno producido por varias especies vipéridas de la familia de crótalos. Por otra parte el grupo de Flávia Toro *et al*⁵⁷, demostró que este mismo isotipo fue capaz de neutralizar los efectos tóxicos de los venenos de *Loxosceles gaucho* (araña violinista), *Phoneutria nigrivinter* (araña del banano) y *Tityus serrulatus* (escorpión amarillo).

1.7 Diagnóstico y Tratamiento del loxoscelismo.

El diagnóstico de loxoscelismo es de difícil evaluación, ya que en la mayoría de los casos no se cuenta con la evidencia del espécimen causal que originó el padecimiento, por ende, en la mayoría de los casos es tardío y a través de la signología clínica presentada por el individuo afectado⁸.

Aún no existe un criterio unánime en el tratamiento del loxoscelismo, sin embargo se ha dividido en dos vertientes:

1.7.1 Tratamiento inespecífico o de soporte

Involucra todas aquellas herramientas terapéuticas que minimizan las reacciones de tipo inflamatorias, entre las cuales se encuentran:^{9,19,35,42,63}

- Antinflamatorios de tipo local o sistémico
- Antihistamínicos:
- Analgésicos
- Antibióticos
- Transfusiones
- Diálisis

1.7.2 Tratamiento específico: Referido al uso de antivenenos.

A) En Sudamérica existen 3 tipos de antivenenos:³⁵

- 1) Antiloxoscélico: Elaborado en Paraná, Brasil por el “*Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos*”. Contiene anticuerpos F(ab')₂ contra los venenos de *L. gaucho*, *L. laeta* y *L. intermedia*.
- 2) Antiaracnídico: Elaborado en São Paulo, Brasil por el “*Instituto Butantan*”. Contiene anticuerpos tipo F(ab')₂ contra los venenos de *L. gaucho*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatus* y *T. bahiensis*.
- 3) Antiloxoscélico: Elaborado en Lima, Perú, por el “*Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Salud*”. Se trata de solución de inmunoglobulinas obtenidas a partir del suero de equinos hiperinmunizados con veneno de *L. laeta*.

B) En México, todavía no existe de manera comercial un antiloxoscélico, sin embargo está en vías de obtener su licenciamiento el producto **Loxmyn®** el cual es un Faboterápico tipo F(ab')₂, único en su clase ya que fue producido por inmunizaciones en caballos con las toxinas recombinantes de SMD de *L. laeta* (Perú), *L. reclusa* (EE.UU.) y *L. boneti* (México). El uso de estas tres toxinas recombinantes asegura que es un producto de uso para todo el continente americano¹.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

El faboterápico “Loxmyr®” producido inicialmente como un suero antitoxina recombinante de tres especies del género *Loxosceles sp.*, constituye un modelo experimental para evaluar las capacidades neutralizantes de los diversos preparados derivados del mismo, en general de las inmunoglobulinas G, y en particular del sub-isotipo de inmunoglobulinas G(T). Para la evaluación de la capacidad neutralizante es necesaria la optimización del protocolo de medición e inhibición de la actividad de esfingomielinasa D, tanto en venenos crudos como con toxinas recombinantes.

El conocimiento de la distribución de la actividad neutralizante de las dos fracciones de inmunoglobulinas, pudiera resultar importante para el futuro mejoramiento de Loxmyr®.

2.2 Objetivos

2.2.1 General:

Evaluar la capacidad de neutralización de la actividad de esfingomielinasa D recombinante de *Loxosceles boneti* con varias preparaciones derivadas de suero hiperinmune de caballo.

2.2.2 Particulares:

* Obtención y preparación de derivados de suero hiperinmune de caballo:

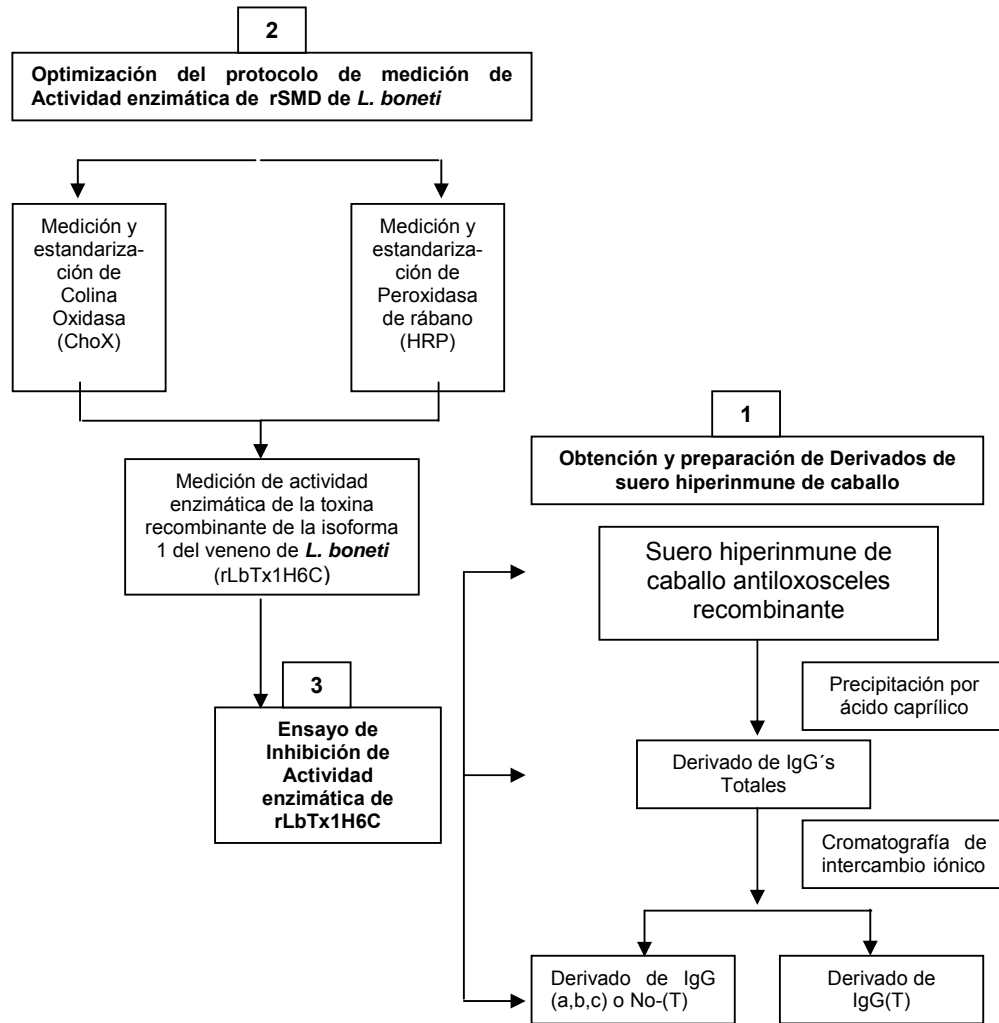
- Derivado de Inmunoglobulinas G Totales
- Derivado de Inmunoglobulinas G (T)
- Derivado de Inmunoglobulinas G (a, b, c) o bien No-IgG(T)

* Optimización del ensayo de medición de actividad enzimática de SMD con rLbTx1H6C

* Inhibición de actividad neutralizante con cada uno de los derivados, incluyendo suero hiperinmune de caballo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estrategia Experimental



3.2 Materiales:

3.2.1 Suero hiperinmune de caballo antiloxosceles recombinante de *L.boneti*, *L.reclusa*, *L.laeta*:

Fue proporcionado por el Instituto Bioclon S.A. de C.V. Proviene de cinco caballos inmunizados por vía subcutánea con una mezcla de toxinas recombinantes de tres especies de *Loxosceles*: *L. boneti*, *L. reclusa*, *L. laeta*. Se inició con una dosis de 1.5 µg y se fue incrementando esta cantidad hasta 60 µg. En el transcurso de tres meses se utilizaron alternadamente adyuvante completo e incompleto de Freund así como hidróxido de alúmina. Este suero contiene CRESOL un agente antimicrobiano.

3.2.2 Enzimas:

- Esfingomielinasa D recombinante de *Loxosceles boneti* [rLb Tx1 (H6C)]. Producida en nuestro laboratorio, es la proteína recombinante de la isoforma 1; Posee una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal.
- Colina Oxidasa de *Alcaligenes sp* (ChOx). Sigma-Aldrich. # Cat: 5896. Frasco de 50 U, donde U está definida como 1 µmole de H₂O₂ producido por minuto a partir de colina.
- Peroxidasa de rábano (HRP). Sigma-Aldrich. # Cat: 77335, P.M. 40 kDa, 502 U/mg, donde U está definida como 13.62 µmole purpurogalina producida por minuto a partir de pirogalol.

3.2.3 Sustratos:

- Esfingomielina de huevo (SM) SigmaAldrich. # Cat. S0756 P.M. 703.04.

- Amplex Red[®](AR): Invitrogen-Molecular Probes. # Cat. A1222. P.M. 257.25. También recibe el nombre de 10-acetil-3,7 dihidrofenoxazina.
- Perhidrol[®]30% (H₂O₂) MERCK # Cat. 7210. P.M. 34.01.
- Cloruro de colina (Cl) SigmaAldrich[®] # Cat. C1879. P.M. 139.6. También recibe el nombre de Cloruro de 2-Hidroxietiltrimetilamonio.

3.2.4 Otros reactivos:

- Ácido caprílico (AC): SigmaAldrich. # Cat: C2875. P.M. 144.21.
- Albúmina Sérica Bovina Fracción V (BSA). Roche. # Cat. 10735086001 P.M. 68 kDa.
- Tritón TM X-100, Scintillation Grade. Eastman Kodak Company # Cat. 9002-93-1.
- TEMED Merck [®].# Cat 1.10732.0100 P.M. 116.21. También recibe el nombre de N,N,N',N'-Tetra-metiletilén diamina.
- Marcador de proteína New England BioLabs[®] Inc. # Catálogo P7708S Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa).
- Etanol absoluto, Merck. #Cat 1.00983.2500. P.M. 46.07.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) Merck # Cat. 802912. P.M. 78.13.

3.2.5 Kits:

- Micro BCA Protein Assay Kit. PIERCE[®]. # Cat. 23227. Para cuantificación de proteínas.

- Mini-Protean III. Bio-Rad. # Cat. 108BR. Equipo de Electroforesis de proteínas.

3.2.6 Equipo:

- Columna Mono-Q Sefarosa: Pharmacia LKB Biotech ®. HiLoad™ 16/10 High Performance. Código: 17-1064-01. Intercambio aniónico fuerte, grupos cuaternario de amonio. Dimensiones: diam (mm) X h (mm) = 16 X100. Volumen: 20 ml. Capacidad de pegado: 60 mg/ml de gel.
- Equipo FPLC Pharmacia LKB Biotech.
- Graficador Linear 1200.
- Membranas de diálisis Sigma-Aldrich, # Cat. D-9277. (10, 100, 175 ml/ft.)
- Espectrofotómetro: Eppendorf-Biophotometer.
- Espectrofotómetro: UV-Vis Agilent Technologies.
- Celda o cuveta negra de 1 cm. Beckman.
- Lector de Elisa: TECAN-SUNRISE® para placas de 96 pozos.
- Potenciómetro: Denver Instrument.
- Centrifugas: Beckman y Eppendorf 5415C
- Rotores. J2-21, GS-15R.
- Agitador Bell-Stir® (MultiStirss) Bellco Glass Inc.
- Balanza analítica: Ohaus Adventurer.
- Balanza Ohaus Precision Estándar.
- Sistema de ultrafiltración AMICON. Modelo 8050. Capacidad: 50 ml P. máx: 75 psi o 5.3 Kg/cm².

- Sistema de filtración Millipore®.
- Membranas de ultrafiltración AMICON-MILIPORE. De celulosa regenerada. Diámetro de 44.5 mm. Límite de corte: 10 kDa.
- Tubos Eppendor de 1.5 y 2 ml.
- Tubos Falcon® de 15 y 50 ml.
- Tubos COREX® de 30 ml.
- Pipetas “Pasteur” Corning.
- Placas NUNC, Maxisorp de 96 pozos de fondo plano (Bottom Imuno Plate).
- Incubadora Lab Line Imperial Incubator.
- Reservorios: Corning Incorporated para 50 ml.

3.2.7 Soluciones y *Buffers*:

Los reactivos utilizados para la preparación de soluciones y buffers fueron adquiridos de los fabricantes: JTBaker, Research Organics, Merck, BioRad.

3.2.7.1 Generales:

- PBS 10X (**1.37 M NaCl, 0.026 M KCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.0176 M KH₂PO₄**). Disolver 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.4 g Na₂HPO₄, 2.4 g KH₂PO₄, en 500 ml de agua destilada (dH₂O), ajustar pH a 7.4 con NaOH (10 N) y aforar a un litro.
- PBS 1 X: Diluir 100 ml de buffer PBS 10X en 900 ml de agua destilada.

- 1 M Tris HCl pH 7.5: Disolver 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua destilada, ajustar pH con HCl concentrado (11.6 N), aforar a 1 litro.
- 1 M MgCl₂. Disolver 203.30 g en 1 litro de dH₂O.
- 1 M de ácido acético: Diluir 57.47 ml de 17.4 M ácido acético en 1 litro de agua destilada.

3.2.7.2 Soluciones (“Buffers”) para cromatografía:

- Fase móvil (A): **25 mM Tris HCl pH 7.5** : Disolver 3.03 g de Tris base en 800 ml de agua tetradestilada ajustar pH con HCl concentrado (11.6 N) , aforar a 1 litro, con agua tetradestilada y filtrar.
- Buffer de elución (B): (**25 mM Tris HCl pH 7.5 + 1 M NaCl**): Disolver 3.03 g de Tris base y 58.44 g de NaCl en 800 ml de agua tetradestilada ajustar pH con HCl concentrado (11.6 N), y aforar a 1 l con agua tetradestilada y filtrar.
- Etanol al 30%: 300 ml de etanol aforar a 1 litro con agua tetradestilada y filtrar.

3.2.7.3 Buffers para electroforesis, en geles de poliacrilamida.

- Solución de acrilamida (**Acrilamida al 30% + bis-acrilamida al 0.8%**)
Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 g de bis-acrilamida, aforar a 165 ml con dH₂O.

- Buffer separador (**1.5 M Tris HCl pH 8.8 + SDS al 0.4%**). Disolver 18.17 g de Tris base y 2 ml de 20% SDS en 50 ml de d_4H_2O , ajustar a pH 8.8 con HCl concentrado (11.6 N) y aforar a 100 ml.
- Buffer concentrador (**0.5 M Tris HCl pH 6.8 + SDS al 0.4%**): Disolver 6.06 g de Tris base y 2 ml de SDS al 20%, en 20 ml de d_4H_2O ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado (11.6 N) y aforar a 50 ml.
- Buffer de corrida 10 X (**0.25 M Tris base, 0.19M Glicina, 0.1% SDS pH 8.6**). Disolver 15.2 g de Tris, 72.1 g de glicina, 25 ml de 20% SDS, en 300 ml de d_4H_2O , ajustar pH a 6.8 con NaOH (10 N) y aforar a 500 ml.
- Buffer desnaturalizante 5X: (**25% glicerol, 6.25%SDS, 125mM Tris HCl pH 6.8, 12.5% 2 β -mercaptoetanol, 0.005% azul de bromofenol**). Disolver 2.5 ml de glicerol, 3.125 ml de SDS al 20%, 1.25 ml de Tris H Cl pH 6.8, 1.25 ml de 2 β -mercaptoetanol, y 0.5 ml de azul de bromofenol al 1% en 10 ml de d_4H_2O .
- Persulfato de amonio al 10% (PSA): Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 ml de d_4H_2O .
- Solución de tinción (**25% Isopropanol, 10% ácido acético 0.2% Azul de Coomasie R250**): Disolver 1 g de Azul de Coomasie R250 y 50 ml de ácido acético en 125 ml de isopropanol, aforar a 500 ml con d_4H_2O .

- Solución de destañido (**Isopropanol 10%, ácido acético 10%**): Disolver 50 ml de isopropanol y 50 ml de ácido acético, aforar a 500 ml con d_4H_2O .

- Solución de secado (**Etanol 30%**): Disolver 150 ml de etanol en 500 ml de d_4H_2O .

3.2.7.4 Buffers para actividad e inhibición enzimática :

- Buffer de reacción 5X (**0.5 M Tris HCl + 50 mM MgCl₂ pH 7.5**): Disolver 60.55 g Tris base y 10.17 g MgCl₂ en 800 ml de d_4H_2O , ajustar pH con HCl concentrado (11.6 M), aforar a un litro.

- Buffer de reacción 1X-BSA (**0.1 M Tris HCl + 10 mM MgCl₂ + 4 mg/ml de BSA**): Disolver 60 mg de BSA en 3 ml de buffer de reacción 5X, aforar a 15 ml con d_4H_2O .

- Buffer 1X (**0.1 M Tris HCl pH 7.5**): De acuerdo al volumen requerido diluir 5 veces el Buffer de reacción 5X en d_4H_2O .

3.2.8 Programas o software computacional:

- MAGELLAN
 - Prism 4 for Macintosh. Versión 4.0b. GraphPad Prism® Software. Inc. 1994-2004
 - Microsoft® Excel X para Mac. 1985-2001.
 - Microsoft® Word X para Mac. 1983-2001

3.3 Metodologías:

3.3.1 Obtención y preparación de derivados de suero hiperinmune de caballo. La metodología realizada para cumplir este objetivo se ilustra en la

Figura 1. A continuación la explicación del mismo:

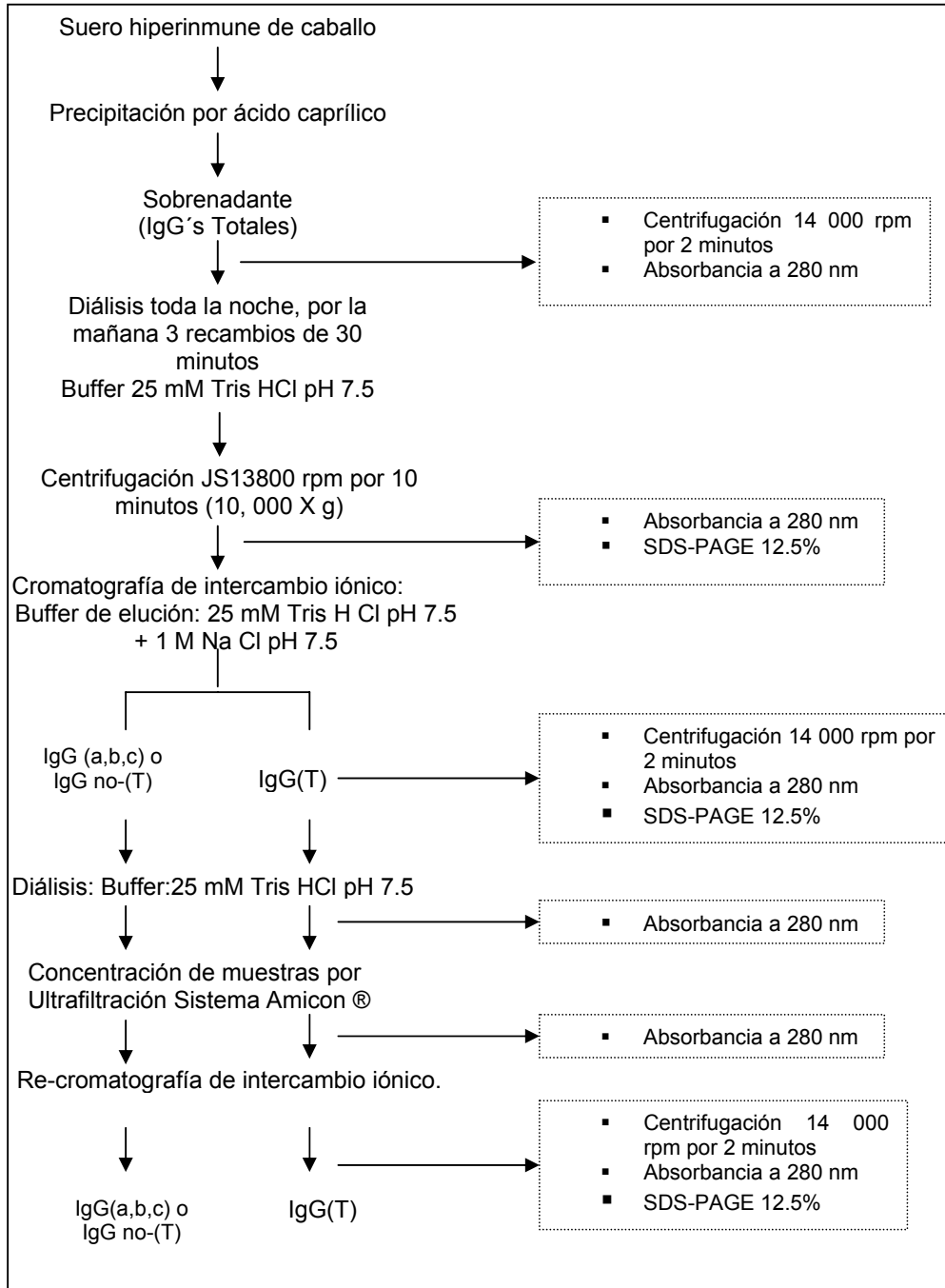


Figura 1. Metodología realizada para la obtención de derivados de suero hiperinmune

3.3.1.1 Precipitación por ácido caprílico.

A pesar de que aún no se conocen las bases moleculares de este tipo de fraccionamiento o purificación, se ha demostrado que el uso del ácido caprílico precipita proteínas séricas pero no inmunoglobulinas, por lo tanto el sobrenadante queda como un derivado enriquecido en IgG.

Siguiendo un protocolo modificado del original de Rojas-Jiménez (1993)⁴⁶ se procedió de la siguiente manera; A un volumen de 15 ml de suero hiperinmune de caballo (Bioclon), se le ajustó el pH a 5.8 con 1M ácido acético; posteriormente se agregó ácido caprílico en una proporción de 6% v/v (en este caso 0.9 ml), en un periodo de 15 min y bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente. La agitación continuó durante 1 hora. La muestra fue centrifugada a 8000 rpm durante 10 min. Posteriormente se decantó y filtró el sobrenadante (membrana Whatman GP/A) y se dializó toda la noche. A la mañana siguiente se realizaron 3 recambios de media hora cada uno con buffer de Tris HCl 25 mM pH 7.5.

Es hasta este momento cuando obtenemos un preparado derivado de suero enriquecido en inmunoglobulinas G o “Derivado de IgG’s Totales” (IgG’s T).

3.3.1.2 Cuantificación de proteína.

3.3.1.2.1 Por espectrometría a 280 nm

Las proteínas contienen grupos funcionales (residuos aminoacídicos) que absorben luz en el espectro ultravioleta característica utilizada para medir concentraciones por espectrofotometría. Los aminoácidos que más contribuyen por su absorbancia a 280nm son triptófano, tirosina, cistina y la fenilalanina.

La absorbancia (A) se relaciona directamente con la concentración de las proteínas que se están midiendo. Está bien establecido que las inmunoglobulinas a una concentración de 1mg/ml tienen una A_{280nm} de 1.4.

El proceso de medición fue el siguiente:

- Prender el espectrofotómetro (Biophotometer) al menos 15 minutos antes de realizar la lectura
- Limpiar la cubeta o celda (BECKMAN) con agua o alcohol y poner 500 μ l de buffer en el que está la muestra, para obtener el blanco
- Retirar el buffer de la cubeta y a continuación añadir la muestra
- Hacer la lectura de A_{280nm}
- El valor de A_{280nm} obtenido se divide entre 1.4 para obtener la concentración en mg/ml

3.3.1.2.2 Por el método del Ácido binciconínico (BCA Protein Micro-assay Reagent Kit de PIERCE).

Este método fue utilizado para medir la concentración de la toxina recombinante.

El ácido bicinconínico (BCA) en su forma soluble es un reactivo sensible, estable y altamente específico que reacciona con el ión cuproso (Cu 1+). La presencia de enlaces peptídicos y la contribución de las cadenas laterales de algunos aminoácidos (cisteína, fenilalanina, triptofano y tirosina) son responsables de la reacción colorimétrica, es decir, la proteína reacciona con el ión cúprico (Cu 2+) en un medio alcalino produciendo iones cuprosos (Cu 1+) lo cual se manifiesta con la aparición de color púrpura, dado por la interacción de dos moléculas de BCA con una de ión cuproso (Cu 1+).

Procedimiento:

- **Preparación de estándares:** El Kit incluye ampollitas de 1 ml de BSA con una concentración de 2 mg/ml, a partir de la cual se preparan 5 estándares de 1 ml cada uno, en el buffer en que se encuentre la muestra problema; en este trabajo fue en PBS 1X pH 7.4. Los estándares se preparan en dilución seriada 1:2, para obtener concentraciones de 320, 160, 80, 40, y 20 µg/ml. Considerar 25 µl como volumen final por pozo y por duplicado.

- **Preparación de la muestra:** Se recomienda hacer una lectura por $A_{280\text{nm}}$ para tener una aproximación de la concentración de la proteína y así hacer las diluciones pertinentes para que los valores de concentración de la misma estén dentro de la curva estándar. Considerar 25 μl como volumen final por pozo y por duplicado.
- **Preparación del reactivo de BCA:** El Kit incluye dos reactivos, A y B los cuales son mezclados en una proporción 1:50, considerando 200 μl de volumen final por pozo. De tal manera que la proporción final entre proteína problema y mezcla de BCA sea 1:8 (200 μl de reactivo de BCA y 25 μl de muestra problema).
- En una placa tipo ELISA de 96 pozos, colocar 25 μl por pozo de estándares, muestras problema y blancos.
- Añadir 200 μl del reactivo de BCA a cada pozo e incubar la placa por 2 horas a 37 ° C.
- Realizar la lectura de $A_{570\text{nm}}$ en el lector de ELISA (TECAN-SUNRISE), con el programa de MAGELLAN, que genera la curva estándar (por regresión lineal) y calcula las concentraciones de las muestras.

3.3.1.3 Diálisis en membranas

Convencionalmente, un proceso de diálisis se utiliza para remover solutos de bajo peso molecular y, simultáneamente, cambiar el buffer de la muestra⁵⁰.

En este trabajo las membranas utilizadas (SIGMA) evitan el paso de solutos con un peso molecular mayor o igual a 12 000 Da.

A continuación la descripción de la preparación de membranas de diálisis:

- Sumergir la membrana de diálisis en agua destilada, pasar el suficiente volumen hasta que la cara interior de la membrana quede completamente hidratada.
- Realizar dos nudos sencillos en uno de los extremos de la membrana
- Añadir la muestra, previamente centrifugada y cuantificada, dejar una cámara de aire para realizar el siguiente nudo sencillo.
- Añadir buffer de diálisis necesario a lo que sobre de membrana para hacer un contra peso, y una vez más anudar.
- Dializar la muestra el tiempo necesario y con aproximadamente cuatro recambios de buffer.

En este trabajo se utilizaron las diálisis de membrana en dos pasos generales:

- Para remover el ácido caprílico del sobrenadante resultante de la precipitación (“Derivado de IgG´s Totales”).
- Para remover las sales de NaCl de los derivados o fracciones obtenidos por cromatografía.

3.3.1.4 Cromatografía de Intercambio Iónico (FPLC)

Los intercambiadores iónicos, utilizan la carga neta de las proteínas a un pH dado, e interactúan con éstas principalmente por atracción electrostática. A un pH por arriba del punto isoeléctrico de la proteína esta adquiere una carga negativa, por el contrario, a un pH menor al punto isoeléctrico ésta adquirirá una carga positiva⁵⁰.

El tipo de intercambio utilizado en este trabajo fue aniónico (Mono-Q Pharmacia LKB Biotech ®) en el cual, la columna posee una fase estacionaria, resina o matriz insoluble con grupos cuaternario de amonio ($-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$) los cuales interactúan como iones de carga positiva, con la fase móvil, correspondiente al solvente o soluto, que deberá tener una carga de iones negativa. Éstos últimos pueden ser intercambiados reversiblemente por otros iones móviles con la misma carga (carga negativa).

Se utilizó el equipo de FPLC (Pharmacia LKB Biotech®) (Fast Protein, Peptide and Polynuceotide Liquid Chromatography), acoplado al graficador Linear 1200®,

El procedimiento fue el siguiente:

- Equilibrio de columna: Buffer de fase móvil (7.1.1), con un flujo de 1 ml min⁻¹, durante 30 minutos. Durante los últimos 5 minutos de este paso, se enciende el graficador, para establecer la línea basal de la cromatografía.
- Encender la lámpara UV del equipo, indicar la sensibilidad (2 U A) del diodo a 280nm.
- Inyección de la muestra: La fracción enriquecida de inmunoglobulinas G totales, previamente dializada, centrifugada y cuantificada. Inicio del método.
- Método utilizado:

Tiempo (minutos)	Característica	
0.00	Valve. Pos	1.1
0.00	Conc % B	0.0
0.00	ml / min	1.00
1.50	Valve. Pos	1.2
4.00	Valve. Pos	1.1
4.00	Conc % B	0.0
75.00	Conc % B	40.0
80.00	Conc % B	100
85.00	Conc % B	100
90.00	Conc % B	0.0
95.00	Conc % B	0.0

El gradiente de sal va de 0 a 1 M durante 85 min, sin embargo la recuperación de las fracciones es en los primeros 75 minutos de la corrida lo cual equivale a un gradiente de sal de 0 a 0.4 M.

- Colección de fracciones, en tubos (Eppendorf ®) de 1.5 ml. Al término del método se lavan bombas y columna con agua con un flujo de 1 ml /

min, y posteriormente con etanol al 30% flujo de 0.5 ml / min durante 30 minutos.

- Las fracciones de interés analizaron por SDS-PAGE al 12.5%. (Ver *“Electroforésis”*).
- Una vez analizadas se seleccionaron y se colectaron en un solo volumen, posteriormente se dializaron, se centrifugaron y se cuantificaron por A_{280nm} .
- Algunos derivados o fracciones fueron sometidos a una segunda cromatografía, con previa concentración de la muestra (Ver *“Concentración de proteínas”*) bajo el mismo método y condiciones cromatográficas. Una vez obtenidas las fracciones de la segunda cromatografía se repitieron los dos pasos anteriores a esta viñeta.

3.3.1.5 Concentración de proteínas por Ultrafiltración:

La ultrafiltración es un método, en el que se fuerza la salida de agua (buffer) a través de una membrana (AMICON) evitando el paso de las proteínas de interés, y por lo tanto dejando una concentración de muestra mayor a la inicial⁵⁰. Para forzar esta salida se utilizó nitrógeno a 40 psi en una celda de presión (Sistema AMICON), la cual estuvo en constante agitación.

3.3.1.6 Electroforésis de proteínas (SDS-PAGE al 12.5%).

La electroforésis se define como la migración de una partícula con carga iónica a través de un medio de dispersión bajo la influencia de un campo eléctrico²².

La electroforésis de proteínas generalmente se realiza en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS). El gel de poliacrilamida (resultado de la polimerización de los monómeros acrilamida y bis-acrilamida), actúa como un tamiz molecular; la migración de una proteína se da en función de su masa molecular, ya que el detergente SDS se une a la proteína en cantidades proporcionales al peso molecular dejando una carga neta negativa constante por unidad de masa^{22,50}.

Los geles se prepararon a una concentración de poliacrilamida del 12.5 % (gel separador), y del 4% (gel concentrador).

A continuación la descripción de la preparación y corrida electroforética de geles de poliacrilamida.

- 1) Gel separador: 1.5 ml de buffer separador + 2.5 ml de solución acrilamida + 2 ml de agua destilada + 5 μ l de TEMED + 20 μ l de 10% PSA, mezclar suavemente la preparación y verter entre dos placas

de vidrio del sistema de electroforesis vertical (Mini-Protean III. Bio-Rad®).

II) Gel concentrador: 0.63 ml de buffer concentrador + 0.33 ml de solución acrilamida + 1.54 ml de agua destilada + 2.5 μ l de TEMED + 12.5 μ l de 10% persulfato de amonio (PSA).

III) Sobre el gel separador ya polimerizado, agregar la mezcla del gel concentrador e inmediatamente colocar el peine que definirá número y tamaño de los pozos. Esperar la polimerización a temperatura ambiente.

IV) Preparación de la muestras en tubos Eppendorf de 1.5 ml:

Condiciones reductoras. Para un volumen final de 20 μ l: diluir 4 μ l de buffer desnaturizante 5X *con* β -mercaptoetanol + 20 μ g de proteína en un volumen no mayor a 16 μ l.

Condiciones no reductoras. Para un volumen final de 20 μ l: Poner 4 μ l de buffer desnaturizante 5X *sin* β -mercaptoetanol, + 20 μ g proteína en un volumen no mayor a 16 μ l.

V) Calentar la muestra en “baño maría” durante 5 minutos, y dar un pulso en la centrifuga a 14000 rpm.

VI) Corrida Electroforética: Colocar una muestra por cada pozo; agregar buffer de corrida en el tanque de electroforesis. Iniciar la corrida con un voltaje constante de 30 V hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol) haya sobrepasado el gel concentrador; aumentar el voltaje a 150 V hasta que el colorante de

referencia haya llegado a ~ 0.5 cm del extremo inferior del gel separador.

VII) Tinción de proteínas: Concluída la corrida electroforética desmontar el gel y sumergirlo en solución de tinción, en agitación constante y a temperatura ambiente. Una vez teñido el gel, sumergirlo en solución de destinción.

VIII) Secado de Gel (opcional). Sumergir el gel y papel celofán en solución de secado, cubrir el gel por ambos lados con papel celofán y esperar hasta que el gel se deshidrate.

3.3.2 Optimización de la medición de actividad enzimática de esfingomielinasa D recombinante de *L. boneti*.

3.3.2.1 Ensayo de medición de actividad enzimática de rLb Tx1 H6C.

En el laboratorio del Dr. Alagón, la medición de actividad enzimática de esfingomielinasa D, se basa en el ensayo comercial (Kit) Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay de Molecular Probes®, el cual se fundamenta en la detección de fluorescencia del producto final: la resorufina, misma que tiene un coeficiente de extinción molar de 54000 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$, lo cual permite realizar este ensayo midiendo absorbancia en lugar de fluorescencia.

El ensayo general de medición de actividad enzimática de esfingomielinasa D (Figura 2) tiene lugar debido a una reacción enzimática en cadena acoplada, que consiste en primer lugar con la

hidrólisis del enlace fosfodiéster de la Esfingomiélinina por la esfingomiélinasa D, liberando colina y fosfoceramida. La segunda y tercera reacciones consisten en la acción consecutiva de otras dos enzimas: Colina Oxidasa (ChOx) y Peroxidasa (HRP). La colina es sustrato para la ChOx la cual produce betaína y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), este último reacciona con el AR en presencia de HRP, en una reacción 1:1 generando una molécula colorida de resorufina.

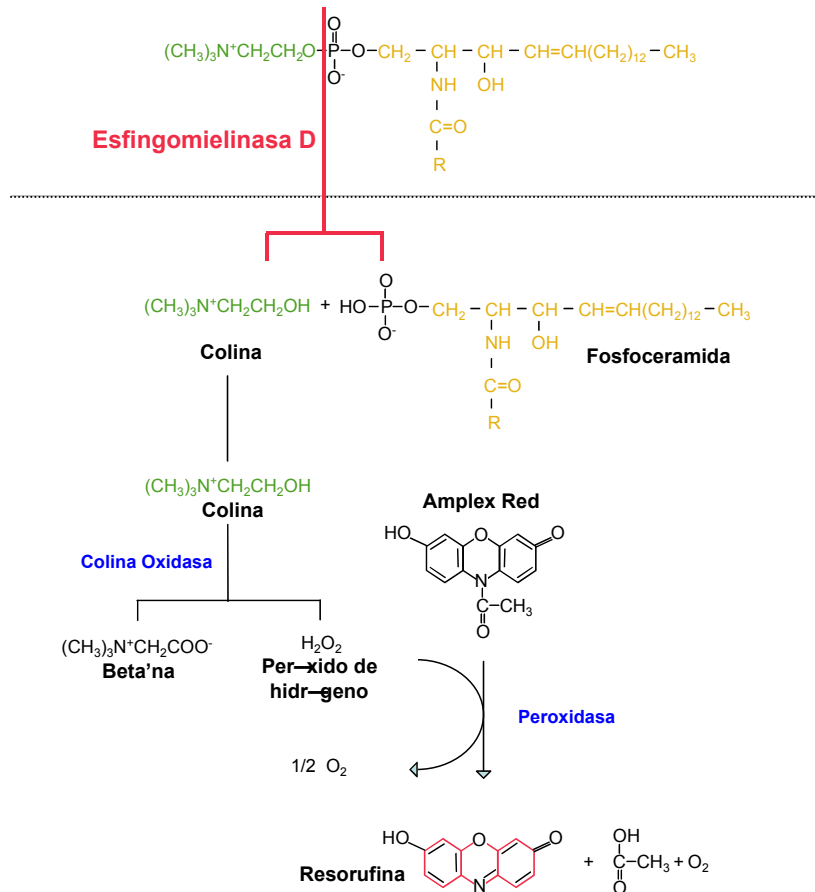


Figura 2. Esquemización de la reacción enzimática en cadena acoplada, para determinar la actividad específica de esfingomiélinasa D (rLbTx1 (H6C)), basado en el ensayo comercial (Kit) Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit de SIGMA-Molecular Probes

Este método permite hacer ensayos continuos, tomando lecturas a lo largo de un tiempo determinado (cinéticas). Las lecturas de absorbancia se hacen en un lector de ELISA (TECAN-SUNRISE) utilizando un filtro de 570 nm.

Es importante mencionar que este ensayo permite la evaluación de cada una de las enzimas participantes en la cadena acoplada, utilizando los sustratos adecuados para cada una de ellas.

A continuación la descripción de la preparación y procedimiento de medición de actividad enzimática:

Preparación de Amplex Red 10 mM*

Para un vial de 5 mg: Añadir 1.95 ml de DMSO anhidro.

Para un vial de 25 mg: Añadir 9.73 ml de DMSO anhidro.

Una vez preparado se hacen alícuotas de 50 o 100 μ l y se guardan en congelación aisladas de la luz. Para volver a utilizar se descongelan a temperatura ambiente, cubiertas con papel aluminio. Tomar el volumen necesario y volver a congelar.

* Considérese la misma preparación para los ensayos de medición de actividad de HRP y ChOx.

Preparación del "stock" Peroxidasa de rábano (HRP) (200 U/ml) :

Preparar un "stock" a partir del liofilizado del frasco, de \approx 4 mg/ml*, con buffer 100 mM Tris HCl pH 7.5 .

Se realiza la cuantificación de HRP por espectroabsorbancia (Espectrofotómetro UV-Vis Agilent®); el máximo de Absorbancia para este reactivo es a 403 nm y para obtener la concentración de la muestra en mg/ml, se debe aplicar la siguiente fórmula:

$$[\text{mg/ml}] = A_{403\text{nm}} \times 0.4$$

En base a la cuantificación por espectro absorbancia, se prepara un “stock” de 200 U/ml, tomando en cuenta la actividad específica proporcionada en el frasco.

*se recomienda que lo mínimo a pesar en la balanza analítica sean 4 mg del liofilizado.

Preparación de Tritón X-100 al 20 y 2%

Preparar 10 ml de Tritón al 20%, diluyendo 2 ml de Tritón X-100 (Kodak®) en 8 ml de agua destilada. Posteriormente, preparar 10 ml de solución “stock” al 2%, diluyendo 1 ml de la solución “stock” 20% en 9 ml de agua destilada. Esta solución al 2% es la que se utiliza para preparar la solución de esfingomielina. Ambas soluciones se mantienen refrigeradas y antes de utilizarlas se revisa que no haya precipitados.

Preparación de Esfingomielina de huevo (SM) (5 mM)

La esfingomielina de huevo (SIGMA-ALDRICH, 100 mg, P.M. 703.04) se debe mantener en congelación hasta el momento de su preparación. Preparar una solución 100 mM: Disolver la esfingomielina con 1.42 ml de etanol en el frasco en el que está contenido el liofilizado; añadir primero la mitad del volumen de etanol, recuperar todo lo que está adherido al frasco, y transferir con pipeta “Pasteur” a un tubo Eppendorf® y,

finalmente añadir la diferencia del volumen al frasco para recuperar el resto de SM.

Se preparan alícuotas de 60 μ l, las cuales se mantienen en congelación hasta el momento de su uso, cuando será resuspendida con 1.14 ml de la solución de Tritón X-100 al 2%, para obtener una concentración final de 5 mM. Se añaden primero 570 μ l de esta solución y se mezcla con vórtex por un minuto; posteriormente se añade el resto del volumen (570 μ l) y se vuelve a mezclar en el vórtex. Una vez preparada se puede almacenar congelada hasta su siguiente uso. Para volver a usar, una vez descongelada se vuelve a agitar en un vórtex.

Preparación de Esfingomielinasa D (SMD)

Un rango adecuado de trabajo para toxinas recombinantes como *L.boneti* está entre 5 y 20 nanogramos por pozo, realizar las diluciones pertinentes en buffer 1X-R considerando 100 μ l en volumen por cada pozo.

Preparación de Colina oxidasa (ChOx) 20 U/ml

Preparar una solución "stock" de 20 U/ml, en el buffer de reacción 1X, añadiendo 2.5 ml directamente en el frasco de 50 U. Se preparan alícuotas de 20-50 μ l las cuales se almacenan congeladas. Para utilizarla se permite descongelar en hielo, y refrigerar hasta su siguiente uso. Previo a la evaluación de actividad enzimática de esfingomielinasa D se recomienda la medición de Colina Oxidasa por separado (Ver adelante).

Preparación de la mezcla de reacción (dH_2O , HRP, ChOx, SM, AR)

Preparar la mezcla de reacción en tubo Eppendorf® o en Reservorio según el volumen a preparar y considerando que son necesarios 100 µl por cada pozo incluyendo el blanco (control negativo). La mezcla quedará a una concentración inicial 2X, cuando ésta sea añadida a los 100 µl de la toxina o de blanco la concentración final será 1X. En esta mezcla de reacción los reactivos guardan ciertas proporciones, independientemente del volumen total que se prepare (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Concentración y proporción de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción

Reactivo	[] final 2X (100µl)	[] final 1X (200 µl)	Proporción en la mezcla
Agua Destilada			cpb
Buffer 5X	100 mM	50 mM	1/5
HRP (200 U/ml)	2 U/ ml	1 U/ ml	1/100
Colina Oxidasa (20 U/ml)	0.2 U/ ml	0.1 U/ml	1/ 100
Esfingomielina (5 mM)	0.5 mM	0.25 mM	1/10
Amplex-Red (10 mM)	0.1 mM	0.05 mM	1/100

Descripción de la Metodología realizada:

- Colocar en una placa de 96 pozos y por duplicado (como mínimo), cantidades conocidas y en dilución seriada de *rLb* TX1 H6C en un volumen final de 100 µl por pozo. De igual forma se añaden 100 µl de “Buffer” 1X-BSA a cuántos pozos sean necesarios para los blancos, es decir sin toxina.
- Preincubar la placa a 37° C durante 30 minutos.
- Encender el lector de ELISA por lo menos 15 minutos antes de realizar la lectura.

- Añadir 100 µl de la mezcla de reacción 2X a cada pozo.
- Agitar la placa en el lector de ELISA durante 5 segundos tres veces (Measurement Parameters, “Shaking”) y tomar la primera lectura (“Tiempo cero”).
- Antes de realizar cualquier lectura, verificar si hay formación de burbujas, si tal es el caso romperse con aguja, comenzando por los blancos, y de menor a mayor cantidad de proteína.
- Continuar las lecturas a los 10 minutos y cada 10 minutos durante una hora.

Análisis e interpretación de resultados obtenidos.

- Para obtener el Valor Corregido de Absorbancia 570nm (VCA_{570nm}), los datos crudos obtenidos por el programa Magellan, se guardaron en Excel y se procesaron restando los valores de los blancos a las lecturas de los pozos con toxina.
- Se graficó en el programa PRISMA: Tiempo contra VCA_{570nm} .
- Se realizó una regresión lineal (con un intervalo de confianza del 95%) para obtener el valor de la pendiente (m) el cual corresponde al cambio de absorbancia por minuto ($A_{570nm} \cdot \text{min}^{-1}$). Para obtener el valor de la pendiente se incluyeron los valores que se encontraron dentro del rango lineal.

Una vez obtenido el valor de la pendiente (m), se calculó en Excel® la actividad específica de rLbTX1H6C (Tabla 2).

çTabla 2 .Cálculos requeridos para obtener la actividad específica de esfingomielinasa D recombinante.

A	B	C	D
ng toxina por ensayo	mg de toxina por ensayo	$\Delta A_{570nm} \text{ min}^{-1} (m)$.. $\epsilon(d)$)

E	F	G	H
$M = A_{570nm} / \epsilon(d)$)	mole por ensayo (0.2ml)	$\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1} (U)$	Actividad Específica (U/mg)

- A. Cantidad de toxina utilizada por pozo en nanogramos.
- B. Cantidad de toxina utilizada por pozo en miligramos.
- C. Cambio de Absorbancia 570nm por minuto ($\Delta A_{570nm} \text{ min}^{-1}$), que corresponde al valor de la pendiente (m) obtenido por regresión lineal.
- D. Multiplicar distancia (d) por el coeficiente de extinción molar (ϵ), Donde $d = 0.623 \text{ cm}^*$ y $\epsilon = 54000$.
- E. Cálculo de Molaridad: Dividir el valor de (m) entre el valor obtenido en la casilla D.
- F. Cálculo de moles producidos: Tomando en cuenta que Molaridad se define como moles por litro entonces realiza una regla de tres para saber los moles por ensayo (pozo) en 0.2 ml.
- G. Cálculo de Unidad Enzimática (U): Ésta se define como μmole de producto liberado por minuto. Convertir los moles calculados en casilla F en μmole .
- H. Cálculo de Actividad Específica: Dividir el valor de U entre los mg de esfingomielinasa D recombinante utilizada por pozo.

* 0.623 cm corresponde al Light Path (Distancia que atraviesa el haz de luz) medido para las placas de 96 pozos de fondo plano NUNC-Immuno No. Cat 439454 cuando contienen 200 μ l de volumen.

3.3.2.2 Ensayo de medición de la actividad enzimática de Peroxidasa de Rábano (HRP SIGMA®).

Principio del método:

Este ensayo se basa en el “kit” comercial Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxisade Assay Kit (A22188), el cual se fundamenta en la detección de fluorescencia del producto final: la resorufina, misma que tiene un coeficiente de extinción molar de $54000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ lo cual permite realizar este ensayo midiendo absorbancia en lugar de fluorescencia.

En presencia de Peroxidasa de Rábano(HRP), el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), sufre una reacción de oxidación y éste interactúa con la molécula de Amplex-Red (en una relación estequiométrica 1:1) produciendo una molécula colorida de resorufina, la cual tiene un máximo de Absorbancia a 570 nm (Figura 3).

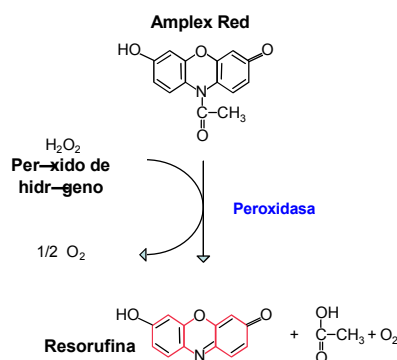


Figura 3. Esquematización de la reacción enzimática de Peroxidasa de Rábano, basado en el ensayo comercial (Kit) Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxisade Assay Kit A22188 de SIGMA-Molecular Probes®

Preparación de las soluciones “stock”:

Preparación del “stock” Peróxido de Hidrógeno: (3% o 20 mM)

Descongelar a temperatura ambiente el reactivo de H₂O₂ 30%, tomar 2.7 µl de ésta y añadir 1000 µl del buffer de 1X (7.3.3). Este “stock” puede utilizarse, sólo por el día de su preparación.

Preparación del “stock” Peroxidasa de rábano (HRP):

Previa cuantificación por espectroabsorbancia 403nm y en base a las especificaciones del fabricante, se realizan las diluciones requeridas para obtener concentraciones en mU/ml. Un rango de trabajo recomendable para evaluar actividad es de 12.5 - 3.125 mU/ml

Preparación de la mezcla de reacción (Buffer 1X, H₂O₂, AR)

Para realizar lecturas de Absorbancia 570nm, en celda o cuvetta negra de 1 cm (Beckman®) se requiere como mínimo por ensayo 500 µl totales con una proporción 1:1 entre HRP y la mezcla de reacción, la cual guarda ciertas proporciones (Tabla 3). Dependiendo del número de ensayos a realizar se calcula el volumen total necesario de la mezcla de reacción.

Tabla 3. Concentración y proporciones de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción

Reactivo	Concentración final 2X (250µl)	Concentración final1X (500 µl)	Proporción de reactivos en la mezcla
Amplex Red 10 mM	0.1 mM	0.05 mM	1/100
Peróxido de Hidrógeno 20 mM	2 mM	1 mM	1/10
Buffer 1X			c.b.p

Descripción de la Metodología realizada:

- Prender las lámparas del espectrofotómetro (UV-Vis Agilent Technologies ®) por lo menos 30 minutos antes de ocuparlo. Verificar que la celda o cuveta negra de 1 cm (Beckman®) a utilizar esté perfectamente limpia.
- Lavar 5 veces la celda con agua destilada.
- Poner 250 µl de mezcla de reacción en la celda.
- Añadir 250 µl de la preparación de HRP a la concentración deseada, inmediatamente mezclar con una pipeta *pasteur* por lo menos 5 veces.
- Realizar lectura de Absorbancia a 570nm cada 10 segundos, por lo menos 9 lecturas.
- De cada concentración deseada realizar por lo menos un duplicado, para lo cual se volverá a lavar la celda con agua destilada por lo menos 5 veces; lo mismo debe hacerse al cambiar de concentraciones.

Análisis e interpretación de resultados obtenidos:

El objetivo de este ensayo fue conocer y comparar la actividad específica (U/mg) experimental contra la actividad especificada en el frasco; En este ensayo se define Unidad (U), como la conversión de 1 μ mole de sustrato por minuto.

- Se vaciaron los datos crudos en excel.
- Se graficó en PRISMA, los valores de Tiempo contra Absorbancia 570nm (cada 10 segundos)
- Se calculó el valor de la pendiente (m), para lo cual se realizó una regresión lineal, con las lecturas u observaciones que se encontraron dentro del rango lineal, excluyendo las demás observaciones.
- Una vez obtenido el valor de la pendiente (m), se calculó en Excel® la actividad específica de HRP para lo cual se utilizó en este mismo programa una plantilla o base de datos (Tabla 4).

Tabla 4. Cálculo de actividad específica de HRP. Plantilla realizada en una hoja de datos de Excel®

A	B	C	D	E
[] mU/ml	[] mg/ml	mg/ensayo (250 μ l)	$\Delta A_{570nm} \text{ seg}^{-1}$ (m)	$\Delta A_{570nm} \text{ min}^{-1}$
F	G	H	i	
M = $A_{570nm} /$ ($\epsilon \cdot d$)	μ M	$\square = \mu$ mole / ensayo(0.5ml)	Actividad específica (U/mg)	

- A. Concentración en [mU/ml] seleccionada para realizar actividad enzimática
- B. Concentración [mg / ml]: Dividir la concentración en mg/ml del “stock” de HRP a partir del cual se realizaron las diluciones para evaluar la actividad de HRP entre el factor de dilución utilizado en las mismas.
- C. Cálculo de miligramos de HRP por ensayo (en 250 μ l): Realizar una regla de tres, en la cual se multiplican los miligramos obtenidos en el paso anterior (B) por 250 μ l, el resultado de esta multiplicación se divide entre 1000 μ l.
- D. Cambio de Absorbancia 570nm por segundo ($\Delta A_{570\text{nm}}\text{s}^{-1}$), que es al valor obtenido de la regresión lineal y que corresponde a valor de la pendiente (m) calculada por el programa PRISMA.
- E. Cambio de Absorbancia 570nm por minuto ($\Delta A_{570\text{nm}}\text{min}^{-1}$). Multiplicar el valor obtenido del paso anterior por 60 s (1 min).
- F. Cálculo de Molaridad (moles por litro): Dividir el valor de $\Delta A_{570\text{nm}}\text{min}^{-1}$, entre 54,000 (el coeficiente de extinción molar de resorufina).
- G. Cálculo de micromolaridad (μ M): Considerar que 1M equivale a 1×10^6 μ M, por lo tanto multiplicar el valor de Molaridad (obtenido en el paso F) por 1×10^6 , el resultado obtenido se expresa en μ moles por litro.
- H. Cálculo de μ moles por ensayo (U): Multiplicar el valor de μ M por los mililitros del volumen final del ensayo (0.5 ml) y dividir este valor entre 1000.

- I. Cálculo de Actividad Específica (U/mg): Dividir el valor del resultado anterior entre los mg de HRP obtenidos en el paso C.

3.3.2.3 Ensayo de medición de actividad enzimática de Colina Oxidasa (ChOX) (SIGMA®).

Principio del método: La colina es oxidada por acción de colina oxidasa, en dos productos: betaína y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En presencia de peroxidasa, el reactivo Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) interactúa con H₂O₂ en una reacción de oxidación, produciendo una molécula colorida de resorufina, la cual tiene un máximo de absorbancia a 571 nm y un ε= de 54,000 (cm⁻¹ M⁻¹) (Figura 4).

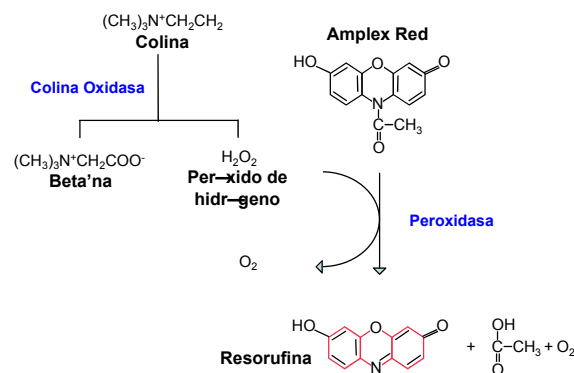


Figura 4: Esquema de la reacción producida por colina oxidasa y peroxidasa

Preparación de Cloruro de colina.

Preparar un “stock” de 10 ml con una concentración de 400 mM* (en base a su peso molecular especificado por los fabricantes del reactivo).

Añadir un 30% más del peso originalmente calculado, lo que compensa el peso del agua absorbida por el reactivo ya que éste es altamente hidrocópico.

*Esta concentración es sólo un indicativo, ya que se deben tomar en cuenta dos aspectos importantes:

Preparar un volumen suficiente de "stock" de sustrato, según el número de ensayos que se realicen (ver más adelante).

En ensayos previos en el laboratorio, se determinó que la K_m , para Colina oxidasa fue de 10 mM, esto es importante ya que en la mezcla de reacción la concentración final 1X (500 μ l), deberá ser por lo menos 5 veces mayor al valor de K_m (ver Resultados), de tal manera que se asegure que el sustrato esté en exceso, que la enzima esté trabajando en velocidad máxima y por lo tanto, se asegure una buena determinación de la actividad enzimática.

Nota: Incluso bajo un proceso de liofilización por 24 h, el peso de este reactivo se redujo en \approx 10% y aún mantenía su aspecto altamente hidratado

Preparación de Colina oxidasa (ChOx).

Determinar la(s) concentración(es) de actividad (mU/ml) que se evaluarán. Se sugiere que la actividad o concentración más alta sea de 100 mU/ml, y con ello determinar el volumen total necesario de cada una de ellas, considerando 250 μ l por ensayo. Actualmente no se ha

determinado cuánto equivale una Unidad enzimática en peso, por lo cual es imposible calcular la actividad específica de Colina oxidasa, de tal manera que sólo se podrá calcular la actividad volumétrica. Preparar las diluciones de enzima con buffer 1X.

Preparación de la mezcla de reacción (Buffer 1X, Colina, AR, HRP)

Para realizar lecturas de A_{570nm} , en celda o cuvetta negra de 1 cm (Beckman®) se requiere como mínimo por ensayo 500 µl totales con una proporción 1:1 entre colina y la mezcla de reacción, la cual guarda ciertas proporciones (Tabla 5). Dependiendo del número de ensayos a realizar se calcula el volumen total necesario de la mezcla de reacción.

Tabla 5. Concentración y proporciones de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción

Reactivo	Concentración final 2X (250µl)	Concentración final 1X (500 µl)	Proporción en la mezcla
HRP (200 U/ml)	2	1	1/100
Amplex-Red (10 mM)	0.1	0.05	1/100
Colina (400 mM)	200 mM	100 mM*	1/2
Buffer 1X			c.b.p

*En este caso se utilizó 10X, el valor de la Km

Descripción de la Metodología realizada:

- Prender las lámparas del espectrofotómetro por lo menos 30 minutos antes de ocuparlo.

- Verificar que la celda a utilizar esté perfectamente limpia.
- Lavar 5 veces la celda con agua destilada.
- Poner 250 μl de mezcla de reacción en la celda.
- Añadir 250 μl de la preparación de colina a la concentración deseada, inmediatamente mezclar con una pipeta pasteur por lo menos 5 veces.
- Realizar lectura de $A_{570\text{nm}}$ cada 10 segundos, por lo menos 9 lecturas.
- De cada concentración deseada realizar por lo menos 1 replicado, y por lo tanto se volverá a lavar la celda con agua destilada por lo menos 5 veces.
- Este lavado (5 veces con agua destilada) se realizará entre ensayos de diferente concentración.

Análisis e interpretación de resultados obtenidos:

El objetivo de este ensayo fue conocer y comparar la actividad volumétrica (U/ml) experimental contra la actividad especificada en el frasco; En este ensayo se define Unidad (U), como la conversión de 1 μmole de sustrato por minuto.

- Se vaciaron los datos crudos en excel,
- Se Graficó en PRISMA, los valores de Tiempo contra Absorbancia 570nm (cada 10 segundos).
- Se calculó el valor de la pendiente (m), realizando una regresión lineal, con aquéllas las lecturas u observaciones que se encontraron dentro del rango lineal, excluyendo las demás observaciones.
- Una vez obtenido el valor de la pendiente (m), se calculó en Excel® la actividad volumétrica de ChOX, para lo cual se utilizó en este mismo

programa una plantilla o base de datos (Tabla 6) y que es explicada a continuación según las letras por cada columna.

Tabla 6. Cálculos requeridos para obtener la actividad volumétrica.

A	B	C	D	E	F
mU/ml	mU/ 0.5 ml	$\Delta A_{570nm} s^{-1}$ (m)	$\Delta A_{570nm} min^{-1}$ (m)	$M = A_{570nm} / \epsilon$	moles min^{-1}

G	H	I
mU Encontradas	Teóricas / encontradas	Promedio de H

- A. Concentración en mU/ml del “stock” preparado de colina oxidasa.
- B. Concentración final (mU) de ChOx en 500 μ l.
- C. Cambio de Absorbancia 570nm por segundo ($\Delta A_{570nm} seg^{-1}$): Es el valor de la pendiente calculado por PRISMA.
- D. Cambio de Absorbancia 570nm por minuto ($\Delta A_{570nm} min^{-1}$): Multiplicar $\Delta A_{570nm} seg^{-1}$ por 60 segundos.
- E. Cálculo de Molaridad: Dividir el valor de $\Delta A_{570nm} min^{-1}$ entre 54,000 que es el coeficiente de extinción molar.
- F. Cálculo de moles $min^{-1} ml^{-1}$. Dividir el valor de Molaridad entre 1000.
- G. Cálculo de mU que se encontraron en el ensayo. Dividir el valor obtenido de moles $min^{-1} ml^{-1}$ entre $1 \times 10^{-9} molemin^{-1}$. Nota: 1 U se define como 1 μ mole por minuto ($1 \times 10^{-6} mole \cdot min^{-1}$) por lo tanto una mU se define como 1 nmole por minuto ($1 \times 10^{-9} mole \cdot min^{-1}$).
- H. mU Teóricas / mU Encontradas: Dividir las mU por ensayo (500 μ l) entre las mU encontradas. Nota: Las mU Teóricas: Son las mU utilizadas en el ensayo, y preparadas según la información del frasco. Mientras que las mU Encontradas: Son las mU, resultantes en el ensayo y calculadas en la columna G.

- I. Promedio de la razón entre mU Teóricas / mU Encontradas: Sumar todas las razones calculadas por ensayo (columna H) y dividir éste valor entre el número de ensayos realizados.

El valor de este promedio dió la información necesaria para saber si la actividad de la ChOX está subestimada o sobrevalorada, y permitió hacer las correcciones pertinentes sobre el volumen utilizado en la mezcla de reacción del ensayo de actividad enzimática de la toxina recombinante.

3.3.2.4 Ensayo de Inhibición de Actividad enzimática de rLbTx1H6C.

La neutralización de la actividad enzimática de las toxinas (naturales o recombinantes) por sueros y/o plasmas hiperinmunes, anticuerpos o sus fragmentos es una medida directa de su potencia de neutralización. Este ensayo es de tipo colorimétrico pues al igual que en la medición de actividad enzimática, se basa en el uso de los reactivos del Kit comercial Amplex® Red.

Preparación de la solución de trabajo de toxina recombinante:

Partiendo de un “stock” previamente centrifugado y cuantificado de toxina recombinante, se prepararon 200 µl a una concentración de 1.5 µg/ml con buffer IX-BSA.

Preparación de las diluciones de plasma hiperinmune:

Rotular de la A a la H, 8 tubos Eppendorf de 1.5 ml. Colocar 200 μ l microlitros de suero hiperinmune en el tubo A, en los siete restantes colocar 80 μ l de buffer 1X-R. Hacer diluciones seriadas 3X: Transferir 40 μ l del tubo A al tubo B mezclar 8 veces y transferir 40 μ l al tubo C, continuar de la misma manera hasta llegar al tubo H.

Preparación de las diluciones de derivados de IgG's Totales e isotipos a, b, c,

(T):

Las diluciones se prepararan a partir de un "stock" cuantificado por A_{280nm} . Se recomienda preparar el tubo "A" con una concentración en un rango de 1.5 – 2 mg/ml, y se sigue el procedimiento previamente descrito.

Notas:

- Si la concentración de los derivados obtenidos por cromatografía es menor al rango del recomendado, iniciar el tubo "A" con el derivado mismo sin diluir.
- Es importante mencionar que se tendrán que realizar cuántas diluciones sean necesarias para obtener inhibiciones en un rango de 0 a 100%.

Preparación de la mezcla de reacción.

Preparar la mezcla de reacción en tubo Eppendorf® o en Reservorio según el volumen a preparar y considerando que son necesarios 100 μ l

por cada pozo incluyendo el control negativo (blanco) y el control positivo (toxina recombinante, más buffer 1X-R). La mezcla tendrá una concentración inicial 2X, cuando ésta sea añadida a los 100 µl de la toxina o de blanco la concentración final será 1X. En esta mezcla de reacción los reactivos guardan ciertas proporciones, (al igual que en el ensayo de actividad enzimática) independientemente del volumen total que se prepare. (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración y proporción de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción

Reactivo	[] final 2X (100µl)	[] final 1X (200 µl)	Proporción en la mezcla
Agua Destilada			cpb
Buffer 5X	100 mM	50 mM	1/5
HRP (200 U/ml)	2 U/ ml	1 U/ ml	1/100
Colina Oxidasa (20 U/ml)	0.2 U/ ml	0.1 U/ml	1/ 100
Esfingomielina (5 mM)	0.5 mM	0.25 mM	1/10
Amplex-Red (10 mM)	0.1 mM	0.05 mM	1/100

Descripción de la Metodología realizada:

- Una vez obtenidas las diluciones del suero o derivados de inmunoglobulinas G así como el “stock” de trabajo de la toxina recombinante, preparar en una microplaca de 96 pozos la “Mezcla Inicial” (toxina, suero y/o derivado inmunoglobulínico) , según lo indicado en la Tabla 8.
- Una vez hecho esto tapar la placa e incubar a 37° durante 30 minutos. Diez minutos antes del término de la incubación preparar la mezcla de reacción indicada en la Tabla 7, con excepción del reactivo Amplex®

Red, el cual se añadirá segundos antes de añadir la mezcla de reacción a la placa “microtiter”.

- Una vez terminada la incubación transferir con una pipeta multicanal, a manera réplica y por duplicado, 100 μ l de cada uno de los ensayos indicados en la Tabla 8, a pozos nuevos o limpios ya sea de esa misma placa o de otra (Tabla 9).
- A continuación agregar con una pipeta multicanal a cada pozo, 100 μ l de la mezcla de reacción indicada en la Tabla 7. Tapar la placa e incubar a 37° C durante 30 minutos.
- Encender el lector de ELISA (SUNRISE-TECAN®) al menos 15 minutos antes de la lectura de Absorbancia 570 nm. Una vez concluida la incubación, comprobar si hubo formación de burbujas, de ser así, éstas deberán romperse con aguja de insulina comenzando con los pozos de menor color (blancos) y ascendiendo a los de mayor color.
- Proceder entonces, con la lectura de Absorbancia a 570 nm.

Tabla 8. Preparación de la placa

Número de Reacción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Componente	Blanco	Control Positivo	Muestra (18 μ l) 27 μ g	Muestra (18 μ l) 9 μ g	Muestra (18 μ l) 3 μ g	Muestra (18 μ l) 1 μ g	Muestra (18 μ l) 0.33 μ g	Muestra (18 μ l) 0.11 μ g	Muestra (18 μ l) 0.03 μ g	Muestra (18 μ l) 0.01 μ g
μ l de Buffer 1X-R	250	225	180	180	180	180	180	180	180	180
rLbTx1 H6C (1.5 μ g/ml)		25	25	25	25	25	25	25	25	25
Tubo A			45							
Tubo B				45						
Tubo C					45					
Tubo D						45				
Tubo E							45			
Tubo F								45		
Tubo G									45	
Tubo H										45

En esta tabla se muestran los microlitros de suero o microgramos de fracción o derivados inmunoglobulínicos utilizados para realizar este ensayo. El diseño de la tabla presentada aquí se muestra horizontalmente, sin embargo se recomienda que el ensayo en placas “microtiter” se realice de forma vertical, con el objetivo de facilitar el uso de la pipeta de 8 canales al realizar los replicados de 100 μ l.

Análisis e interpretación de resultados obtenidos.

- Vaciar los datos obtenidos en una hoja de cálculo de Excel.
- Realizar una plantilla en este mismo programa tal como se muestra en la Tabla 9, en ésta, cada columna posee un número romano el cual tendrá un significado que será explicado a pié de tabla.
- Una vez obtenidos todos los valores de la Tabla 9, transferir al programa PRISMA; Para el eje "X", los microlitros o microgramos finales de suero o derivado, obtenidos en la columna II (Tabla 9) a partir de la reacción 3, y para el eje "Y" los resultados de los porcentajes de inhibición obtenidos en la columna VI (Tabla 9), a partir de la reacción 3.
- Transformar los valores X en logaritmos y hacer un ajuste no-paramétrico (Non-Linear Regression "Curve"). En el programa Prisma se debe utilizar la ecuación "sigmoideal dose-response (variable slope)", a la cual se define una "Hill-Slope" de 2.5, un valor mínimo (bottom) de cero y un valor máximo (top) de cien.
- Los valores de Dosis Efectiva Media (ED50), así como el valor del intervalo con 95% de confianza y el coeficiente de correlación son calculados automáticamente.
- Cálculo de microgramos o microlitros que neutralizan 1 mg de esfingomielinasa D recombinante. La ED50 está definida para todos los ensayos como los microlitros o microgramos de suero o derivado (IgG's) que neutralizan 15 ng (1.5×10^{-5} mg) de toxina recombinante. Por lo tanto, dividir el valor obtenido de ED50 entre 1.5×10^{-5} mg.

Tabla 9. Hoja de datos para realizar en Excell. Cálculo del porcentaje de inhibición de actividad enzimática.

		I	II		III	IV	V	VI
No. de Reacción	Reacción	μl o μg de suero o preparado (IgG's) por pozo	A570nm Serie 1	A570nm Serie 2	Promedio de A570nm (S1 y S2)	Valor corregido de Absorbancia (VCA570nm)	Actividad Enzimática (%)	Inhibición de actividad enzimática (%)
1	Control -							
2	Control +							
3	A							
4	B							
5	C							
6	D							
7	E							
8	F							
9	G							
10	H							

- I) M $\square\square\square\square\square\square\square\square\square$ de suero o m $\square\square\square\square$ g $\square\square\square\square\square$ de preparado (IgGs) por pozo: En el caso de realizar el ensayo con suero dividir 18 (microlitros finales por pozo) entre la dilución utilizada en el tubo A, dividir éste valor entre el factor de dilución utilizado para 3, para obtener los microlitros utilizados en la reacción del suero dividir los microlitros utilizados por pozo entre la dilución utilizada.
- II) Valores de Absorbancia a 570 nm, obtenidos de la lectura realizada en el Lector de ELISA (Sunrise-Tecan).
- III) Promedio de Absorbancia a 570 nm: Realizar el promedio para cada reacción.
- IV) Valor Corregido de A_{570nm}: Restar el valor promediado de Absorbancia 570 nm del control negativo (blanco) a los valores promediados de A_{570 nm} a todas las reacciones.
- V) Cálculo del porcentaje de Actividad enzimática: La reacción 2 o el control positivo corresponde al 100% de actividad; multiplicar los

valores corregidos de A570nm de las demás reacciones por 100 y dividir entre el valor corregido de A570nm del control positivo.

- VI) Cálculo del porcentaje de Inhibición de actividad enzimática: Restar a 100, el porcentaje de actividad enzimática obtenido para cada reacción.

4. Resultados y Discusión.

4.1 Obtención y preparación de derivados de suero hiperinmune de caballo.

- Precipitación por ácido caprílico: Obtención del Derivado de IgG's Totales

Se inició con un volumen de 15 ml de suero hiperinmune de caballo, luego del proceso de precipitación por ácido caprílico, el volumen del sobrenadante fue de 10.4 ml equivalente al 69% del volumen inicial (porcentaje volumétrico), con una concentración determinada por A_{280nm} de 18.5 mg/ml y por lo tanto una cantidad total de proteína de 192.4 mg.

Posterior a la diálisis y centrifugación del sobrenadante se obtuvo un volumen de 9.68 ml, cuya concentración fue de 14.6 mg/ml y por lo tanto una cantidad total de proteína de 141.4 mg, lo cual representa una recuperación cuantitativa de 73.5% (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento porcentual volumétrico y cuantitativo del suero hiperinmune de caballo después de la precipitación por ácido caprílico.

Procedimiento	Fracción o Derivado	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Cantidad total de proteína (mg)	Porcentaje de recuperación cuantitativo (%)
-	Suero	15.00	-	-	-
Precipitación por ácido caprílico	Sobrenadante	10.40	18.50	192.40	100.00
Diálisis y centrifugación	Derivado de IgG's Totales	9.68	14.61	141.40	73.50

* El porcentaje de recuperación cuantitativo se calculó en base a la cantidad total de proteína en miligramos

El análisis electroforético del sobrenadante por SDS-PAGE al 12.5 % (Figura 1), reveló que la albúmina cuyo P.M \approx 64 kDa, fue completamente precipitada y removida del suero hiperinmune cuando éste fue sometido al protocolo de precipitación por ácido caprílico y que las proteínas del sobrenadante, tuvieron los pesos y el patrón electroforético característico de inmunoglobulinas G, en condiciones reductoras y no reductoras; por esta razón y considerando que todos los isotipos de inmunoglobulinas G se encuentran en este derivado, que a partir de ahora llamaremos al sobrenadante dializado “Derivado de IgG’s Totales.”

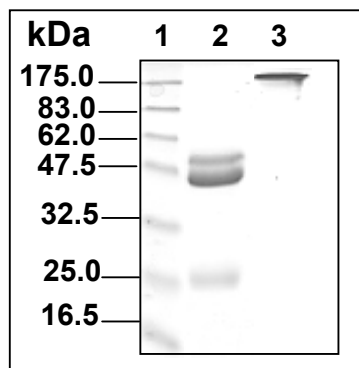


Figura 1. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE 12.5%) del sobrenadante obtenido a partir de la precipitación con ácido caprílico. Carril 1: Marcadores de peso molecular, Carril 2: 10 μ g de proteína, condiciones reductoras, Carril 3: 10 μ g de proteína condiciones no reductoras.

En el carril 2 del gel de la Figura 1, se observan 3 bandas, con pesos de 25 kDa (cadenas ligeras) otras dos bandas con pesos entre 45 – 50 kDa (cadenas pesadas), de IgG’s y de IgG(T) respectivamente. En el carril 3 (condiciones no reductoras) se observa una banda que apenas entra en el gel. No se observan otras proteínas.

- *Cromatografía de intercambio aniónico: Separación de isotipos a,b,c y (T)*

El derivado de inmunoglobulinas G cuyo volumen final fue de 9.68 ml con una concentración de 14.60 mg/ml, fue sometido a cromatografía de intercambio aniónico en tres corridas cromatográficas (Tabla 2).

Tabla 2. Volumen y cantidad de carga proteica por corrida cromatográfica

Corrida Cromatográfica	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Cantidad de proteína (mg)
I	3.30	14.61	48.21
II	3.30		48.21
III	3.08		44.98
Total			141.40

El patrón cromatográfico (Figura 2) de las tres corridas fue idéntico, observándose dos picos o fracciones ("A", y "B") los cuales fueron recolectados por separado.

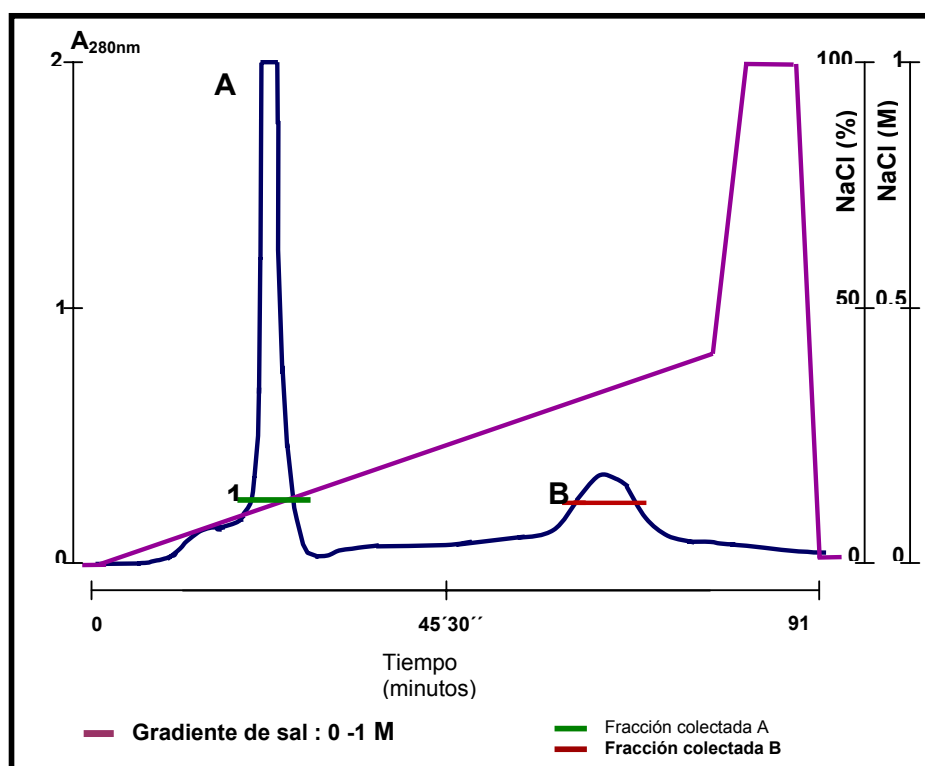


Figura 2. Cromatograma representativo de tres corridas electroforéticas: separación de isotipos inmunoglobulínicos presentes en el "Derivado de IgGs Totales" realizado por intercambio aniónico (FPLC). La concentración de NaCl en el que eluyó el pico "A" fue de 0.05-0.14 M y para el pico B fue de 0.31-0.38 M. Las fracciones colectadas incluyen el área por encima de las barras horizontales verde y roja.

Al término de las tres corridas cromatográficas (I – III), las fracciones correspondientes fueron mezcladas, dializadas, centrifugadas, y cuantificadas. El porcentaje de rendimiento cuantitativo se realizó considerando 141.40 mg de proteína que fue cargada en los tres cromatogramas como el 100% (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de recuperación (%) de picos A y B de tres corridas cromatográficas. La concentración de cada una de ellas se determinó por A_{280nm}

	Colección del Pico "A"	Colección del Pico "B"
Volumen obtenido (ml)	13.00	28.00
Concentración (mg/ml)	3.14	1.00
Cantidad total de proteína (mg)	40.85	28.00
Porcentaje de recuperación (%)	28.89	19.80

Se realizó el análisis electroforético de ambas colecciones ("A" y "B") por SDS-PAGE al 12.5% en condiciones reductoras y no reductoras. (Figura 3).

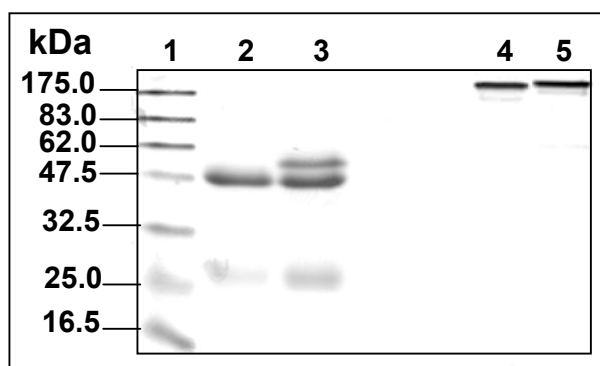


Figura 3. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida-SDS al 12.5% de las fracciones "A" y "B" obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico. Carril 1: Marcadores de peso molecular, Carril 2: 10 μ g de proteína de la fracción "A", condiciones reductoras, Carril 3: 10 μ g de proteína

de la fracción "B", condiciones reductoras, Carril 4: 10 μ g de proteína fracción "A", condiciones no reductoras, Carril 5: 10 μ g de proteína de la fracción "B", condiciones no reductoras.

El objetivo de la cromatografía fue la separación de las inmunoglobulinas G en sus dos isotipos principales, las IgG's de las IgG(T). El patrón electroforético de la fracción "A" muestra el peso característico de una IgG sin la banda de mayor peso molecular, mientras que el patrón electroforético de la fracción "B" mostró dos bandas de cadenas pesadas, la propia de las IgG(T) y del resto de IgG.

Para purificar aún más las IgG's (fracción "A") y las IgG(T) (fracción "B") se realizó una re-cromatografía de las mismas. Previamente ambas muestras fueron concentradas por ultrafiltración, el volumen y la cantidad de proteína obtenida así como el porcentaje de rendimiento se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de recuperación de las fracciones "A" y "B" después del proceso de concentración por ultracentrifugación. Para la fracción "A" y "B" se consideraron 40.85 mg y 28 mg respectivamente como el 100%.

	Pico "A"	Pico "B"
Volumen obtenido (ml)	5.75	4.97
Concentración (mg/ml)	5.50	3.07
Cantidad total de proteína (mg)	31.63	15.26
Porcentaje de recuperación (%)	77.44	54.50

La re-cromatografía de ambas fracciones fue hecha con la misma metodología y condiciones de la primera cromatografía. Los cromatogramas y la forma como se colectaron las fracciones se muestra en las Figuras 4 y 5. Posteriormente, estas colecciones fueron cuantificadas por A_{280nm} para obtener el porcentaje de recuperación (Tabla 5), y analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE 12.5%).

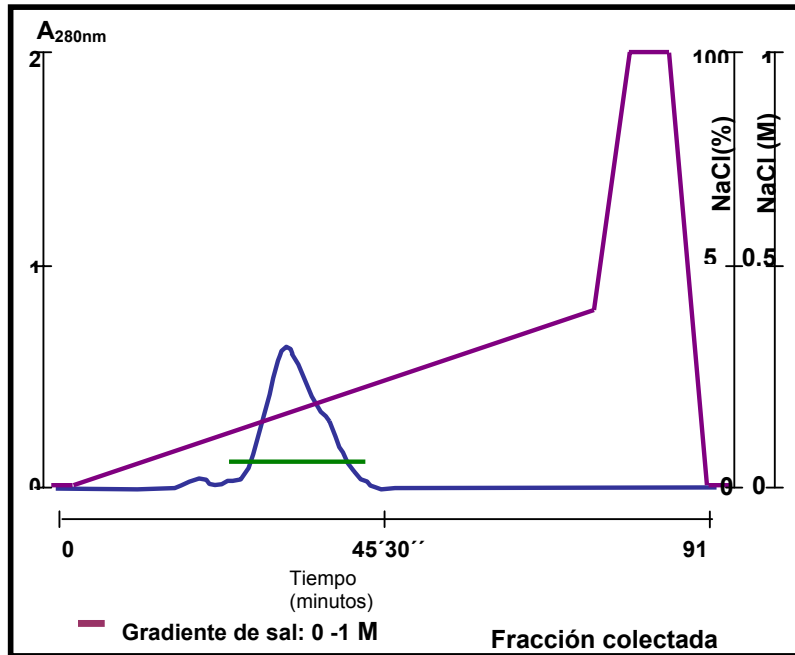


Figura 4. Cromatograma representativo de la fracción “A” cuando fue sometida a recromatografía por intercambio aniónico (FPLC). La concentración de elución para esta fracción (Fracción A.1) fue de 0.08-0.22 M de NaCl.

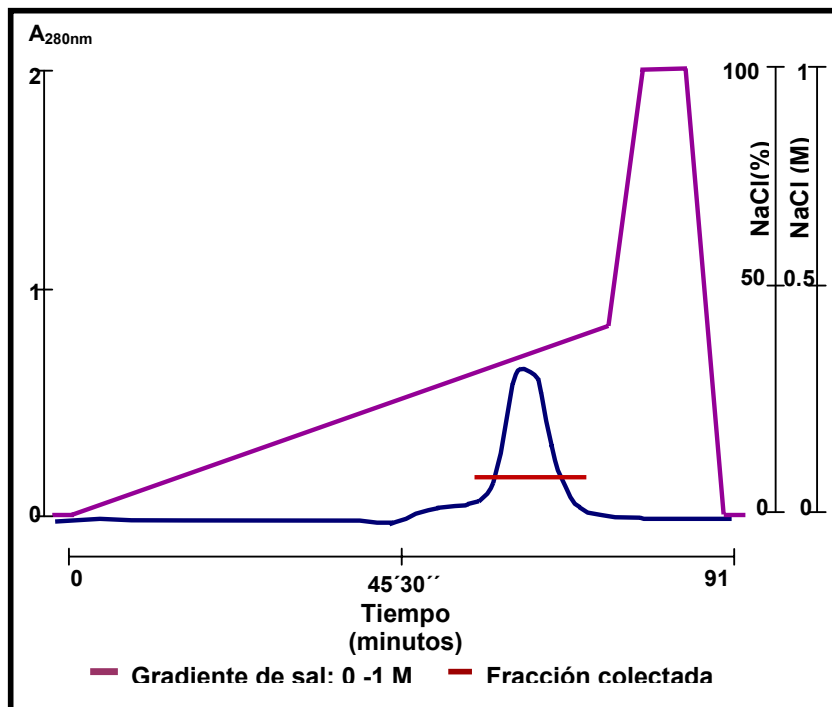


Figura 5. Cromatograma representativo de la fracción “B” cuando fue sometida a recromatografía por intercambio aniónico (FPLC). La concentración de elución para la fracción colectada (Fracción B.1) fue de 0.30-0.38 M de NaCl.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación (%) de las fracciones obtenidas por recromatografía. La concentración de cada una de ellas se determinó por A_{280nm}

	Fracción "A.1",	Fracción "B.1"
Volumen obtenido (ml)	18.75	28.00
Concentración (mg/ml)	1.50	1.00
Cantidad total de proteína (mg)	28.125	19.50
Porcentaje de recuperación (%)	88.93	100.00

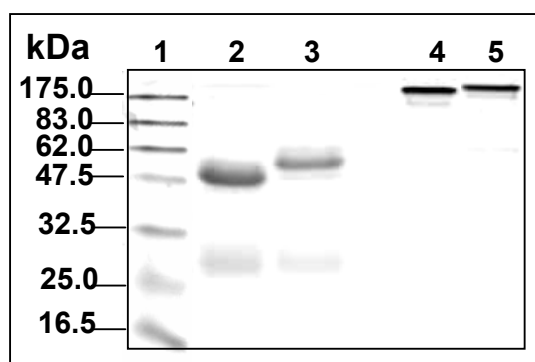


Figura 6. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE 12.5%) de las fracciones A.1" y B.1 obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico. Carril 1: Marcadores de peso molecular, Carril 2: 10 μ g de proteína de la fracción "A.1", condiciones reductoras, Carril 3: 10 μ g de proteína de la fracción "B.1" condiciones reductoras, Carril 4: 10 μ g de proteína fracción "A.1" condiciones no reductoras, Carril 5: 10 μ g de proteína de la fracción "B.1" condiciones no reductoras.

El patrón electroforético de la fracción A.1, con la cadena pesada de menor tamaño, y la fracción B.1, con la cadena pesada de mayor tamaño, concuerda con que en la primera se encuentran las inmunoglobulinas G, isotipos a, b y c, y en la segunda el isotipo IgG(T). Estos resultados son concordantes con los de Morais (2005)³⁰ y Sheoran (1996)^{50,51}. La fracción A.1 es denominada a partir de ahora, como "Derivado enriquecido de inmunoglobulinas G (a, b, c) o no-(T) y la B.1 como "Derivado enriquecido de inmunoglobulinas G (T)".

4.2 Determinación de la actividad enzimática de Peroxidasa de rábano (HRP).

Este ensayo permitió medir con precisión la actividad enzimática de HRP. Se preparó un vial con una concentración de 0.156 mg/ml, correspondiente a 78 U/ml, según la actividad enzimática específica rotulada en el frasco; a partir de éste vial se realizaron las diluciones correspondientes para tener las concentraciones de 13.7, 6.8 y 3.4 mU/ml.

En la Figura 7 se muestra el cambio de absorbancia con relación al tiempo. De las rectas obtenidas por regresión lineal, se calculó la pendiente como $\Delta A_{570\text{nm}}\text{s}^{-1}$, y se calculó (Tabla 6), la actividad específica de HRP expresada como U/mg, donde una Unidad se define como la catálisis de 1 μmol de sustrato por minuto.

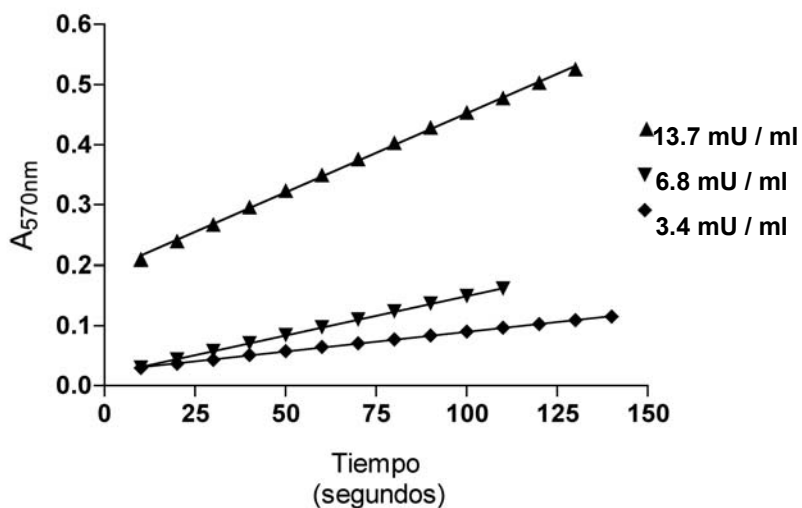


Figura 7. Rango Lineal de la Cinética Enzimática de Peroxidasa de Rábano (HRP).

Tabla 6. Cálculo de actividad enzimática específica de HRP

mU/ml	mg/ml	mg por ensayo (0.25 ml)	$\Delta A_{570nm} S^{-1}$	$\Delta A_{570nm} min^{-1}$	$M = A_{570nm}/\epsilon$	μM	$\mu moles$ por ensayo (0.5 ml)	Actividad específica (U/mg)
13.70	2.73 e -2	6.82 e -6	2.63 e -3	0.158	2.92 e-6	2.92	1.46 e-3	214.25
6.85	1.36 e -2	3.41 e -6	1.31 e -3	0.080	1.46 e-6	1.46	7.31 e-4	214.08
3.42	6.82 e -3	1.71 e-6	6.57 e -4	0.040	7.3 e -7	0.73	3.65 e-4	214.02
							Promedio	214.11
							Desviación estándar	0.12

. El coeficiente de extinción molar para la resorufina es de $54000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$

En los tres casos, la actividad específica calculada fue de 214 U/mg. Este fue el valor que se utilizó para calibrar la HRP empleada en el ensayo de esfingomielinasa D.

4.3 Determinación de actividad enzimática de Colina Oxidasa (ChOx).

La evaluación de la actividad de cualquier enzima, requiere como mínimo que se confronte con suficiente cantidad de sustrato, con lo cual se asegura que la enzima esté trabajando a máxima velocidad.

Según el reporte de Ohta-Fukuyama 1980³³ la K_m (Constante de Michaelis-Menten, se refiere a la concentración de sustrato en la cual la enzima se encuentra en velocidad media) para una colina oxidasa de *Alcaligenes sp.* es de 0.87 mM utilizando como sustrato colina. Sin embargo nuestros resultados dieron un valor diez veces mayor, de 9.91 mM, como puede apreciarse en la Figura 8.

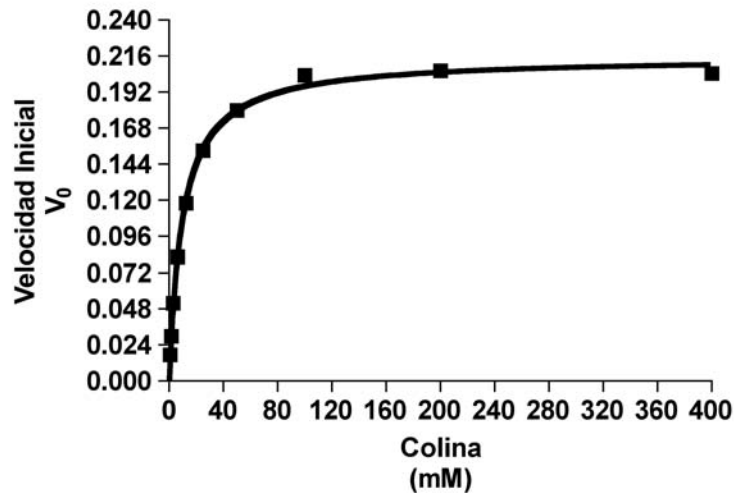


Figura 8. Curva de actividad enzimática de ChOx. Se graficó la velocidad inicial ($\Delta A_{570\text{nm}} \text{min}^{-1}$), resultado de varios ensayos (datos no mostrados) en los cuales se probó Colina Oxidasa de *Alcaligenes sp.* con una concentración de actividad constante y conocida *versus* diferentes concentraciones del sustrato. Los resultados fueron los siguientes: V_{max} (Intervalo de confianza 95%) = 0.215 (0.21 – 0.22), Desviación Estándar = 0.009556. K_m (Intervalo de confianza 95%) = 9.910 (8.86 – 10.96), Desviación Estándar = 0.450000. Coeficiente de regresión (r^2) = 0.9980.

Una vez obtenido el valor de la K_m se realizó el ensayo de medición de actividad de colina oxidasa, utilizando una concentración de sustrato 10 veces mayor a la K_m obtenida experimentalmente, con el fin de comparar la actividad enzimática experimental contra la actividad reportada por el fabricante.

A partir de un vial de ChOx de *Alcaligenes sp* de 50 U, se añadieron 2.5 ml de búffer (0.1 M Tris H Cl pH 7.5), para obtener una concentración nominal de 20 U/ml. A partir de este stock se realizaron las diluciones correspondientes para obtener concentraciones de actividad de 25, 12.5 y 6.25 mU/ml, mismas que se utilizaron para realizar el ensayo de actividad enzimática.

Para la cinética enzimática cada concentración tuvo un promedio de 210 lecturas de absorbancia a 570 nm cada 10 segundos, estas lecturas fueron graficadas, considerando en el eje "X" el tiempo (segundos) y en el eje "Y" la

A_{570nm} (Figura 9). A cada una de las rectas obtenidas se le calculó la pendiente ($\Delta A_{570nm} s^{-1}$) la cual permitió realizar los cálculos para obtener la verdadera concentración de actividad de ChOx de *Alcaligenes sp*, tal como se muestra en la Tabla 7.

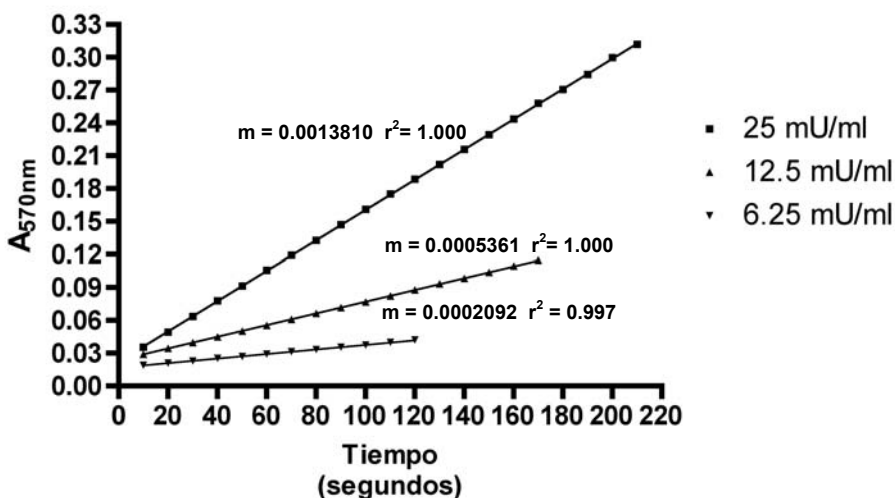


Figura 9. Cinética enzimática de Chox de *Alcaligenes sp*. Todas las observaciones presentes se encuentran en el rango lineal. La regresión lineal se realizó con un 95% de confianza. Los valores de las pendientes (m) o velocidad inicial se definen como el cambio de absorbancia 570 nm por segundo.

Tabla 7. Cálculo de actividad enzimática volumétrica para Colina Oxidasa (ChOx)

[] de la dilución utilizada (mU/ml)	mU en 0.5 ml del ensayo	$\Delta A_{570nm} s^{-1}$	$\Delta A_{570nm} min^{-1}$	$M = A_{570nm} min^{-1} / \xi$	moles / min	m U	Teóricas / Encontradas
25.00	12.50	1.38 e-3	8.28 e-2	1.53 e-6	7.65 e-10	0.765	16.33
12.50	6.25	5.36 e-4	3.22 e-2	5.96 e-7	2.98 e-10	0.298	20.97
6.25	3.12	2.09 e-4	1.25 e-2	2.31 e-7	1.15 e-10	0.115	27.17
*El coeficiente de extinción molar de la resorufina es de $54000 cm^{-1} M^{-1}$						Promedio	21.60

En la Tabla 7 no se realizó el cálculo de actividad específica para colina oxidasa, ya que no se conoce su concentración proteica y el preparado contiene otras proteínas.

La actividad de colina oxidasa se encontró en promedio 20 veces disminuida en relación a lo reportado por el fabricante. Por ello, se procedió a evaluar el efecto de cantidades crecientes de ChOx en la medición de

esfingomielinasa D. Para lo cual se probaron 5, 10 y 20 veces la cantidad de colina oxidasa recomendada en el Kit comercial (Tabla 8). Este ensayo fue hecho con 150 ng/pozo de la esfingomielinasa D recombinante de *L. boneti* (rLb Tx1 H6C).

Tabla 8. Preparación de la mezcla de reacción para evaluar la actividad de Colina Oxidasa.

Reactivo	Ensayo 1 5 X	Ensayo 2 10 X	Ensayo 3 20 X
	(μ l)	(μ l)	(μ l)
Agua destilada	335	290	240
Buffer 5X	100	100	100
HRP (200 U/ml)	5	5	5
ChOx (20 U/ml)	5	50	100
Esfingomielina (5 mM)	50	50	50
Amplex Red (10 mM)	5	5	5
Volumen final	500	500	500

Fueron realizadas las gráficas correspondientes a lo tres ensayos, se obtuvieron las cinéticas enzimáticas graficando tiempo contra A_{570nm} obtenidas cada 10 minutos durante una hora (Figura 10).

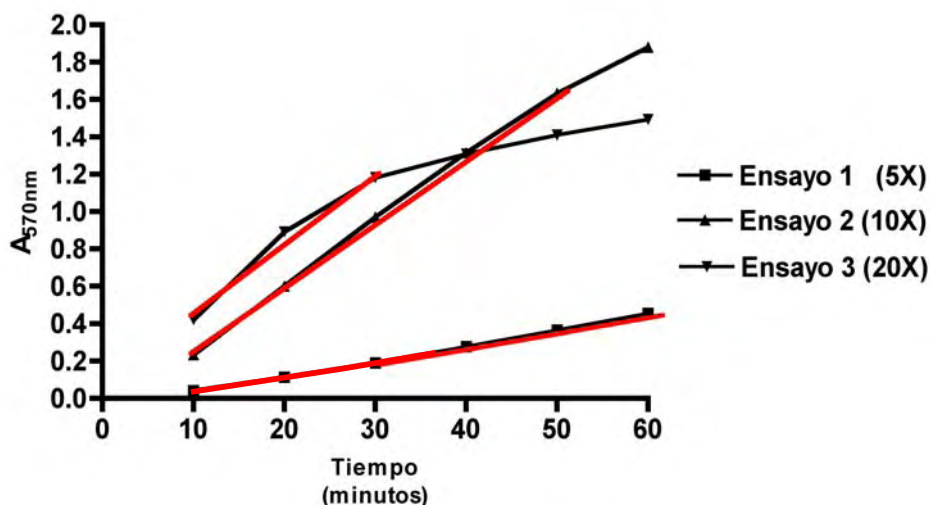


Figura 10. Cinética enzimática de los ensayos 1, 2, 3. Las líneas en rojo señalan las observaciones consideradas para obtener el rango lineal y por lo tanto para obtener el valor de la pendiente o bien el ΔA_{570nm} con 95% de confianza.

La Figura 10, muestra que la velocidad inicial de la SMD aumenta conforme se utiliza más ChOx. A los 30 minutos la diferencia es muy significativa entre 5X y 10X y 5X y 20X y no tanto entre 10X y 20X. De estos resultados se concluyó que la actividad final de ChOx en el ensayo de SMD debe encontrarse entre 0.05 y 0.1 U/ml.

4.4 Medición de Actividad Enzimática de Esfingomielinasa D recombinante.

Una vez realizada la medición de actividad enzimática de Colina oxidasa (ChOx) así como de Peroxidasa de rábano (HRP), mismas que corresponden en ese orden a la a dos últimas cadenas acopladas del ensayo de medición de actividad enzimática de esfingomielinasa D, se procedió a evaluar la actividad enzimática de rLbTx1 H6C, y durante el transcurso de medición se realizaron ajustes a la metodología del ensayo con el objetivo de compatibilizar la medición de la actividad enzimática como la inhibición de la misma. Así, se ajustaron la concentración de los buffers, los tiempos de incubación y lectura y las temperaturas de incubación.

Medición de actividad enzimática con o sin albúmina bovina sérica(BSA).

Cuando fue utilizado el buffer 0.1 M Tris H Cl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 4 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) se observó una mayor actividad enzimática, en comparación con el uso del mismo buffer pero sin BSA, situación que fue reflejada en los valores de Absorbancia a 570 nm, en la velocidad inicial de

cada ensayo ($\Delta A_{570nm} \text{min}^{-1}$) y por lo tanto en la Actividad Específica (U/mg).
(Figura 11, Tabla 9)

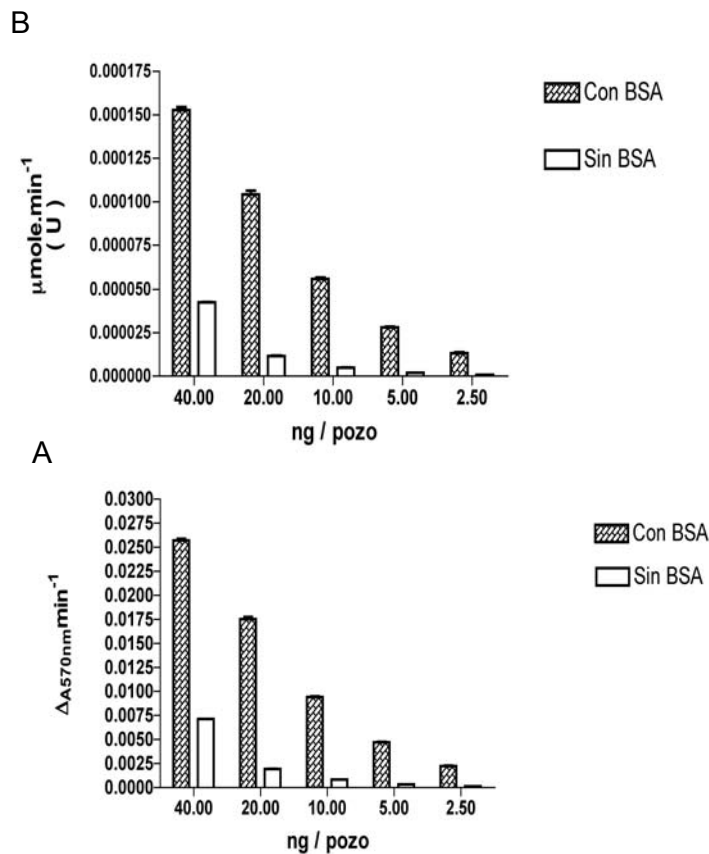


Figura 11. Gráficas comparativas de Velocidad inicial y U ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) Panel A) Comparación de la Velocidad inicial ($\Delta A_{570nm} \text{min}^{-1}$) de la actividad enzimática de diversas cantidades de toxina por pozo (rLbTx1H6C) utilizando como buffer 0.1 M Tris H Cl pH 7.5 + 10 mM MgCl_2 con o sin 4mg/ml de BSA. Panel B) Los mismos resultados expresados como $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$

Tabla 9. Cálculos realizados para obtener la actividad específica de rLbTx1H6C utilizando un buffer con BSA.

ng/pozo	mg/pozo	$\Delta A_{570nm} \text{min}^{-1}$	((ϵ)(d))	$M = \Delta A_{570nm} \text{min}^{-1} / ((\epsilon)(d))$	mole en 0.2 ml	μmole por ensayo	Actividad específica U/mg
40.0	4.0 e^{-5}	0.027750	33642	8.25 e^{-7}	1.6 e^{-10}	1.65 e^{-4}	4.1
20.0	2.0 e^{-5}	0.018050		5.37 e^{-7}	1.07 e^{-7}	1.07 e^{-4}	5.4
10.0	1.0 e^{-5}	0.009407		2.80 e^{-7}	5.60 e^{-11}	5.59 e^{-5}	5.6
5.0	5.0 e^{-6}	0.004720		1.40 e^{-7}	2.81 e^{-11}	2.81 e^{-5}	5.6
2.5	2.5 e^{-6}	0.002229		6.63 e^{-8}	1.33 e^{-11}	1.33 e^{-5}	5.3
Promedio							5.2
Desviación estándar							0.62
Coeficiente de variación (%)							11.8

El valor de la actividad específica fue de 5.2 U/mg (Tabla 9), este resultado de actividad enzimática es más de 5 veces mayor que el encontrado en un estudio previo realizado por Olgún-Pérez, L. P., (2006)³¹ quien reportó para 100 ng de rLbTx1 H6C un $\Delta A_{570\text{nm}}\text{min}^{-1}$ de 0.015-0.020 y de 0.015-0.017 utilizando un buffer sin BSA, y un buffer con Albúmina Sérica Humana respectivamente, valores correspondientes a una Actividad Específica entre 0.7 y 1.05 U/mg.

El uso de albúmina sérica bovina a una concentración de 4 mg/ml semeja las condiciones utilizadas por Van Meeteren et al (2004)⁵⁷ quienes encuentran actividad enzimática de *Loxosceles laeta* sobre lisofosfatidilcolina (LPC), sólo cuando ésta es incubada en presencia de albúmina sérica bovina (5 mg/ml).

Otro de los factores de gran influencia sobre la actividad enzimática fue la “Temperatura de incubación”, variable que fue analizada utilizando el buffer de reacción con 4 mg/ml de BSA. Cuando la actividad enzimática de diversas cantidades de toxina fueron evaluadas con una sola lectura o medición tipo “End Point” a los 30 minutos con o sin incubación después de haber añadido la mezcla de reacción, fue evidente la diferencia de valores de $A_{570\text{nm}}$ situación que se muestra en la Figura 12, Panel A), en donde la diferencia entre los valores de absorbancia a 570nm entre los dos ensayos *circa* de casi el triple con respecto a aquél ensayo en donde no se utiliza incubación a 37° C.

Tanto en la producción de μmole por minuto, como en la actividad específica de la enzima bajo la condición de incubación, se reflejó en el aumento de actividad con similar diferencia numérica que la encontrada en los

valores de A_{570nm} siendo ésta de 13.5 U/mg contra 5.2 U/mg con y sin incubación respectivamente.

El objetivo de la optimización del ensayo de medición de actividad enzimática fue encontrar las condiciones de máxima actividad enzimática para realizar ensayos cuantitativos de inhibición. Con las condiciones optimizadas se encontró la cantidad de SMD recombinante que dio una respuesta lineal a los 30 minutos de incubación, que es el tiempo que decidimos emplear para realizar las mediciones de inhibición.

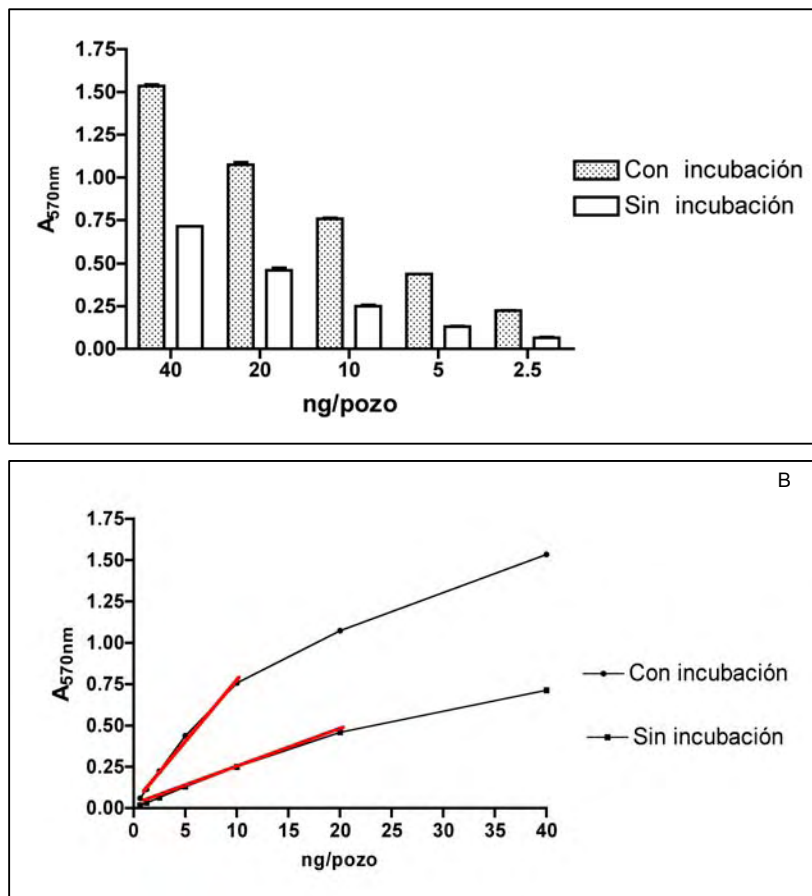


Figura 12. Panel A) Comparación en gráfica de barras de valores de A_{570nm} obtenidos por medición tipo "End Point" a los 30 minutos realizado con dos metodologías diferentes. Panel B) Velocidad lineal de actividad enzimática (línea roja), comparación de dos procedimientos y el mismo tipo de medición.

Otra condición necesaria para efectuar los ensayos de inhibición es que el cambio de absorbancia sea aproximadamente la mitad del cambio total esperado para asegurar que el sustrato esté siempre en exceso, es decir, de alrededor de 0.8. Como puede verse en el panel B (Figura 12) la reacción es lineal, sin incubación, utilizando hasta 20-25 ng/pozo de SMD y, con incubación hasta 10-15ng/pozo.

4.5 Determinación de la Dosis Efectiva Media (DE50) de cada preparado (Inhibición de la actividad enzimática de rLb Tx1 H6C)

Una vez optimizado el ensayo de actividad enzimática y obtenidos los derivados de suero hiperimmune de caballo, se llevaron a cabo de manera general 4 ensayos de inhibición de actividad enzimática de rLbTx1H6C, con cada uno de los derivados inmunoglobulínicos incluyendo el suero hiperimmune *per se* y utilizando siempre 15 ng de toxina para cada uno de ellos. Por tanto se torna evidente que para cada ensayo se utilizaron diferentes cantidades de derivados inmunoglobulínicos.

Es importante resaltar que la potencia neutralizante fue definida como Dosis Efectiva Media (ED50), calculada siempre con un 95% de confianza y definida como la cantidad en suero (ml), o derivado/preparación inmunoglobulínica (mg) que inhibe el 50% de la actividad de 1 mg de rLbTx1H6C.

El tipo de gráfico sigmoide dosis-respuesta (Figura 13) es el utilizado para graficar los valores porcentuales de inhibición contra los μ l o μ g de derivado o fracción neutralizante que se ocuparon en los ensayos, a partir de

los cuales el programa PRISMA, determinó la DE50 así como el coeficiente de regresión, el intervalo de confianza y el error estándar entre otros.

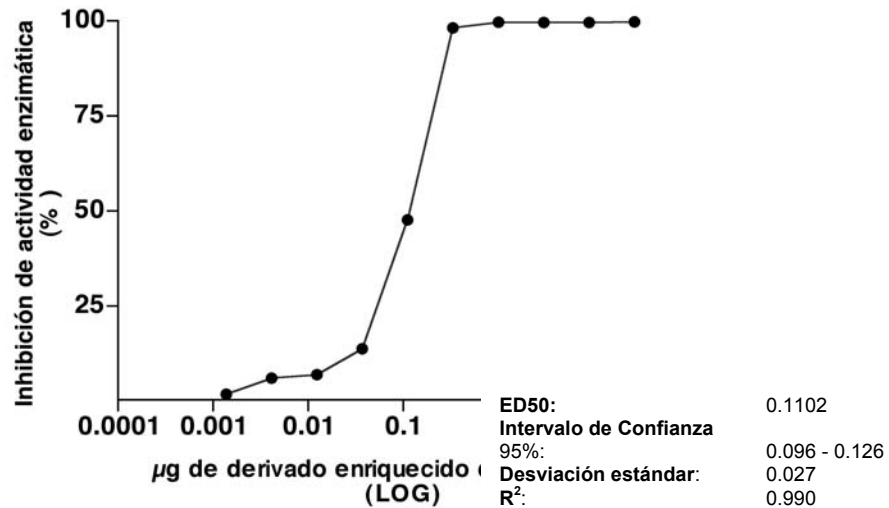


Figura 13, Clásica curva sigmoide dosis-respuesta. En este caso, se confrontó 15 ng de toxina por pozo, contra diferentes cantidades (µg) del derivado de “IgG’s Totales”. Eje X: Logaritmo de los µg de de derivado o preparado inmunoglobulínico utilizados por pozo. Eje Y: Porcentaje de inhibición de actividad enzimática, éste valor se obtiene considerando al control positivo como el 100% de actividad enzimática. ED50 de Prisma: µg de derivado que neutralizan 15 ng de toxina rLbTx1H6C.

Los resultados de los experimentos realizados con cada derivado se muestran en la Tabla 10, siendo que la recuperación de actividad porcentual (o bien de inhibición de actividad enzimática) dada por el Derivado enriquecido con IgGs Totales fue de 56.61%, resultado que podría considerarse comparable a un 60% de recuperación de actividad obtenida por el grupo de Rojas G. et al (1993)⁴⁶ quienes utilizan el mismo protocolo de purificación de inmunoglobulinas G por precipitación con ácido caprílico, pero que sin embargo evalúan el porcentaje de neutralización de diversas actividades del veneno de *Bothrops asper*.

Tabla 10. Estimación cuantitativa de proteína y actividad neutralizante de derivados obtenidos a partir del suero hiperinmune de caballo.

	Proteína (mg)	ED50 _(95% i.c.) (ml o mg "Derivado" / 1mg de SMD)	Total de SMD inhibida por fracción *	Distribución de la actividad neutralizante por fracción.	
Suero hiperinmune de caballo	9.70 ml	0.28 _(0.23 - 0.36) ml	34.03 mg	100.00	
Derivado enriquecido de IgG's Totales	141.40 mg	7.34 _(6.41 - 8.41) mg	19.23 mg	56.51	100.00
Derivado enriquecido de IgGs isotipos a,b,c	28.13 mg	18.67 _(14.3 - 24.3) mg	1.51 mg		7.85
Derivado enriquecido de IgG(T)	19.50 mg	2.10 _(1.80 - 2.50) mg	9.28 mg		48.36

* Se refiere a la cantidad en mg de rLbTx1 H6C que puede ser inhibida por fracción o derivado inmunoglobulínico.

De acuerdo a lo mostrado en la Tabla 10, el derivado inmunoglobulínico enriquecido de IgG(T) fue el de mayor potencia neutralizante, ya que sólo requirió 2.10_(1.80-2.50)mg para neutralizar 1 mg de rLbTx1H6C, lo que corresponde a 8.9 y 3.5 veces menos la ED50 correspondiente al "Derivado de IgG's no-(T)" y el "Derivado de IgG's Totales" respectivamente. Además este derivado tiene una aportación de casi el 50% de la capacidad neutralizante total del derivado del cual proviene.

El interés principal a lo largo de la historia en la producción de antivenenos ha sido la obtención de productos de calidad capaces de neutralizar efectos tóxicos y potencialmente letales de cualquier veneno y al mismo tiempo disminuir las reacciones adversas de estos productos, las cuales han sido atribuidas a diversos contaminantes, principalmente de tipo proteico y

propios de los sueros de diversas especies utilizados para crear los antivenenos⁴¹

Así pues se han propuesto y probado diversos procedimientos de purificación de anticuerpos terapéuticos^{1,7,12,13,23,34,55}, mismos que incluyen precipitación por diversas sales y compuestos orgánicos (sulfato de amonio, ácido caprílico), diferentes tipos cromatografías (exclusión molecular, intercambio iónico, afinidad, e hidrofobicidad) así como proteólisis digestivas (pepsina y papaina);

Los resultados aquí mostrados confirman dos situaciones, la primera que a diferencia de otras metodologías de purificación de inmunoglobulinas o anticuerpos terapéuticos, el procedimiento en esta tesis propuesto es muy simple y de sencilla realización; la segunda por tanto, es la confirmación de que IgG(T) es el isotipo más efectivo en la neutralización de la actividad enzimática de SMD recombinante de *L. boneti*, (y seguramente de *L. reclusa* y *L. laeta*) resultado que concuerda parcialmente con los resultados experimentales del grupo de Fernandes en (1997)¹¹ y (1999)¹², ya que encontraron en los antivenenos botrópicos y crotálicos, que el isotipo IgG(T) (IgG3-5) tiene la mayor capacidad neutralizante contra diversos efectos tóxicos en los venenos de serpientes; en este mismo contexto, Ana Flávia et al. (2006)⁵⁴ demostraron que el isotipo IgG(T) derivado de un suero hiperinmune anti-aracnídico (*Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* y *Tityus serrulatus*) fue el isotipo de mayor efectividad para neutralizar la mayoría de las actividades tóxicas de los diversos venenos utilizados.

5. CONCLUSIONES:

La evaluación de actividad de cada una de las enzimas participantes del ensayo de medición de actividad enzimática de SMD, así como la optimización de condiciones tales como temperatura y tipo de buffer principalmente, aseguró la correcta medición de la actividad de SMD.

Las variables temperatura y buffer con albúmina sérica bovina, tuvieron un efecto positivo y estimulador en la actividad enzimática de rLbTx1H6C.

Aún no ha sido elucidadas las bases moleculares que expliquen cómo el uso de albúmina sérica bovina (4mg/ml) favorece o tiene un efecto estimulador en la actividad enzimática de rLbTx1 H6C, sin embargo se consideran dos hipótesis:

- 1) Que la albúmina sérica bovina compite con la toxina por los sitios de unión con la superficie de los pozos que las contengan, evitando la unión de la toxina al pozo y permitiendo que la mayor cantidad de toxina quede libre para interactuar con su sustrato.
- 2) Que la albúmina sérica bovina actúe de igual manera que en un organismo natural, presentando a la esfingomielina (sustrato) de tal manera que permita una mejor interacción de ésta con la enzima (rLbTx1H6C).

Los experimentos realizados, una vez montadas las condiciones óptimas de medición, demostraron que la linealidad* de actividad enzimática para

rLbTx1H6C, se encontró en un rango de 0.625 - 15 ng de toxina por pozo, y de éste último con valores de A_{570nm} a los 30 minutos por arriba de 0.9

Un protocolo optimizado de medición actividad enzimática de SMD, asegura una correcta medición de la capacidad neutralizante o de inhibición de cualquier plasma, derivado o fracción, ya que cada ensayo por pozo, con una cantidad fija de toxina (para este trabajo de 15 ng), podrá considerarse como un replicado del control positivo, del cual se espera una determinada absorbancia (0.9-1.2) que será considerada como el 100% de actividad, y a partir de la cual se tabulará el porcentaje de inhibición de aquéllos pozos que fuesen ensayados con plasmas, derivados o fracciones.

Las condiciones óptimas para la obtención de IgG's purificadas, con particular interés en la obtención de IgG(T) incluyen 3 sencillos pasos: precipitación por ácido caprílico, más una cromatografía de intercambio iónico seguido por una recromatografía con las mismas condiciones de la primera.

Se demostró la potencia neutralizante del "Derivado enriquecido de IgG(T)" al poseer una mayor ED50, en comparación con los otros Derivados inmunoglobulínicos, además de aportar un 50% de recuperación de la actividad total del Derivado enriquecido de IgGs.

*Que en términos prácticos define a la actividad de una enzima cuando ésta se encuentra a máxima velocidad y con sustrato suficiente.

6. PERSPECTIVAS.

A partir de los resultados demostrados en esta tesis quedan aún por responder algunas situaciones, como por ejemplo:

- La explicación molecular del efecto estimulador de albúmina sérica bovina sobre la actividad de SMD.
- La actividad enzimática de la toxina recombinante de *L. laeta* así como la neutralización de la misma por los diferentes derivados.
- Realización de proteólisis digestivas con enzimas como pepsina o papaína para la producción de F(ab')₂ o Fab, de cada uno de los derivados de suero hiperinmune.
- Evaluar la capacidad neutralizante o de Inhibición de actividad enzimática de SMD de los fragmentos F(ab')₂ y Fab de cada derivado mencionado en esta tesis, con particular interés en el Derivado enriquecido de IgG(T).
- Purificación y caracterización de la actividad de inhibición de los subisotipos IgG3 e IgG5 (IgG(T)), con el objetivo de conocer si la potencia neutralizante de cada uno es diferente o bien, si juntas tienen un efecto sinérgico.
- Corroborar la capacidad neutralizante de cada derivado a través de pruebas *in vivo* tales como letalidad en ratones y dermonecrosis en conejo.
- En la actualidad existe un producto de tipo F(ab')₂, “Loxmyr®” realizado a partir de IgG's de sueros hiperinmunes de caballo anti- *L. reclusa*, *L.*

boneti, *L. laeta*, con excelente capacidad neutralizante. Considerando los resultados en esta tesis encontrados sería de gran interés la implementación de anticuerpos específicos y terapéuticos tales como IgG(T), ya que idealmente la producción de antivenenos tiene como objetivo disminuir la cantidad de proteína total sin perder la actividad neutralizante específica.

7. REFERENCIAS

1. Alagón, A. (2002). Anticuerpos seguros y eficaces: La revolución de los nuevos antivenenos. *Revista de la Universidad Autónoma de México* 617.
2. Barbaro, K. C., et al. (1996) Compared chemical properties of dermonecrotic and letal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J. Protein Chem* 15(4),337-343.
3. Barbaro, K. C., Knysak, L., et al. (2005). Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spiders venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45, 489-499.
4. Cevallos, M.A., Navarro, C., et al 1992. Molecular mass determination an assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyarilamide gel electrophoresis. *Toxicon* 30 925-930.
5. Coddinton, J., Levi, H. (1991) Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics* 22, 565-592.
6. De Roodt, A. R., Estévez, J., et al. (2007). Toxicity of two North American *Loxosceles* (brown recluse spiders) venoms and their neutralization by antivenoms. *Clinical Toxicology* 45, 678-687.
7. De Roodt, A. R., García, S., et al. (2004). Antitoxinas y antivenenos para uso terapéutico. *Acta Toxicol. Argent.* 12(2), 29-41.
8. De Roodt, A. R., Salomón, O. D., et al. (2002). Envenenamiento por arañas del género *Loxosceles*. Artículo Especial, *Medicina (Buenos Aires)* 62, 83-94.
9. Díaz, J. H., (2004) The global epidemiology, syndromic classification, managment and prevention of spiders bites. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 71(2) 239-250.
10. Feitosa, L., Gremski, W., et al. (1998) Detection and characterisation of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrigenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36, 1039-51.
11. Fernandes, I. L., Lima, E. X., et al. (2000). Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 38, 633-644.
12. Fernandes, I. L., Takehara, H.A., et al. (1991). Isolation of IgG(T) from hyperimmune horse antisnake venom serum: its protective ability. *Toxicon* 29, 1373-1379.

13. Fernandes, M.F., de Azevedo, R. M., *et al.* (2002) Molecular cloning and expresión of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 298 (5) 638-645.
14. Foelix, R. F. (1996) *Biology of Spiders*. Second edition. Oxford Thieme. USA. 330.
15. Gerstch, W. J., Ennik, F. (1983) The Spider Genus *Loxosceles* in North America, Central America, The West Indie (Araneae, Loxoscelidae). *Bulletin American Museum Natural History*. USA.
16. Gomez, H. F., Miller, M. J., *et al.* (2001) Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. *Toxicon* 39, 817-824.
17. Gómez, A. (2004). Minireview. Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Letters* 562, 5-10.
18. Goñi, F. M., Alonso, A. (2002). Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Letters* 531, 38-46.
19. Hogan, C. J., Barbaro K.C., Winkel K. (2004). Loxoscelism: Old Obstacles, New directions. Review Article. *Ann. Emerg. Med.* 44 608-624.
20. Jackman, J. A. (1999) *A field guide to Spiders and Scorpions of Texas*. Lone Star Books. Houston Texas.
21. Kurpiewski, G., Forrester, L. J., *et al.* (1981) Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochem. Biophys. Acta.* 678(3) 467-476.
22. Lehninger, A. J., *et al.* (1993) *Principles of Biochemistry*. Second edition. Worth Publishers. USA.
23. León, G., Lomonte, B., Gutiérrez J.M. (2005) Anticomplementary activity of equine whole IgG antivenoms: comparison of three fractionation protocols. *Toxicon* 45, 123-128.
24. Levi, H.W., Levi, L.R. (1993) *Arácnidos y otros artrópodos*. Traducción de Ma. Eugenia Manjarez Zavala. Editorial Trillas.
25. Mebs, D. (2002) *Venomous and poisonous animals. A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists*. Stuttgart Medpharm Scientific Publishers. CRC Press. 179-181, 188.
26. Meier, J., White, J. (1995) *Handbook of Clinical Toxicology of animal venoms and poisons*. CRC Press. USA.

27. Milne, M., Milne, L. (1980) National Audubon Society Field Guide to North American Insects and Spiders. Alfred A. Knopf. New York 867-868, 874-876.
28. Moolenaar, W. H. (1999). Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptor. *Experimental Cell Research* 253, 230-238.
29. Moolenaar, W. H., Van Meeteren L. A (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26, 870-881.
30. Morais, V., Massaldi, H. (2005). Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. *Toxicon* 46, 876-882.
31. Olguín, L. P. (2006) Caracterización de la actividad enzimática de la esfingomielinasa D del veneno de las arañas violinistas *Loxosceles boneti*, *L. reclusa*, y *L. laeta*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
32. Olvera, A., Ramos, B., *et al.* (2006). North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon* 48, 64-74.
33. Otha, M., Miyake, M., Emi, S., Yamano, T. (1980) Identification and properties of the prosthetic group of choline oxidase from *Alcaligenes sp.* *J. Biochem* 88 (1), 197-203.
34. Otero, R., Gutiérrez, J. M., Rojas, G., *et al.* (1999) A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG in Bothrops and Porthidium snake bites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. *Toxicon* 37, 895-908.
35. Pauli, I., Puka, J., *et al.* (2006). The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon* 48(2) 123-137.
36. Pineda, D. (2002) Accidentes por animales venenosos. Instituto Nacional de Salud. Bogotá Colombia.
37. Platnik, N. I. (2003) The World Spider Catalog, versión 5.5. American Museum of Natural History, on line at: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog81-87/index.html>. Consulta realizada el
38. Preston, K., Preston, R. (1996) The natural history of spiders. The Crowood Press. Great Britain.
39. Quintana, J.C., Otero, R. (2002). Envenenamiento aracnológico en las Américas. Revisión de Tema. *MedUNAB*. 5(13) 1-9.

40. Ramos, B. M. (2002). Comparación bioquímica, inmunológica y toxicológica de los venenos de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*. Tesis de Licenciatura. Instituto de Biotecnología. UNAM.
41. Ramos, B. M., Olvera, A., *et al.* (2005). Genetic and enzymatic characterization of Sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* 46(2) 241-250.
42. Ramos, R. H., Vázquez, I. R. (2000). Arañismo ocasionado por especies del género *Loxosceles*. Apartado Urgencias Médico-Quirúrgicas. *Revista Educativa para la Salud*. 25-34.
43. Raweerith, R., Ratanabanangkoon, K. (2003) Fractionation of equine antivenom using caprylic acid precipitation in combination with cationic ion-exchange chromatography. *J. Immunol. Methods* 282, 63-72.
44. Real Academia Española, on line at <http://www.rae.es>. Consulta realizada
45. Rees, R. S., Shack, R. B., *et al.* (1981). Management of the brown recluse spider bite. *Plast. Reconstr. Surg.* 68(5) 768-773.
46. Rojas, G., Jiménez, J. M., Gutiérrez, J. M. (1993). Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32 (3), 351-363.
47. Sánchez, M. Experiencia clínica en el diagnóstico de Loxoscelismo local y sistémico. Octava reunión Internacional de expertos en envenenamiento por animales ponzoñosos; 2007 Octubre; Juriquilla (Querétaro) México.
48. Saetang, T., *et al.* Quantitative comparison on the refinement of horse antivenom by salt fractionation and ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr., B* 700, 233-239.
49. Sanderk, L., Lynch K. R. (2005). Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 391 317-323.
50. Scopes, R. K. (1994) Protein purification: Principles and Practice. 3^a ed. Springer-Verlag. New York. USA.
51. Sheoran, A. S., Holmes, M. A. (1996). Separation of equine IgG subclasses (IgGa, IgGb, and IgG(T)) using their differential binding characteristics for staphylococcal Protein A and streptococcal Protein G. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55, 33-43.
52. Sheoran, A. S., Lunn D. P., *et al.* (1998). Monoclonal antibodies to subclass-specific antigenic determinants on equine immunoglobulin

- gamma chain and their characterization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62, 153-165.
53. Sugira, T., Imagawa, H., Kondo, T. (2000). Purification of horse immunoglobulin isotypes based on differential elution properties of isotypes from protein A and protein G columns. *J. Chromatogr., B* 742, 327-334.
54. Tambourgi, D. V., Magnoli, F.C., *et al.* (1995). Incorporation of a 35 kDa purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *J. Immunol.* 155(9) 4459-4466.
55. Tambourgi, D. V., Magnoli, F.C., *et al.* (1998). Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-Dependent Haemolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 251 366-373.
56. Theakston, R.D.G., *et al.* (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41, 541-557.
57. Toro, F. A., *et al.* (2006), Role of IgG(T) and IgGa isotypes obtained from arachnid antivenom to neutralize toxic activities of *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 48, 649-661.
58. Van Meeteren, L. A., Frederiks, F., *et al.* (2004). Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolizing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem* 279, 10833-10836.
59. Wagner, B. (2006). Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Develop. Comp. Immunol.* 30, 155-164.
60. Weir, R. C., Porter, R. R., Givol, D. (1966) Comparison of the C-terminal amino acid sequence of two horses immunoglobulins of IgG and IgG(T). *Nature* 212, 205-206.
61. Widders, P. R., Stokes, C. R. Bourne, F. J. (1986) Investigation of the antigenic relationship between equine IgG and IgG(T). *Vet. Immunol. Immunopath.* 13, 255-259.
62. World Health Organization. (1981) Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *WHO Offset publication* 58 (6).
63. Zavala, J. T., Díaz J.G., *et al.* (2004). Picaduras de alacranes y arañas ponzoñosas de México. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 47 6-12.

8. Lista de Figuras y Tablas.

1. INTRODUCCIÓN

Figuras

- I Apariencia externa del cuerpo de una araña
- II Corte longitudinal del cefalotórax
- III Opistosoma de una araña hembra, corte lateral
- IV Movimiento de los quelíceros de una araña
- V Estructura de un esfingolípidio
- VI Especificidad de las fosfolipasas
- VII Propuesta de mecanismo de acción del veneno de *Loxosceles* en humano con opciones de tratamiento
- VIII Presentación esquemática de una inmunoglobulina G.
- IX Efecto de dos enzimas proteolíticas sobre inmunoglobulinas G.

Tablas

- I Relación de fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular
- II Porcentaje de identidad (Secuencia N-terminal) de diversas SMD de arañas *Loxosceles*
- III Nomenclaturas de IgG de acuerdo al gen codificante de la cadena pesada constante
- IV Distribución de inmunoglobulinas secretadas en diversos fluidos corporales de caballos sanos.

Cuadros

- A. Taxonomía de las arañas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Figuras

- 1. Esquema de la reacción enzimática en cadena acoplada de SMD
- 2. Esquema de la reacción enzimática con Peroxidasa de rábano
- 3. Esquema de la reacción producida por Colina Oxidasa y Peroxidasa de rábano

Tablas

- 1. Concentración y proporción de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción
- 2. Cálculos requeridos para obtener la Actividad específica de SMD recombinante
- 3. Concentración y proporciones de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción
- 4. Cálculo de la actividad de HRP

5. Concentración y proporciones de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción
6. Cálculos requeridos para obtener la actividad volumétrica de Colina Oxidasa
7. Concentración y proporción de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción para evaluar la actividad de Colina Oxidasa
8. Esquema de la Preparación de una placa de reacción
9. Cálculo del porcentaje de inhibición de actividad enzimática de SMD.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figuras

1. Análisis electroforético en SDS del sobrenadante obtenido a partir de la precipitación por ácido caprílico
2. Cromatograma representativo de 3 corridas electroforéticas, separación de los isotipos de inmunoglobulinas G
3. Análisis electroforético de las colecciones A y B obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico
4. Recromatografía de la colección A
5. Recromatografía de la colección B
6. Análisis electroforético de colecciones 1 y 2 obtenidas por recromatografía
7. Rango lineal de la cinética enzimática de Peroxidasa de Rábano
8. Curva de actividad enzimática de Colina Oxidasa
9. Cinética enzimática de Colina Oxidasa
10. Cinética enzimática de SMD Ensayos 1, 2, 3.
11. Gráficas comparativas, velocidad inicial, y Unidad enzimática
12. Gráficas comparativas de dos procedimientos, Valores de A_{570nm} , velocidad inicial
13. Clásica curva sigmoide Dosis-Respuesta.

Tablas

1. Rendimiento porcentual volumétrico y cuantitativo del suero hiperinmune de caballo después de la precipitación por ácido caprílico
2. Volumen y cantidad de carga protéica por corrida cromatográfica
3. Porcentaje de recuperación de las colecciones A y B después de la cromatografía
4. Porcentaje de recuperación de las colecciones A y B después del proceso de ultracentrifugación
5. Porcentaje de recuperación de las fracciones obtenidas por recromatografía
6. Actividad enzimática específica de Peroxidasa de Rábano
7. Actividad volumétrica de Colina Oxidasa
8. Actividad específica de rLbTx1H6C con buffer 1X-BSA
9. Estimación cuantitativa de proteína y actividad neutralizante de derivados obtenidos a partir de suero hiperinmune de caballo