



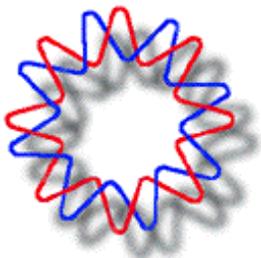
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

**EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE
VARIANTES TÓXICAS Y NO TÓXICAS
DE LA TOXINA C_{ss}II Y SU EVALUACIÓN
COMO INMUNÓGENOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A :
KENYA HERNÁNDEZ SALGADO



TUTOR: DR. GERARDO A. CORZO BURGUETE

CUERNAVACA, MOR. 2009



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.

JURADO REVISOR

DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY
DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ
DR. HUMBERTO LANZ MENDOZA
DRA. ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS
DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE

Esta tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología, UNAM, bajo la tutoría del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete.

Durante el trabajo experimental recibí una beca de maestría de CONACyT (219261) y apoyo económico del Proyecto de CONACyT 49773-Q y DGAPA-UNAM IN220809-3 para la escritura de la tesis.

Sorprendernos por algo es el primer paso hacia el descubrimiento.
Louis Pasteur (1822-1895)

*A mis padres, **Juan y Sara**,
por todo su amor y su apoyo incondicional.*

*A mis hermanos, **Iván, Yareli y Citlalli**,
por todo el cariño, la convivencia y la paciencia.*

AGRADECIMIENTOS

Indudablemente esta tesis es fruto de un gran esfuerzo no solo de mi parte, sino de mi asesor. Sin embargo, tengo la profunda convicción de que llegué hasta aquí gracias a muchas personas que han estado conmigo dentro y fuera del ámbito científico. No me alcanzarían las páginas de esta tesis para agradecer personalmente a todos aquellos que me dieron una parte de su vida en alguna etapa de la mía. Para todos aquellos que aún están conmigo y para los que no, un enorme agradecimiento; los llevo siempre en mi corazón.

A Dios, por haberme permitido llegar hasta aquí. Por todo el amor, por mi familia, por mis amigos, por la salud y por todas las bendiciones que recibo día tras día. Por el libre albedrío y porque mientras más avanzo, más creo.

A mis padres, Juan y Sara, porque siempre están para mí, me apoyan en todas mis decisiones y siempre me alientan a seguir. Por una maravillosa familia y por todos los momentos en que han hecho que escape del escritorio. Esto sigue siendo por ustedes y gracias a ustedes. Los amo siempre!

A mis hermanos, Iván, Yareli y Citlalli, por toda la paciencia que me tienen y por soportar mis arrebatos de locura. Son la luz de mi vida. Los quiero muchísimo!

A toda mi familia, de los dos lados, por estar conmigo y ser parte de mí.

Al Dr. Gerardo Corzo, por darme la oportunidad de trabajar con usted y por transmitirme una parte de su conocimiento, le agradezco mucho la confianza que tuvo en mi trabajo y haber formado parte de mi formación, no solo como científica, sino también como persona.

Al Dr. Lourival Possani, por permitirme entrar en su grupo de investigación, por sus observaciones y comentarios en los seminarios y por procurar siempre el bienestar de nuestro grupo.

A la Dra. Gina Estrada, que me llevó de la mano en mis primeros pasos en esta área de investigación, te agradezco mucho la paciencia, la convivencia y el apoyo para los ensayos de unión.

A los miembros de mi jurado revisor, por todos los comentarios y aportes a esta tesis.

Al Dr. Baltazar Becerril, a la Dra. Rosana Sánchez y al M. en C. Alejandro Olvera, de mi comité tutorial, porque sus valiosos comentarios en los tutoriales, hicieron que mi proyecto culminara en esta tesis.

A la Dra. Rita Restano y a la Dra. Gloria Saab por su apoyo para los ensayos de electrofisiología y dicroísmo circular.

A la Dra. Elizabeth Mata, por el apoyo para el uso del bioterio.

A Fernando Zamudio, Timoteo Olamendi y Fredy Coronas, por todo el apoyo técnico aportado a este trabajo.

A Antonio Bolaños y Gloria Villa, por su invaluable ayuda en los trámites académico-administrativos. Le estoy sumamente agradecida.

A LiLu, Francia, Sandra, Alexis y Guillermo. Gracias por todas las pláticas científicas y no científicas. Somos el equipo Corzo!

A Mary, Verna, Cynthia, Lidia G, Miryam, Rita, Martha, Carmen y Marisol S., por su amistad, por ayudarme en mi llegada al laboratorio y por hacer que no todos los días sean solo experimentos.

A todos los miembros de los grupos Possani – Becerril: A los doctores Lourival Possani, Baltazar Becerril, Blanca García, Ernesto Ortiz, Fernando Zamudio, Georgina Gurrola, Gerardo Corzo, Lidia Riaño, Marisol Sandoval, Martha Pedraza, Rita Restano, Rivelino Juárez y Veronica Quintero, a Alexis, Carmen, Cipriano, Cynthia, Dora, Everardo, Francia, Fredy, Gabriel, Guillermo, Itzel, Irán, Juan Carlos, Lidia G, LiLu, Linda, Lorenzo, Marisol, Martha, Mary, Miryam, Oscar, Pável, Polo, Rosalba, Rosby, Santos, Timo y Verna. Por toda la convivencia y por todo el apoyo. Me siento afortunada de formar parte de este grupo.

A mis compañeros y amigos de la maestría, Dámaris, Ramsés, Omar, Fernando, Marco y Carlos. Con ustedes fue más fácil el proceso. La Resistáncia vive!

A mis grandes amigos de las diferentes etapas de mi vida, Cynthia, Estefanía, Priscilla, Cindy, Isabel e Iván, por haber llegado a mi vida y permanecer en ella. Por su amistad y su apoyo cuando más los necesité. Por todos los momentos que he pasado con cada uno de ustedes. Por la compañía que me brindaron cuando necesité que la cordura volviera a mi vida, cuando necesité reír y cuando necesité llorar. Mil gracias por todo!

Porque no hay coincidencias en esta vida, a todos aquellos que han estado en la mía... Muchas gracias!

Kenya

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas.....	4
Índice de figuras.....	5
Abreviaturas y Anglicismos.....	6
Resumen.....	9
1. Introducción.....	11
1.1 El alacranismo en el mundo y en México.....	11
1.2 Los alacranes.....	12
1.3 El veneno del alacrán.....	13
1.4 Los tratamientos actuales.....	14
2. Antecedentes.....	16
2.1 Las toxinas de alacranes.....	16
2.2 Canal de sodio dependiente de voltaje.....	18
2.3 Mecanismo de toxicidad de las β toxinas de alacranes: Trampa del sensor de voltaje.....	20
2.4 Las toxinas como inmunógenos.....	22
2.5 <i>Centruroides suffusus suffusus</i> y la toxina C _{ss} II.....	24
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. Materiales y Métodos.....	27
5.1 Reactivos, Enzimas y Kits.....	27
5.2 Cepas, Vectores y Oligonucleótidos.....	27
5.3 Medios de cultivo y Soluciones.....	28
5.4 Animales.....	30
5.5 Equipos y Métodos Generales.....	30
5.6 Obtención de la toxina C _{ss} II nativa (nC _{ss} II).....	32
5.7 Construcción, clonación, expresión y purificación de las toxinas recombinantes.....	32
5.7.1 Obtención del ADN plasmídico.....	35
5.7.2 Secuenciación del ADN.....	36
5.7.3 Obtención de la secuencia codificante de interés y construcción en el vector de expresión pQE30.....	36
5.7.4 Expresión de las proteínas.....	37
5.7.5 Recuperación de las proteínas.....	37
5.7.6 Purificación por afinidad.....	38
5.7.7 Plegamiento <i>in vitro</i>	38
5.7.8 Purificación por rpHPLC.....	39

5.7.9	Proteólisis con Factor Xa.....	39
5.7.10	Repurificación por HPLC de intercambio iónico.....	39
5.7.11	Electroforesis de proteínas.....	39
5.7.12	Espectrometría de masas.....	40
5.8	Caracterización de las toxinas.....	40
5.8.1	Ensayos de toxicidad.....	40
5.8.2	Ensayos de electrofisiología.....	40
5.8.3	Ensayos de dicroísmo circular.....	41
5.8.4	Ensayos de unión.....	41
	5.8.4.a Preparación de sinaptosomas de cerebro de rata.....	41
	5.8.4.b Marcaje de la toxina nativa C _{ss} II con ¹²⁵ I.....	42
	5.8.4.c Ensayos de unión a sinaptosomas.....	42
5.9	Evaluación inmunológica de nC _{ss} II, rC _{ss} II, HisrC _{ss} II y rE15R.....	42
5.9.1	Inmunización de conejos.....	42
5.9.2	ELISA.....	43
5.9.3	Determinación de la Dosis Letal 50 (DL ₅₀) Intraperitoneal de la toxina nativa C _{ss} II.....	43
5.9.4	Determinación de la Dosis Letal 50 (DL ₅₀) Intraperitoneal del veneno total de <i>Centruroides suffusus suffusus</i>	44
5.9.5	Ensayos de neutralización.....	44
	5.9.5.a Con la toxina nC _{ss} II.....	44
	5.9.5.b Con la toxina nC _n 2.....	44
5.9.6	Determinación de la Dosis Efectiva 50 (DE ₅₀) de los sueros inmunes de conejo.....	45
6.	Resultados.....	46
6.1	Obtención de la toxina nativa (nC _{ss} II).....	46
6.2	Construcción, clonación, expresión y purificación de las toxinas recombinantes.....	47
6.3	Caracterización de las toxinas.....	52
	6.3.1 Variante no tóxica.....	52
	6.3.2 Ensayos de electrofisiología.....	52
	6.3.3 Ensayos de dicroísmo circular.....	53
	6.3.4 Ensayos de unión.....	54
6.4	Evaluación inmunológica de nC _{ss} II, rC _{ss} II, HisrC _{ss} II y rE15R.....	55
	6.4.1 Inmunización de conejos y detección de anticuerpos por el método de ELISA.....	55
	6.4.2 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL ₅₀) de la toxina nativa C _{ss} II del veneno total de <i>Centruroides suffusus suffusus</i>	57
	6.4.3 Pruebas de neutralización y determinación de la Dosis Efectiva 50 (DE ₅₀) de los sueros inmunes de conejo.....	58
7.	Discusión.....	62
7.1	Expresión heteróloga de toxinas de alacrán y los problemas de plegamiento.....	62
	7.1.1 Importancia del residuo 15 (Glutámico).....	63
7.2	Evaluación inmunológica de nC _{ss} II, rC _{ss} II, HisrC _{ss} II y rE15R.....	64

7.2.1 DL ₅₀ de la toxina nativa C _{ss} II y del veneno total de <i>Centruroides suffusus suffusus</i>	64
7.2.2 Neutralización de la toxina nativa C _{ss} II y del veneno total de <i>Centruroides suffusus suffusus</i> por los anticuerpos producidos en conejo.....	65
7.2.3 Reactividad cruzada.....	65
7.2.4 DE ₅₀ de los sueros inmunes de conejo.....	66
8. Conclusiones.....	68
9. Perspectivas.....	70
10. Referencias.....	71
11. Anexo 1. Tablas adicionales.....	77
12. Anexo 2. Glosario de términos médicos.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Toxinas cuyos anticuerpos neutralizaron el veneno total de la especie de la que proceden.....	21
Tabla 2	Reactividad cruzada presentada en diversas especies de alacranes.....	22
Tabla 3	Secuencia de aminoácidos de las toxinas trabajadas en el presente proyecto.....	30
Tabla 4	Oligonucleótidos para clonar el ADNc de C _{ss} II e introducir los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y PstI y el Factor Xa.....	32
Tabla 5	Oligonucleótidos para generar la variante E15R.....	32
Tabla 6	Condiciones de PCR utilizadas para amplificar el ADN codificante para las diferentes variantes.....	32
Tabla 7	Secuencias aminoacídicas de nC _{ss} II, rC _{ss} II sin cortar y rC _{ss} II cortada.....	50
Tabla 8	Resultados de los ensayos de toxicidad para las toxinas evaluadas.....	51
Tabla 9	Protocolo de inmunización de conejos con los péptidos nC _{ss} II, rC _{ss} II, HisrC _{ss} II y E15R.....	55
Tabla 10	Ensayos de neutralización.....	60
Tabla 11	Comparación aminocídica entre las toxinas C _{ss} II y C _{ss} IV.....	63
Tabla 12	Comparación aminocídica entre las toxinas C _{ss} II, Cn2, CII1 y CII2.....	65
Tabla A	Títulos de anticuerpos obtenidos en las diferentes sangrías.....	76
Tabla B	Resultados experimentales para la determinación de la DL ₅₀ IP de la toxina nC _{ss} II.....	77
Tabla C	Resultados experimentales para la determinación de la DL ₅₀ del veneno de <i>Centruroides suffusus suffusus</i>	77
Tabla D	Resultados experimentales de las pruebas de DE ₅₀ para los sueros inmunes.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Distribución mundial del alacranismo.....	10
Fig. 2	Distribución esquemática de las especies de alacranes peligrosos en México.....	12
Fig. 3	Estructura tridimensional de toxinas de alacrán de “cadena larga” con el motivo estructural $\beta\alpha\beta\beta$	15
Fig. 4	Grupos funcionales de las toxinas específicas para los NaCh.....	16
Fig. 5	Canal de sodio dependiente de voltaje.....	17
Fig. 6	Sitios farmacológicos de unión en el canal de sodio dependiente de voltaje...	18
Fig. 7	Modelo de la “trampa del sensor de voltaje”.....	20
Fig. 8	Vectores utilizados en este trabajo.....	27
Fig. 9	ADNc codificante para C _{ss} II, con las modificaciones introducidas por PCR para su expresión como proteína recombinante.....	31
Fig. 10	Predicción de estructuras secundarias para C _{ss} II y E15R.....	33
Fig. 11	Purificación de la toxina nativa C _{ss} II.....	45
Fig. 12	Representación esquemática de la toxina en pQE-30.....	46
Fig. 13	Gel de agarosa al 1 % de la reacción de digestión de pGEM-C _{ss} II.....	47
Fig. 14	Gel de poliacrilamida al 15 % de la expresión de rE15R.....	47
Fig. 15	rE15R correctamente plegada.....	48
Fig. 16	Gráfica de HPLC acoplado a intercambio iónico después de proteólisis con FXa.....	49
Fig. 17	Espectros de masas de E15R plegada (sin cortar) y cortada.....	50
Fig. 18	Ensayos de electrofisiología para las toxinas nC _{ss} II, rC _{ss} II y rE15R.....	52
Fig. 19	Dicroísmo circular para las toxinas nC _{ss} II, rC _{ss} II, HisrC _{ss} II y rE15R.....	53
Fig. 20	Ensayos de unión para las toxinas nC _{ss} II, rC _{ss} II, HisrC _{ss} II y rE15R.....	54
Fig. 21	Títulos de anticuerpos obtenidos en las diferentes sangrías.....	56
Fig. 22	Gráficas de los análisis de la DL50 de la toxina C _{ss} II y del veneno de <i>C. s. suffusus</i> vía IP.....	57
Fig. 23	Gráficas de análisis de las DE50 de los sueros inmunes.....	59
Fig. 24	DE50 de los sueros inmunes.....	59

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)
ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
Bj-xtrIT	Toxina Bj-xtrIT (<i>Buthus judaicus</i>)
BLAST	Herramienta de búsqueda básica de alineamiento local
BSA	Albúmina sérica bovina
C-terminal	Carboxilo terminal
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Cii1	Toxina Cii1 nativa (de <i>Centruroides infamatus infamatus</i>)
CII1	Toxina CII1 nativa (de <i>C. limpidus limpidus</i>)
CII2	Toxina CII2 nativa (de <i>C. l. limpidus</i>)
Cn2	Toxina Cn2 nativa (de <i>C. noxius</i>)
CsEM1	Toxina CsEM1 nativa (de <i>C. sculpturatus</i>)
CssIV	Toxina CssIV nativa (de <i>C. suffusus suffusus</i>)
DE50	Dosis Efectiva 50
DL50	Dosis Letal 50
DO	Densidad óptica
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbencia acoplado a enzimas
FXa	Factor Xa
g	Gramos
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado.
h	Horas
HEPES	Ácido 4-(2hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
HissrCssII	Toxina rCssII fusionada a una cola de histidinas y FXa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IC	Intracraneal
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KCl	Cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potasio
L	Litro
LB	(Medio) Luria-Bertoni
M	Molar
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
N-terminal	Amino terminal

Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato ácido de sodio
NaCh, Na _v	Canal de sodio dependiente de voltaje
NaCl	Cloruro de sodio
nCssII	Toxina CssII nativa
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
PBS	Solución amortiguadora (“Buffer”) Fosfato Salino
PBST	“Buffer” Fosfato Salino – Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA	Persulfato de amonio
rCssII	Toxina CssII recombinante
rE15R	Toxina E15R recombinante
rpHPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
seg	Segundos
TBE	(“Buffer”) Tris-Borato-EDTA
TE	(“Buffer”) Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
T _m	Temperatura de fusión del ADN
Tris	2-amino-2- hidroximetil-1-3 propanediol
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

Genotipo de las células

F ⁻	No acarrea el plásmido F
r _{B/K} ^{+/-}	B/K define el linaje de la cepa. +/- indica si la cepa tiene o no el sistema de restricciones.
m _{B/K} ^{+/-}	B/K) define el linaje de la cep. +/- indica si la cepa tiene o no el sistema de metilación.
hsdS	Tanto la restricción y la metilación de ciertas secuencias se elimina de la cepa.
hsdR	Para la transformación eficiente de ADN clonado no metilado a partir de amplificaciones por PCR
Δ()	Delección cromosomal de los genes indicados.
dcm	Metilación de citocina en la segunda C de sitios CCWGG existentes.
deoR	Gen regulador que permite la expresión constitutiva de los genes de la síntesis de desoxirribosa, permite la captación de grandes plásmidos.
endA1	Para la obtención ADN más limpios y mejores resultados en aplicaciones posteriores debido a la eliminación de digestión no específica por la endonucleasa I
glnV	Supresión del codón de paro UAG por la inserción de glutamina.

gyrA96	Mutación en la ADN girasa; confiere resistencia al ácido nalidixico.
lacI ^Q	Sobreproducción de la proteína supresora lac.
lacZΔM15	Supresión parcial del gen lacZ que permite la α complementación del gen de la β -galactosidase gene. Requerido para la selección Blanco/Azul de las placas XGal.
lon	Proteasa lon.
nupG	Igual que deoR.
ompT	Mutación de la proteasa VII de la membrana externa, lo que reduce la proteólisis de las proteínas expresadas.
(ϕ 80)	Las células acarrean el profago lamdoide ϕ 80.
proA/B	Requiere prolina.
recA1	Reduce la aparición no deseada de recombinaciones en el ADN clonado.
relA	Fenotipo relajado, permite la síntesis de ARN, en ausencia de la síntesis de proteínas.
thi	Requiere tiamina.
Tn10	Transposón normalmente acompañado de resistencia a tetraciclina.

ANGLICISMOS

“Buffer”	Solución amortiguadora
“Kit”	Paquete comercial para biología molecular
“Logrank test”	Ensayo estadístico para análisis de supervivencia
“Patch-Clamp”	Fijación de voltaje en microáreas de membrana

RESUMEN

La toxina C_{ss}II es un neuropéptido de 66 aminoácidos que se encuentra presente en el veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* y que se ha reportado como la toxina más abundante responsable de la toxicidad de este veneno. Esta toxina afecta a canales de sodio dependientes de voltaje (NaCh) y se clasifica como una toxina de tipo β [Martin *et al.*, 1987] Existen antecedentes que muestran que las toxinas tipo β actúan sobre los NaCh por un mecanismo conocido como Trampa del Sensor de Voltaje. En este modelo se propone que el residuo E15 interacciona con las argininas del sensor de voltaje del canal, por lo que se ha señalado a este residuo como un aminoácido indispensable para la toxicidad [Cestèle *et al.*, 1998]. Se han realizado cambios de este residuo por arginina en otras toxinas (C_{ss}IV y B_j-xtrIT), con el fin de modificar la carga y se observó que la toxina C_{ss}IVE15R no modifica las corrientes del canal Nav1.2, o bien la toxina B_j-xtrITE15R no presenta actividad tóxica en insectos [Cohen *et al.*, 2005; Karbat *et al.*, 2004]

Si bien, existen excelentes antivenenos para el tratamiento de las picaduras de alacrán en México, no todos los anticuerpos presentes en los fragmentos F(ab)₂ de caballo usados en la actualidad, son relevantes para neutralizar la actividad del veneno.

Así, se formuló la hipótesis de que la generación de anticuerpos específicos contra una variante de C_{ss}II que no presentara toxicidad, por sí sola podría ser suficiente para proteger contra el veneno de este alacrán y algunas toxinas relacionadas como una alternativa a los antivenenos.

Para evaluar lo anterior, los ácidos desoxirribonucleicos complementarios (ADNc) codificantes para C_{ss}II y sus variantes fueron clonados en el vector de expresión pQE30. Los plásmidos pQE30-toxinas se emplearon para transformar células *E. coli* BL21 (DE3). La expresión, extracción y purificación de las proteínas recombinantes se realizaron mediante un método anteriormente utilizado en nuestro grupo de investigación [Estrada *et al.*, 2007]. Posterior a la evaluación de su toxicidad, tres diferentes péptidos recombinantes fueron utilizados para inmunizar conejos: la recombinante C_{ss}II con y sin la cola de histidinas (HisrC_{ss}II y rC_{ss}II) y una más en el que el residuo glutámico 15 se reemplazó por arginina (rE15R). Adicionalmente, un conejo fue inmunizado con la neurotoxina nativa

CssII (nCssII) como control. Los efectos neutralizantes del suero de los conejos inmunizados fueron probados por incubación de cada suero con 3DL₅₀ de CssII nativa y ensayados por separado en grupos de 6 ratones CD1. Experimentos similares fueron realizados utilizando 3DL₅₀ de veneno total de *Centruroides suffusus suffusus* para evaluar la DE₅₀ de cada suero. Posteriormente se realizaron ensayos de competencia *in vitro* mediante ensayos electrofisiológicos con la toxina nativa sola y en combinación con las variantes a evaluar; e *in vivo* con ratones CD1 para evaluar la posible función de las toxinas como inhibidores competitivos.

Dentro de los resultados, se observa que las toxinas recombinantes presentan estructura similar a la toxina nativa, concordando además con estructuras conocidas de toxinas de alacrán específicas para canales de sodio; además son capaces de desplazar a la toxina nativa de su receptor en el cerebro de rata lo que implica que reconocen un blanco similar, en este caso, el canal de sodio. Las toxinas recombinantes HisrCssII y rCssII fueron tóxicas para ratones CD1, mientras que rE15R no lo fue. Los títulos de anticuerpos obtenidos de conejo fueron en el orden de 10⁴ para anti-nCssII, anti-HisrCssII y anti-rE15R y de 10⁵ para anti-rCssII. Todos los sueros fueron capaces de neutralizar el efecto de la toxina CssII nativa, así como a la toxina nativa Cn2, una toxina bloqueadora de canales de sodio y que es la más tóxica y abundante del alacrán *Centruroides noxius*. Estos sueros también neutralizaron al veneno total de *Centruroides suffusus suffusus*, lo cual se indica en la determinación de las DE₅₀.

Como conclusiones del trabajo, se asumió que las tres toxinas recombinantes y la toxina nativa contienen epítopes comunes. Las toxinas recombinantes son capaces de generar anticuerpos neutralizantes con altos títulos en conejos, demostrando variante no tóxica de una toxina de alacrán puede ser utilizada como inmunógeno.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *El alacranismo en el mundo y en México*

El alacranismo es un problema de salud en países tropicales y subtropicales originado por la picadura de alacranes venenosos para mamíferos, que afecta a grandes núcleos de población, tanto en el medio rural como en el urbano (figura 1). Las consecuencias del alacranismo han sido subestimadas debido a que en algunos países desarrollados y en la mayoría de los subdesarrollados, no todos los casos de picadura de alacrán se registran en las estadísticas de salud, por no tratarse de un daño a la salud de notificación obligatoria [Granja-Bermúdez *et al.*, 1999; Osnaya-Romero *et al.*, 2001]

Se estima que hay en el mundo 2.3 billones de población en riesgo y que el número anual de picaduras de alacrán excede los 1.2 millones, con 3,250 muertes a nivel mundial [Chippaux y Goyffon, 2008].

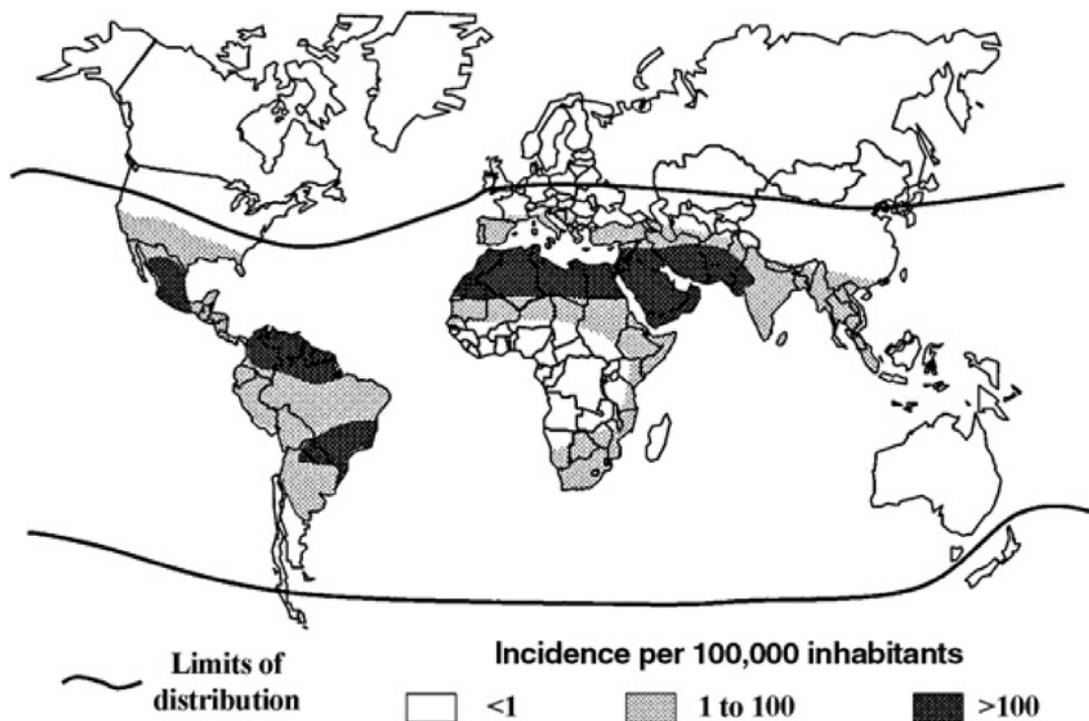


Fig. 1. Distribución mundial del alacranismo [Chippaux y Goyffon, 2008].

México es el país con mayor índice de alacranismo del mundo, por sus características biogeográficas, su gran cantidad de especies peligrosas y la abundancia de ejemplares. De 1,959,248 km² de área terrestre del país, 593,486 km² son áreas alacranígenas (30.3 %). En estas áreas se encuentra el 36.8 % del total de la población de alacranes, lo que conduce a altas tasas anuales de morbilidad [González-Rivera *et al.*, 2004]. Se estima que en México un promedio de 250,000 personas son picadas anualmente, y que cada año ocurren entre aproximadamente 70 muertes por picadura de alacrán en México, sobre todo en menores de 10 años de edad, que es la población de alto riesgo [DGEPI, 2009]. Entre las causas de muerte por reacciones tóxicas y envenenamientos causados por plantas y animales venenosos, las picaduras de alacrán han ocupado el primer lugar por más de 20 años, encontrándose además entre las primeras 15 causas de enfermedad [Celis *et al.*, 2007; González-Rivera *et al.*, 2004; Granja-Bermúdez *et al.*, 1999].

La tasa de picaduras de alacrán se ha incrementado en los últimos años, como consecuencia de una mejora en el registro de casos de alacranismo en el país. Este problema representa una importante causa de demanda de asistencia médica en 12 estados de la República Mexicana: Aguascalientes, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Sinaloa y Zacatecas [Celis *et al.*, 2007; Granja-Bermúdez *et al.*, 1999].

1.2 Los alacranes

Los alacranes son una especie que ha existido desde hace 400 millones de años, por lo que pertenecen a uno de los grupos de animales más antiguos en la tierra. En la actualidad existen aproximadamente 1,500 especies diferentes de alacranes, que se ubican en las regiones cálidas del planeta. Los alacranes peligrosos para los humanos pertenecen a la familia Buthidae, con aproximadamente 500 especies comprendidas dentro de los géneros *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus*, *Buthotus* y *Heterometrus* en Asia menor y en el Norte de África; *Parabuthus* en el sur de África; *Centruroides* distribuido en el sur de Estados Unidos, México y América Central, y el género *Tityus* en Trinidad y Tobago y América del Sur [Chippaux y Goyffon, 2008; Gurevitz *et al.*, 2007; Possani *et al.*, 1999].

En México se han identificado 221 especies de alacranes, clasificados dentro de 7 familias. En la familia Buthidae, el género *Centruroides* cuenta con 21 especies, 7 de las cuales se consideran como peligrosas por poseer veneno neurotóxico al hombre (figura 2): *C. elegans*, *C. sculpturatus*, *C. infamatus infamatus*, *C. limpidus limpidus*, *C. l. tecumanus*, *C. noxius* y *C. suffusus suffusus* [Alagón *et al.*, 2003; González-Rivera *et al.*, 2004]. Actualmente estas especies se encuentran cada vez más en las cercanías de las viviendas, dada la tendencia actual de nuestras poblaciones a crecer e invadir su nicho ecológico, englobándolo dentro del hábitat humano [Granja-Bermúdez *et al.*, 1999].

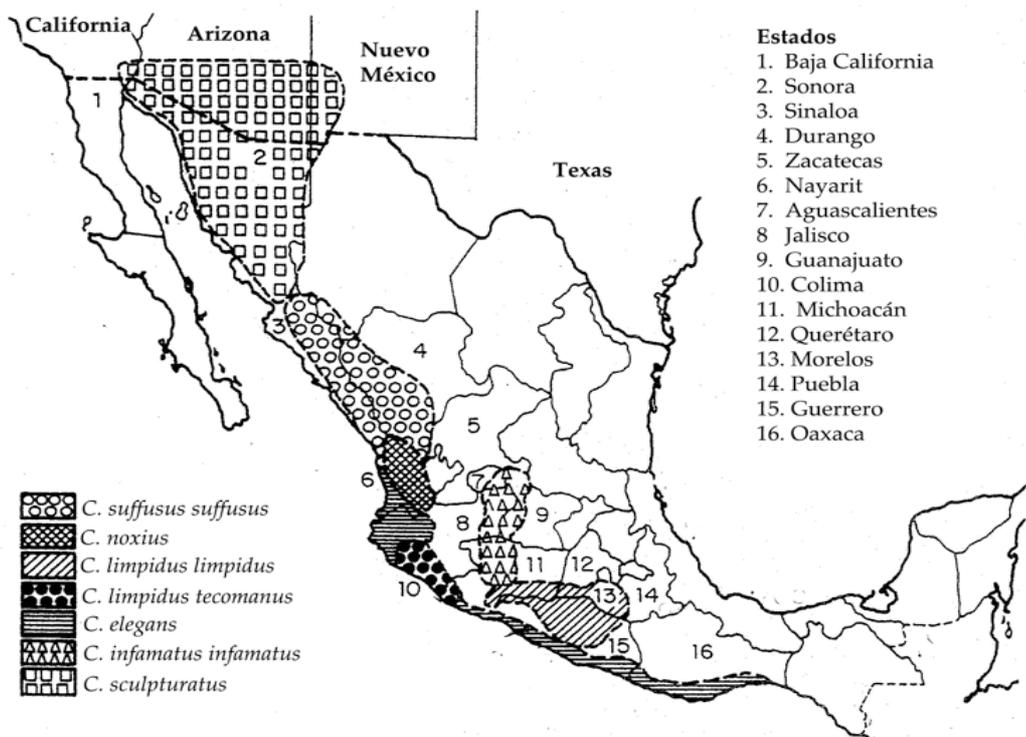


Fig. 2. Distribución de las especies de alacranes peligrosos en México [Alagón *et al.*, 2003].

1.3 El veneno del alacrán

El veneno de los alacranes contiene una gran variedad de compuestos biológicamente activos: enzimas, péptidos, nucleótidos, aminas biogénicas (ej. 5-hidroxitriptamina) y otras sustancias desconocidas [Possani *et al.*, 1999; Rodríguez

De La Vega y Possani, 2005]. Algunos de los componentes más destacados del veneno de los alacranes son: hialuronidasa que aumenta la permeabilidad capilar para facilitar la absorción [Morey *et al.*, 2006; Nair y Kuryo, 1975; Pessini *et al.*, 2001; Ramanaiah *et al.*, 1990], 5-hidroxitriptamina de la que depende la producción de dolor y edema en el sitio de la picadura [Adam y Weiss, 1956; Bagchi y Deshpande, 1999; Nair y Kuryo, 1975] y proteínas de bajo peso molecular, comúnmente llamados toxinas, que tienen la capacidad de unirse a los canales iónicos y alterar la función y comunicación celular [Albuquerque *et al.*, 1988; Blaustein *et al.*, 1991; Cahalan, 1975; Kozminsky-Atias *et al.*, 2008], lo que da lugar a los síntomas clínicos y efectos letales observados después de la picadura del alacrán. Los síntomas locales incluyen dolor intenso y prurito en el sitio de la picadura, parestesias locales y ocasionalmente edema. Los síntomas o efectos sistémicos incluyen irritabilidad, hipertermia, dolor y parestesias en todo el cuerpo, prurito nasal, sensación de cuerpo extraño faríngeo, sialorrea, estornudos, fasciculaciones linguales, dislalia, cianosis peribucal, epifora, fotofobia, nistagmus, amaurosis pasajera, diplopía, alteraciones del ritmo cardíaco y de la presión arterial, dificultad respiratoria, distensión y dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea y priapismo [Alagón *et al.*, 2003; Chippaux y Goyffon, 2008]. Las toxinas son el grupo de compuestos, más estudiado y caracterizado en el veneno del alacrán.

Los alacranes usualmente inyectan su veneno subcutáneamente de donde se distribuye a todo el organismo por el sistema circulatorio y si son especies muy venenosas, en minutos pueden matar a mamíferos pequeños. Las toxinas del veneno del alacrán tienen una afinidad selectiva por el sistema nervioso central y periférico [Possani *et al.*, 1999].

1.4 Los tratamientos actuales

Actualmente la producción de antivenenos se realiza inmunizando caballos con el veneno total de los arácnidos de interés, siendo que unas pocas toxinas presentes en los venenos son las que en verdad son tóxicas para los humanos u otros mamíferos [Olvera *et al.*, 2006; Zamudio *et al.*, 1992]. Debido a esto, una de las desventajas de los actuales antivenenos es la gran cantidad de proteína no-específica que contienen. Estos anticuerpos no específicos pueden ser los responsables de efectos secundarios en los pacientes bajo

tratamiento, especialmente en menores de edad. La producción de Faboterápicos (i.e. F[ab']₂) representa un avance para mejorar la calidad de los antivenenos [Ismail, 2003]; sin embargo, estos aún podrían mejorarse al disminuir aquellos anticuerpos generados contra fracciones del veneno que no estén involucradas en la toxicidad al humano, de esta manera se aumentaría la especificidad del antiveneno.

2. ANTECEDENTES

2.1 Las toxinas de alacranes

Los alacranes peligrosos para mamíferos contienen un gran número de péptidos y/o toxinas, que de acuerdo a su tamaño se clasifican en toxinas de cadena corta (20-40 residuos de aminoácidos) y en toxinas de cadena larga (58-76 residuos de aminoácidos). Estos últimos son los responsables de los síntomas neurotóxicos desarrollados durante el envenenamiento por alacranes, y fueron los primeros péptidos caracterizados de los venenos de alacranes [Rodríguez De La Vega y Possani, 2005]. Cuatro familias diferentes de toxinas se han descrito en función de su blanco específico, que pueden ser: canales de sodio, canales de potasio, canales de cloro y canales de calcio [Possani *et al.*, 1999].

Todas las toxinas específicas para canales de sodio están constituidas por 60-76 residuos de aminoácidos y están estabilizadas por cuatro puentes disulfuro. Son polipéptidos de 6,500-8,500 Da. Todas las estructuras tridimensionales determinadas a la fecha muestran un núcleo estructural común con una topología $\beta\alpha\beta\beta$, con asas o giros altamente variables que conectan a los elementos estructurales secundarios (figura 3) [Mouhat *et al.*, 2004].

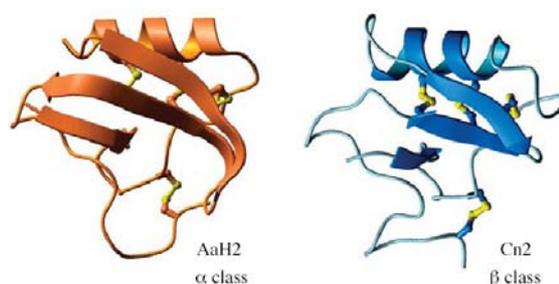


Fig. 3 Estructura tridimensional de toxinas de alacrán de “cadena larga” con el motivo estructural $\beta\alpha\beta\beta$ [Rodríguez De La Vega y Possani, 2005].

Las toxinas de alacranes específicas para canales de sodio son modificadoras de la apertura del canal y se han clasificado en dos grupos, basado en estados de unión: α - y β -toxinas. Las α -toxinas se unen al receptor en el sitio 3 del canal de sodio de una manera dependiente del voltaje e inhiben el proceso de inactivación del mecanismo de apertura y cierre del canal. Las β -toxinas se unen al receptor en el sitio 4 y afectan la activación del mismo mecanismo [Catterall *et al.*, 2007].

Adicionalmente, las toxinas se han clasificado de acuerdo a su estructura y función en los diversos grupos mostrados en la figura 4. Esta clasificación obedece a su secuencia de aminoácidos, a su especificidad (contra mamíferos o contra insectos), así como a sus propiedades de unión y efectos electrofisiológicos. [Possani *et al.*, 1999]. El alineamiento presentado se realizó utilizando como referencia los residuos de cisteínas.

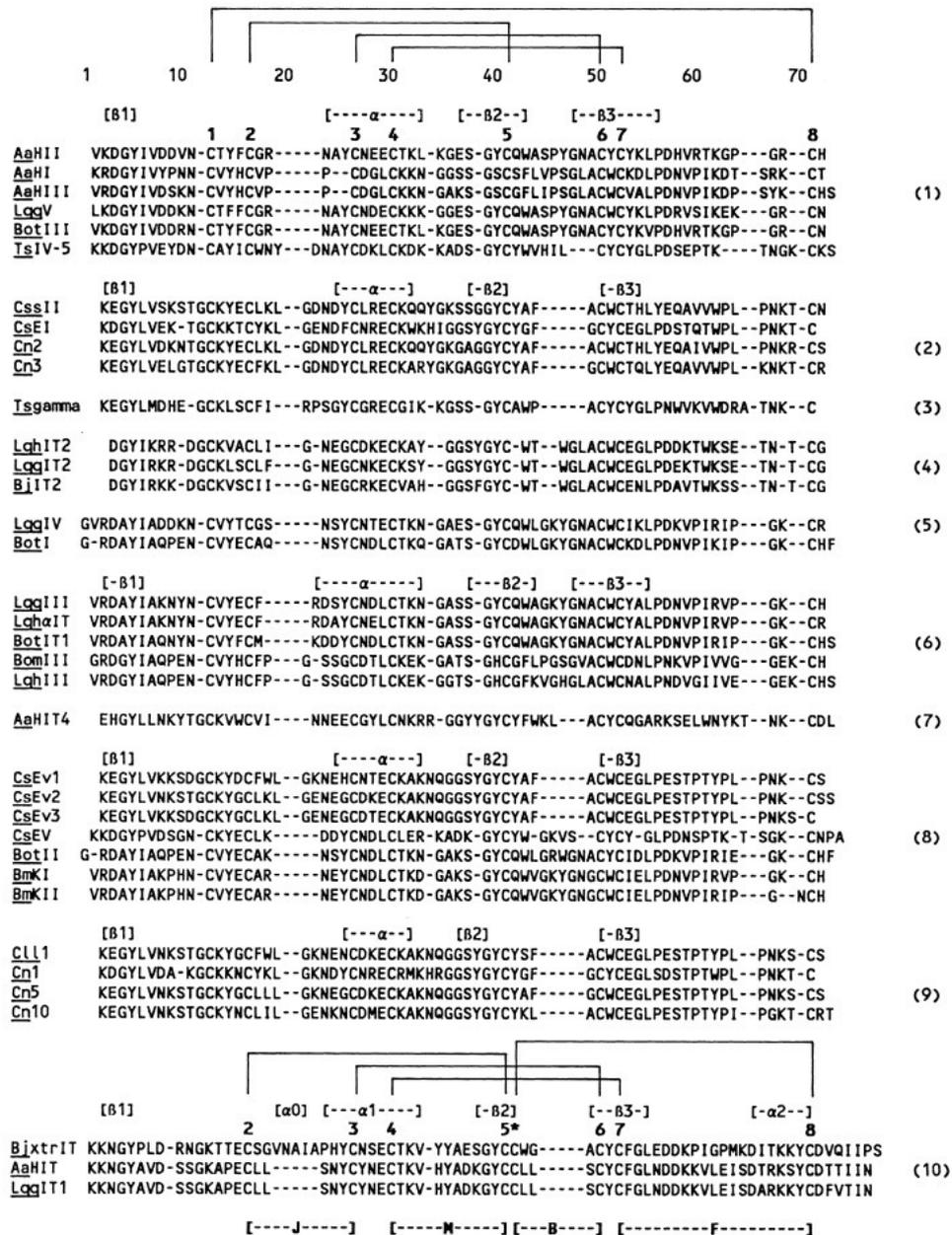


Fig. 4. Grupos funcionales de las toxinas específicas para NaCh [Possani *et al.*, 1999].

2.2 Canal de sodio dependiente de voltaje

Los canales de sodio dependientes de voltaje (NaCh) son responsables de la entrada rápida de iones sodio a la célula que provoca un potencial de acción en nervios, músculos y células endocrinas, lo que es esencial para la generación y propagación de impulsos nerviosos. [Bosmans *et al.*, 2008; Catterall *et al.*, 2007]. Los canales de sodio de cerebro de mamíferos se conforman por una subunidad α de 220-260 kDa que contienen elementos de sensor de voltaje y formadores de poro en un solo complejo de proteína y una o dos subunidades auxiliares β de aproximadamente 33-36 kDa. Las subunidades α están compuestas por cuatro dominios homólogos que contienen cada uno seis segmentos hidrofóbicos transmembranales (figura 5). Un asa, que atraviesa la membrana, entre los segmentos S5 y S6, de cada dominio, constituye el vestíbulo del poro del canal [Yu y Catterall, 2003]. El canal responde a voltaje debido a sus segmentos S4, los cuales contienen motivos repetidos de un residuo de aminoácido positivamente cargado (lisina o arginina) cada tercera posición, siendo éstos los que por señales eléctricas inician un cambio conformacional que abre el poro, lo que produce la despolarización de la membrana necesaria para generar potenciales de acción [Clare *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2004; Yu y Catterall, 2003].

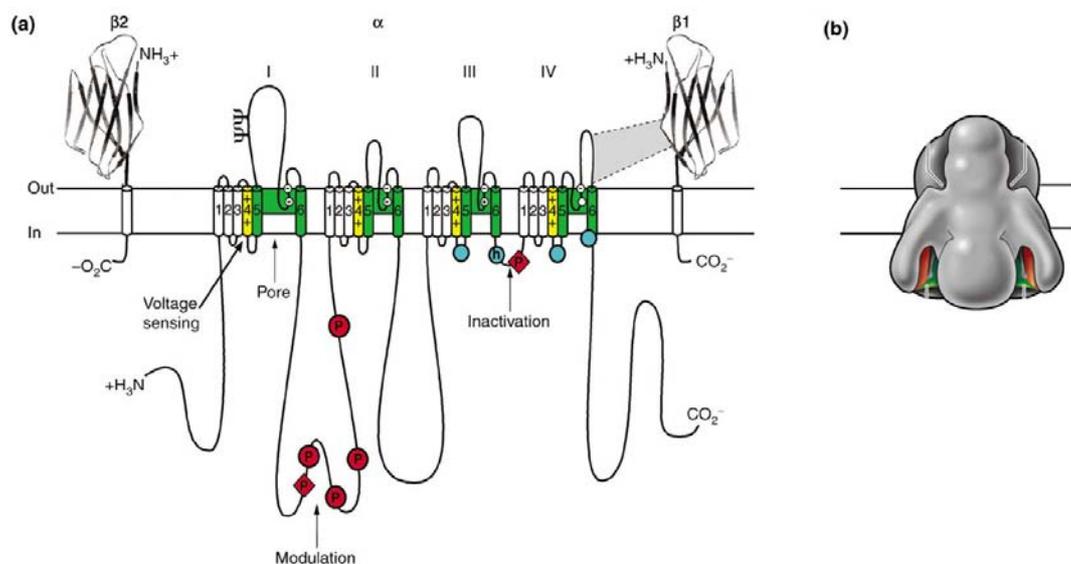


Fig. 5. Canal de sodio dependiente de voltaje. (a) Representación esquemática del canal. (b) Estructura tridimensional de la subunidad α del NaCh a 20 Å de resolución [Clare *et al.*, 2000].

En los humanos, nueve subunidades α de canales de sodio dependientes se han caracterizado: $\text{Na}_v1.1 - \text{Na}_v1.9$. Las subunidades auxiliares del canal de sodio, $\text{Na}_v\beta1 - \text{Na}_v\beta4$, interactúan con las diferentes subunidades α y alteran sus propiedades fisiológicas y su localización subcelular [Wood *et al.*, 2004].

Las funciones del canal de sodio dependiente de voltaje pueden ser divididas en tres aspectos complementarios: conductancia de iones, apertura del poro y regulación. Los canales de sodio son los únicos que representan blancos moleculares para varios grupos de neurotoxinas, que alteran fuertemente el funcionamiento del canal, por unión a diferentes sitios en el receptor [Wood *et al.*, 2004]. Debido a su gran afinidad y especificidad, las neurotoxinas representan herramientas poderosas para estudiar la estructura y función de los canales de sodio, afectando tanto la permeabilidad como las propiedades de apertura del canal. Seis diferentes sitios de unión a neurotoxinas se han identificado en el canal de sodio dependiente de voltaje, los cuales se esquematizan en la figura 6 [Krzemien *et al.*, 2000; Pallaghy *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 2004; Yu y Catterall, 2003].

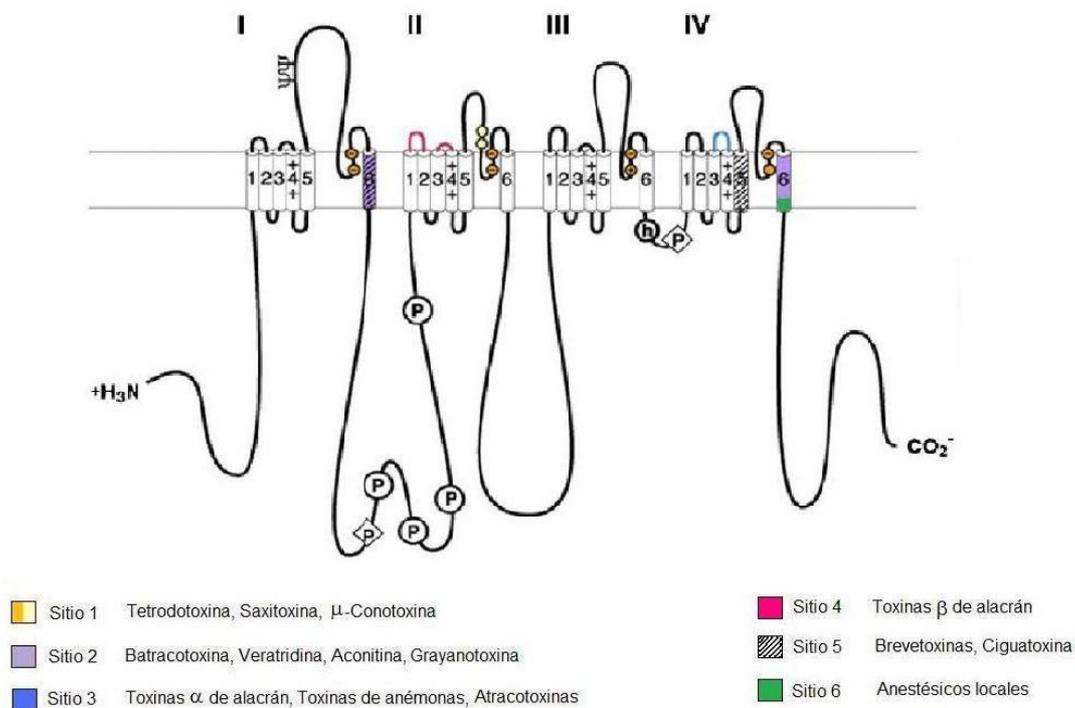


Fig. 6. Sitios farmacológicos de unión en los NaCh [Wood *et al.*, 2004].

El estudio de las toxinas de alacrán que afectan canales de sodio ha recibido una gran atención debido a la importancia médica y al interés en la caracterización de los efectos farmacológicos a nivel molecular. Dado que muchas de estas neurotoxinas se unen a canales de sodio y alteran sus funciones de apertura, éstas se han utilizado para estudiar estos mecanismos, las propiedades estructurales y funcionales del canal, así como la fisiopatología de enfermedades relacionadas a los canales de sodio [Krzemien *et al.*, 2000; Yu y Catterall, 2003].

2.3 Mecanismo de toxicidad de las β -toxinas de alacranes: Trampa del sensor de voltaje

Investigaciones recientes han mostrado que las toxinas que afectan los canales de sodio dependientes de voltaje exponen al menos dos superficies moleculares, de las cuales una es responsable del reconocimiento de su receptor en el canal de sodio (responsable de la mayor afinidad), y la otra afecta la función del receptor (poca afinidad pero responsable del mayor efecto biológico) [Cestèle *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2005]. En la actualidad es ampliamente aceptado que las neurotoxinas polipeptídicas tipo β de alacranes utilizan como mecanismo de acción sobre el canal de sodio la “trampa de sensor de voltaje”, en el cual utilizan a los sensores de voltaje del canal como medio para alterar la apertura del receptor. Este mecanismo se propuso mediante el estudio de la acción de la β -toxina C_{ssIV} del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* en la isoforma del canal de sodio Na_v1.2. Los sensores de voltaje responsables de la activación de los canales de sodio son segmentos transmembranales y por lo tanto son inaccesibles para toxinas hidrofílicas. La alteración de la apertura del canal ocurre porque las toxinas utilizan el asa extracelular que une los segmentos S3 y S4 como sitio de unión, con lo que impiden el movimiento transmembranal del sensor de voltaje que se necesita en el proceso de apertura del canal. Las β -toxinas de alacranes específicamente favorecen la activación de los canales de sodio mediante secuestro del segmento S4 del dominio II en su posición hacia el exterior, como se esquematiza en la figura 7 [Cestèle *et al.*, 1998].

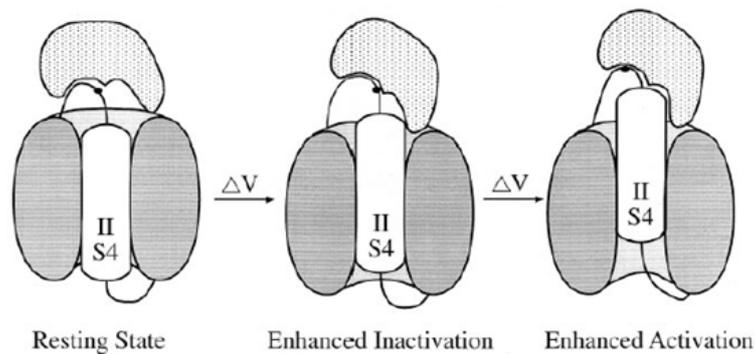


Fig. 7. Modelo de la “trampa del sensor de voltaje” [Cestèle *et al.*, 1998].

La unión de la toxina no solo inmoviliza al sensor de voltaje del dominio II, presumiblemente en el estado activado, sino que causa cambios largos de hiperpolarización en la activación de otros sensores de voltaje. Este comportamiento cooperativo o acoplado, de los sensores de voltaje, es una propiedad fundamental en los canales de sodio dependientes de voltaje y explica como una toxina sitio-específica tiene efectos profundos en el proceso de apertura dependiente de voltaje [Campos *et al.*, 2007].

Varios trabajos han demostrado que las toxinas tipo beta, sean de alacranes o de arañas, contienen aminoácidos aniónicos, entre ellos los residuos glutámicos en las toxinas tipo beta, que son capaces de interactuar con el sensor de voltaje, inmovilizando los segmentos 4 en los canales de sodio dependientes de voltaje. En el modelo propuesto para la acción de la toxina C_{ss}IV, del alacrán *C. s. suffusus*, sobre el canal de sodio Na_v1.2, se describió que en presencia de una β-toxina, el movimiento del sensor de voltaje favorece la interacción del residuo glutámico 15 (E15) con las argininas 850 y 853 en el segmento transmembranal S4 del dominio II del canal, manteniendo al segmento S4 en la posición que favorece al estado “activado” del canal [Cohen *et al.*, 2005].

Adicionalmente, se conoce que en la toxina C_{ss}IV cambios en este residuo por arginina modifica su función, no permitiendo el efecto de activación característico de la toxina sobre el canal [Cohen *et al.*, 2005]. Adicionalmente para otra toxina, B_j-xtrIT (toxina del alacrán *Buthus judaicus* específica para insectos), este mismo cambio conduce a la ausencia de toxicidad en la toxina [Karbat *et al.*, 2004].

Otros residuos involucrados en la toxicidad de las toxinas beta podrían estar situados en el N- y C-terminal de ellas [Campos *et al.*, 2007; Cestèle *et al.*, 1998; Possani *et al.*, 1985].

2.4 Las toxinas como inmunógenos

Estudios previos han demostrado que las toxinas de artrópodos son inmunogénicas y que los anticuerpos generados contra éstas, no solo son capaces de neutralizar a la toxina misma, sino al veneno total de la especie correspondiente. También se han reportado casos de anticuerpos que son generados contra un componente no tóxico, natural o sintético, y que también neutralizan al veneno total de la especie correspondiente. Así, se ha observado que la generación de anticuerpos contra un solo componente de un veneno, puede ser una alternativa eficaz para la producción de antivenenos. Ejemplos de esto se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Toxinas cuyos anticuerpos neutralizaron el veneno total de la especie de la que proceden.

Inmunógeno	Anticuerpos	Recombinante	Veneno soluble	Referencia
Cn2	Ratón	No	<i>C. noxius</i> (alacrán)	[Licea <i>et al.</i> , 1996]
TsNTxP (anatoxina)	Conejo	No	<i>T. serrulatus</i> (alacrán)	[Chávez-Olórtegui <i>et al.</i> , 1997]
TsNTxP (anatoxina)	Conejo	Sí	<i>T. serrulatus</i> (alacrán)	[Guatimosim <i>et al.</i> , 2000]
(Abu)8-AaHII (no tóxica)	Ratón	No	<i>A. australis</i> (alacrán)	[Devaux <i>et al.</i> , 1997]
AaHII	Ratón/Conejo	No	<i>A. australis</i> (alacrán)	[Zenouak <i>et al.</i> , 1997]
Birtoquina, N-terminal	Conejo	No	<i>P. transvaalicus</i> (alacrán)	[Inceoglu <i>et al.</i> , 2006]
AmmVIII (anatoxina)	Conejo	No	<i>A. m. mauretanicus</i> (alacrán)	[Martin-Eauclaire <i>et al.</i> , 2006]
KAaH 1 y 2 (anatoxinas)	Ratón	No	<i>A. australis</i> (alacrán)	[Srairi-Abid <i>et al.</i> , 2008]
Ts1 (TsVII o Tsγ)	Ratón/Conejo	Sí	<i>T. serrulatus</i> (alacrán)	[Mendes <i>et al.</i> , 2008]
Pg8	Ratón	Si	<i>P. granulatus</i> (alacrán)	[García-Gómez <i>et al.</i> , 2009]
SMD-Lb1C	Conejo/Caballo	Sí	<i>L. boneti</i> (araña)	[Olvera <i>et al.</i> , 2006]
Latrotoxina	Ratón	No	<i>L. tredecimguttatus</i> (araña)	[Bugli <i>et al.</i> , 2008]

De esta manera, los primeros estudios inmunoquímicos de toxinas del veneno de alacranes revelaron un principio general: existe reacción cruzada en grupos estructurales de toxinas. Un anticuerpo contra un miembro de un grupo estructural antigénico reconoce y neutraliza las toxinas del mismo grupo mejor que las toxinas de otros grupos [Gazarian *et al.*, 2005]. Esta relación estructura-antigenicidad categoriza la variedad de toxinas en un número pequeño de grupos antigénicos y focaliza el estudio inmunológico en pocos modelos de toxinas representativas de cada grupo: toxinas de alacranes de los géneros *Androctonus* y *Buthus* (especies del norte de África), toxinas de alacranes del género *Centruroides* (especies de Norteamérica) y toxinas de especies del género *Tityus* (especies de Sudamérica). La reactividad cruzada para toxinas de alacrán se ha demostrado para diversas especies de alacranes; los estudios realizados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Reactividad cruzada presentada entre diversas toxinas y venenos de alacranes.

Año	Especie	Ref.
1983	Dos toxinas de la especie <i>Androctonus australis</i> Hector (toxinas II y III) y la toxina I de <i>Buthus occitanus tunetanus</i> presentan reactividad cruzada por radioinmunoensayos.	[El Ayeb <i>et al.</i> , 1983]
1989	El veneno de <i>Heterometrus swammerdami</i> presenta reactividad cruzada contra un antiveneno producido contra la especie <i>H. bengalensis</i> .	[Das Gupta <i>et al.</i> , 1989]
1992	Anticuerpos producidos contra toxinas del alacrán <i>Centruroides noxius</i> presentan reactividad cruzada contra otros venenos del género <i>Centruroides</i> .	[Zamudio <i>et al.</i> , 1992]
1994	Existe reactividad cruzada antigénica entre venenos de las especies de alacranes brasileños <i>Tityus bahiensis</i> , <i>T. stigmurus</i> y <i>T. serrulatus</i> .	[Nishikawa <i>et al.</i> , 1994]
1997	Los antivenenos producidos para las especies <i>Buthus occitanus</i> y <i>Androctonus australis</i> Hector presentan reactividad cruzada contra los venenos de ambas especies.	[Kharrat <i>et al.</i> , 1997]
2002	Los anticuerpos producidos contra una proteína no tóxica de <i>T. serrulatus</i> protegen contra los efectos de otras toxinas de <i>T. serrulatus</i> así como del veneno total.	[Chavez-Olortegui <i>et al.</i> , 2001]
2007	Dieciséis venenos de alacranes de seis géneros de Venezuela y Brasil presentan reactividad cruzada antigénica contra el antiveneno producido contra <i>T. discrepans</i> .	[D'Suze <i>et al.</i> , 2007]
2008	Venenos de diferentes especies venezolanas y brasileñas del género <i>Tityus</i> presentan reactividad cruzada en diferentes grados contra los diferentes antivenenos producidos contra ellas.	[Borges <i>et al.</i> , 2008]
2008	El antiveneno producido contra <i>A. crassicauda</i> , reconoce y neutraliza al veneno de <i>Mesobuthus eupeus</i> .	[Ozkan y Carhan, 2008]
2008	Un antiveneno comercial contra los venenos de <i>C. noxius</i> , <i>C. l. limpidus</i> , <i>C. l. tecomanus</i> y <i>C. s. suffusus</i> reconoce al veneno de <i>C. sculpturatus</i> .	[Chase <i>et al.</i> , 2009]

El desarrollo de la terapia con anticuerpos ha evolucionado rápidamente en los últimos veinte años, especialmente con las inmunoglobulinas como proteínas modulares [Espino-Solís *et al.*, 2009], lo que ha llevado a un mayor número de estudios en los que se pretende evaluar las propiedades inmunológicas de las toxinas. Hasta ahora los resultados esenciales de los estudios inmunológicos para toxinas de alacranes son la identificación, purificación, caracterización estructural y farmacológica de toxinas individuales y de familias de toxinas, obtención de suero y anticuerpos neutralizantes, localización y descripción estructural de los determinantes antigénicos, epítopes relativos a sitios tóxicos, y ensayos de neutralización y capacidad de protección de los anticuerpos generados para las toxinas y para venenos totales [Gazarian *et al.*, 2005].

Un dato importante, es que en el caso de los alacranes, por lo general el episodio de una picadura es único, con algunas excepciones en zonas de alto índice de alacranismo, lo que implica que los antivenenos se utilizan sólo una vez, y esto disminuye la probabilidad de generar reacciones secundarias de hipersensibilidad, que se caracterizan por rash, urticaria, prurito, broncoespasmo, artralgia y choque anafiláctico. Adicionalmente, la producción de F(ab)2 ha disminuido la posibilidad de estas reacciones adversas, aún cuando se necesite una segunda dosis. Sin embargo, actualmente la idea principal es obtener un pequeño cóctel de anticuerpos altamente específicos contra los principales componentes tóxicos de un determinado veneno y demostrar que no causan efectos secundarios [Espino-Solís *et al.*, 2009].

2.5 *Centruroides suffusus suffusus* y la toxina CssII

El alacrán *C. s. suffusus* es una especie distribuida en la zona de Durango y Nayarit, a la que se considera de gran importancia médica y un grave problema de salud en la zona. Es una especie que se puede encontrar debajo de cualquier superficie que le brinde refugio, por lo que es posible encontrarla en asentamientos humanos. Esta especie se considera como una de las más tóxicas en el país y de mayor importancia por los casos de alacranismo de los que es causante [RedTox, 2009].

La toxina CssII se encuentra en mayor proporción, entre las toxinas que afectan mamíferos, en el veneno de *C. suffusus suffusus* (DL₅₀ IP del veneno, 10.3 µg por 20

gramos de ratón; resultados de este trabajo) y es la responsable de los mayores síntomas presentados por el envenenamiento de esta especie [Martin *et al.*, 1987]. La toxina C_{ss}II se une al sitio 4 de los canales de sodio dependientes de voltaje, por lo que se clasifica como una β -toxina [Martin *et al.*, 1987]. La DL₅₀ IP de C_{ss}II es de 0.7 μ g por 20 g de ratón, y es una proteína de cadena sencilla de 66 aminoácidos unidos por 4 puentes disulfuro (estructura $\alpha\beta$ estabilizada por cisteínas), que se encuentra amidada en el carboxilo terminal y con una masa molecular de 7,537.6 Da [Martin *et al.*, 1987]. La toxina C_{ss}II es el centro de este proyecto en donde deseamos expresar heterológamente variantes de ella similares pero sin función biológica para usarlas como inmunógenos, con el fin de obtener anticuerpos que sean capaces de neutralizar a la toxina nativa.

A la fecha, existen dos reportes de la expresión heteróloga de la toxina C_{ss}II, ambos en *E. coli*. Uno de ellos reporta además, un correcto plegamiento *in vitro* de la toxina, lo que lleva a una estructura tridimensional casi idéntica a la de la toxina nativa [Estrada *et al.*, 2007; Estrada-Tapia, 2008; Johnson *et al.*, 2000].

3. HIPÓTESIS

Mutaciones en la superficie responsable de la función biológica de la toxina CssII podrían generar una proteína que reconozca al sitio 4 de los NaCh, pero al mismo tiempo afuncional, la cual podría utilizarse como inmunógeno como una alternativa en la producción de antivenenos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar variantes tóxicas y no tóxicas de la toxina CssII con capacidad inmunogénica y protectora.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Obtener variantes tóxicas y no tóxicas de la toxina CssII mediante expresión heteróloga.
- ✓ Caracterizar las toxinas expresadas para determinar su efecto funcional y estructural.
- ✓ Obtener anticuerpos contra las variantes de la toxina CssII.
- ✓ Determinar que variantes generaron anticuerpos neutralizantes para la toxina nativa CssII.
- ✓ Determinar si los anticuerpos neutralizantes de CssII pueden neutralizar alguna toxina del género *Centruroides*, como por ejemplo Cn2 de *C. noxius*.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1 Reactivos, Enzimas y Paquetes comerciales para biología molecular (“Kits”)

Los reactivos de uso general utilizados en este trabajo fueron adquiridos de las compañías Sigma, Ferment, Merck, Research Organics, Gibco y BioRad. Se utilizó Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, Fermentas). Se utilizaron Adyuvante Completo de Freund (ACF, Rockland) y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF, Rockland) para el protocolo de inmunización. En los ensayos de ELISA se utilizó un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (Zymed) y el sustrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS, Roche). En los geles de agarosa para ADN, se utilizó el marcador de peso molecular “GeneRuler™ DNA Ladder Mix” (Fermentas). El marcador de peso molecular “Prestained Protein Marker Broad Range (7-175 kDa)” (New England Biolabs) se utilizó en los geles de poliacrilamida para proteínas.

Las enzimas de restricción utilizadas fueron adquiridas de New England Biolabs y Fermentas. La Taq polimerasa fue adquirida de Fermentas, la T4 DNA Ligasa de Invitrogen y el Factor Xa (FXa) de New England Biolabs.

Para la purificación de fragmentos de ADN obtenidos por digestión enzimática o por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), separados por electroforesis de geles de agarosa, se utilizó el “kit” QIAquick Gel Extraction de Quiagen y para la purificación de plásmidos se utilizó el “kit” High Pure Plasmid Isolation de Roche.

5.2 Cepas, Vectores y Oligonucleótidos

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron:

-Escherichia coli [Genotipos E.coli, 2009]

- BL21(DE3): F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
- DH5 α : F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ^-
- XL1-Blue: endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)

Se utilizaron los vectores de clonación pGEM T-easy de Promega y pQE30 de Qiagen (figura 8).

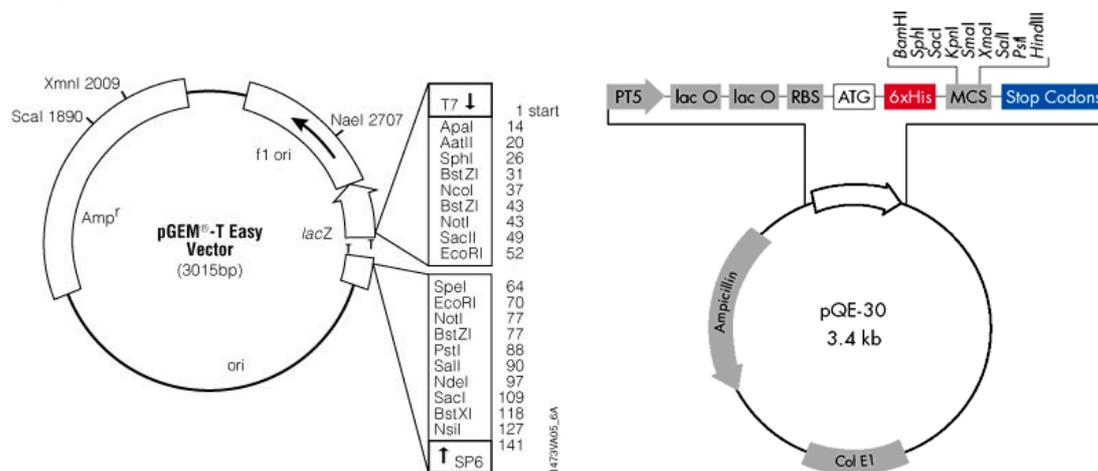


Fig. 8. Vectores utilizados en este trabajo (imágenes tomadas de los manuales de uso de los respectivos vectores).

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM.

5.3 Medios de cultivo y Soluciones

Medios:

- Medio LB (1 L: 10 g NaCl, 10 g Bacto Triptona, 5 g Extracto de Levadura, pH 7.0)
- Medio LB/Ampicilina (Medio LB, 200 µg/mL Ampicilina)
- Agar LB (1 L: Medio LB, 15 g Bacto Agar, pH 7.0; cajas preparadas con 25 mL)
- Agar LB/Ampicilina (Agar LB, 200 µg/mL Ampicilina; cajas preparadas con 25 mL)

Soluciones:

- “Buffer” Fosfato Salino, PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4)
- “Buffer” Tris-Borato-Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), TBE (89 mM Tris, 89 mM Ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3)
- “Buffer” de carga 6x (0.25 % Azul de bromofenol, 0.25 % Xylencianol, 30 % Glicerol)

- Lisis alcalina
 - “Buffer” Tris-EDTA, TE 50:20 (50 mM Tris, 20 mM EDTA)
 - Solución I (50 mM Dextrosa, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8)
 - Solución II (Preparada en el momento, 1 % Dodecil sulfato de sodio, SDS, 0.2 N NaOH)
 - Solución III (Fría, 60 % 5 M Acetato de potasio, 40 % Ácido acético glacial)
- Soluciones para Geles de Poliacrilamida
 - Solución de poliacrilamida (30 % Acrilamida, 2.7 % Bis-acrilamida)
 - “Buffer” concentrador (0.5 M Tris-Cl, pH 6.8)
 - “Buffer” separador (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8)
 - Detergente (10 % SDS)
 - Iniciador (N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina, TEMED)
 - Catalizador (10 % Persulfato de amonio, PSA)
 - “Buffer” de tanque (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glicina, 0.1 % SDS)
 - “Buffer” de tratamiento (0.125 M Tris pH 8, 4 % SDS, 20 % Glicerol, 10 % 2-mercaptoetanol, 0.05 % Azul de bromofenol)
 - Solución de teñido (40 % Metanol, 7 % Ácido acético, 0.25 % Azul de coomasie)
 - Solución desteñidora (10 % Etanol, 10 % Ácido acético glacial)
- Soluciones para ELISA
 - PBST (PBS, Tween 0.1 %)
 - “Buffer” de carbonato (50 mM Na₂CO₃ pH 9.4)
 - Solución de bloqueo (PBS, 0.5 % Gelatina)
 - Solución del sustrato (0.75 % ABTS, 10 % “Buffer” para ABTS)
 - Solución de paro (20 % SDS)
- Electrofisiología
 - Solución intracelular –de pipeta– (10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Ácido 4-(2hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico, HEPES, 130 mM Aspartato de potasio, 10 mM Ácido etilenglicoltetraacético, EGTA, pH 7.3)
 - Solución extracelular (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM Glucosa)

- Ensayos de unión
 - Solución del medio (130 mM Cloruro de colina, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM Glucosa, 50 mM HEPES, 2 mg/mL Albúmina Bovina Serina, BSA, pH 6.5)
 - Solución de lavado (163 mM Cloruro de colina, 0.8 mM MgSO₄, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, 4 mg/mL BSA, pH 7.4)

5.4 Animales

Para los ensayos de toxicidad y de neutralización, se utilizaron ratones de la cepa CD1 de 18-20 g de peso. Para la obtención de sinaptosomas, se utilizaron ratas albinas adultas de la cepa Wistar. Para el protocolo de inmunización se utilizaron conejos hembras de la cepa Nueva Zelanda Blanco de 2 -2.5 Kg de peso.

Todos fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Los alacranes *C. s. suffusus* fueron colectados en la región de Mimbres en el estado de Durango, México (permiso SEMARNAT, oficio SGPA/DGVS-02483, del 18 de marzo del 2005).

5.5 Equipos y Métodos Generales

Para las reacciones de PCR se utilizó el termociclador GeneAmp 2400 Thermal Cycler PCR de Perkin Elmer. La determinación de las secuencias de ADN se hizo mediante el Applied Biosystems Modelo 3730 de Perkin Elmer. Los equipos para corridas de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) de fase reversa fueron un Waters 600E con un detector Waters 486 y un Agilent 1100 series modelo G13124 con un detector G1315A. Para las corridas de HPLC de intercambio iónico se utilizó el equipo Waters 600 Controler con un Detector Waters 2487 Dual λ Absorbance. Los espectros de masas se obtuvieron con un espectrometro Finnigan LCQ DUO ion trap mass. Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro marca JASCO J-725.

Las manipulaciones de ADN se realizaron de acuerdo a las recomendaciones generales descritas con anterioridad [Maniatis *et al.*, 1989].

La preparación de células quimiocompetentes se realizó en condiciones de esterilidad de la siguiente manera: Se inocularon 50 mL de medio LB con 500 µL de un precultivo de células (de toda la noche), se incubó hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm (OD₅₅₀) de 0.45-0.55. Se transfirió el cultivo a tubos de centrifuga de 25 mL. Se mantuvieron en hielo por 10 min y posteriormente se sedimentaron las células mediante centrifugación a 4000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular de ambos tubos en 25 mL totales de CaCl₂ estéril. Se mantuvieron las células en hielo por 90 min y se hizo una nueva centrifugación a 4000 rpm. El sedimentado se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ estéril y se agregó 1 mL de 50 % de glicerol estéril. Se hicieron alícuotas de 100 µL y se almacenaron a -70 °C

Las toxinas con las que se trabajó a lo largo del proyecto, se presentan enlistadas en la Tabla 3, cada una con su secuencia aminoacídica. Es importante notar que todas las toxinas recombinantes se obtuvieron unidas a una cola de histidinas para facilitar la purificación de éstas mediante cromatografía de afinidad. Mediante un corte proteolítico, se liberan esos aminoácidos, dejando a la toxina con la secuencia final indicada. Una toxina recombinante (C_{ss}II) se trabajó también sin cortar (His-rC_{ss}II); ésta sirvió como antígeno control para observar si la cola de histidinas tiene un efecto en la generación de anticuerpos.

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de las toxinas trabajadas en el presente proyecto.

Péptido	Secuencia de aminoácidos
Toxina nativa	
nC _{ss} II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGNDYCLRECKQYKGSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN*
Toxinas recombinantes sin cortar	
His-rC _{ss} II	MRGSHHHHGSIEGRKEGYLVSKSTGCKYECLKLGNDYCLRECKQYKGSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN
Toxinas recombinantes cortadas	
rC _{ss} II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGNDYCLRECKQYKGSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN
rE15R	KEGYLVSKSTGCKYRCLKLGNDYCLRECKQYKGSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN

* Amidación en el carboxilo terminal

5.6 Obtención de la toxina C_{ss}II nativa (nC_{ss}II)

La toxina nativa C_{ss}II fue purificada por dos pasos cromatográficos secuenciales: i) El veneno soluble del alacrán *C. s. suffusus* fue separado por HPLC en columna semipreparativa C18 de fase reversa, con gradiente de solución B de 0-60 % en 60 min con un flujo de 2 mL/min. La solución A es agua con ácido trifluoroacético (TFA) 0.12 % y la solución B es acetonitrilo con TFA 0.10 %.

Las diferentes fracciones de interés obtenidas del paso anterior, se separaron por intercambio iónico por HPLC en columna analítica SP-5PW, con gradiente de solución B de 10-50 % en 40 min con un flujo de 1.5 mL/min. La solución A es una solución de ácido acético 1M, pH 2.9 y la solución B es una solución de ácido acético 1M más acetato de amonio 2M, pH 5.9.

5.7 Construcción, clonación, expresión y purificación de las toxinas recombinantes

La clonación y construcción en el vector de expresión pQE30 de Qiagen, del ADN codificante para las toxinas recombinantes C_{ss}II (rC_{ss}II) y E15R (rE15R), así como la expresión, purificación, plegamiento *in vitro*, digestión con Factor Xa y evaluación de las mismas, se llevó a cabo mediante un protocolo establecido en nuestro laboratorio [Estrada *et al.*, 2007; Estrada-Tapia, 2008].

El ADN codificante para la toxina C_{ss}II (figura 9) se obtuvo de un banco de ADN creado previamente en el laboratorio [Estrada *et al.*, 2007].

GGA	TCC	ATC	GAG	GGA	AGG	AAA	GAG	GGC	TAT	CTG	GTA	AGC	AAG	AGC	ACA	GGC	TGC	AAA	TAC	GAA	TGC
G	S	I	E	G	R	K	E	G	Y	L	V	S	K	S	T	G	C	K	Y	E	C
CTT	AAA	TTG	GGA	GAT	AAC	GAT	TAT	TGC	TTA	AGG	GAA	TGC	AAA	CAG	CAG	TAC	GGA	AAA	AGC	AGT	GGC
L	K	L	G	D	N	D	Y	C	L	R	E	C	K	Q	Q	Y	G	K	S	S	G
GGC	TAT	TGC	TAC	GCT	TTT	GCG	TGC	TGG	TGC	ACA	CAC	TTG	TAC	GAA	CAA	GCA	GTG	GTC	TGG	CCC	CTT
G	Y	C	Y	A	F	A	C	W	C	T	H	L	Y	E	Q	A	V	V	W	P	L
CCT	AAT	AAA	ACA	TGC	AAC	<u>TAG</u>	<u>TAA</u>	CTG	CAG												
P	N	K	T	C	N	*	*	L	Q												

Fig. 9. Secuencia nucleotídica codificante para C_{ss}II, con las modificaciones introducidas por PCR para su expresión como proteína recombinante; separada en codones y con el aminoácido para el que codifica en una segunda línea.

Este ADN fue modificado para codones de uso preferencial por *E. coli* [Estrada *et al.*, 2007] y fue amplificado por PCR añadiendo una región para el corte proteolítico por el FXa (en texto itálico y en rojo en la figura 8), sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y PstI (en negritas y en azul en la figura 8), además de dos codones de paro en el extremo 3' del gen (subrayado y en verde en la figura 8) [Estrada *et al.*, 2007; Estrada-Tapia, 2008]. Para esto, se utilizaron los oligonucleótidos CssIIB y CssIIP (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos para clonar el ADNc de CssII e introducir los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI (en rojo) y PstI (en azul) y el Factor Xa (en verde).

Nombre	Oligonucleótido (5'→3')	Bases	Tm
CssIIB	GGATCCATCGAGGGAAGG AAAGAGGGCTATCTGGTAA	37	56 °C
CssIIP	CTGCAGTTACTAGTTGCATGTTTTATTAGGAAGG	34	49 °C

La toxina HisrCssII es la toxina rCssII, sin el corte proteolítico por el FXa.

La variante rE15R se obtuvo utilizando la técnica del megaprimer para mutagénesis sitio-dirigida [Ke y Madison, 1997]. El templado para la PCR fue la construcción de rCssII en el vector pQE30 y se utilizaron los oligonucleótidos CssIIB, E15R y CssIIP (tabla 5). La reacción de PCR se llevó a cabo con las condiciones mostradas en la tabla 6.

Tabla 5. Oligonucleótidos para generar la variante E15R.

Variante	Nombre	Oligonucleótido (5'→3')	Bases	Tm
rE15R	CssIIB	GGATCCATCGAGGGAAGGAAAGAGGGCTATCTGGTAA	37	56 °C
	E15R	CAATTTAAGGCAGCGGTATTTGCAGCC	27	48 °C
	CssIIP	CTGCAGTTACTAGTTGCATGTTTTATTAGGAAGG	34	49 °C

Tabla 6. Condiciones de PCR utilizadas para amplificar el ADN codificante para las diferentes variantes.

Ciclos	Proceso	Tiempo	Temperatura*
1	Desnaturalización	5 min	94 °C
	Desnaturalización	1 minuto	94 °C
30	Hibridación	40 segundos	55 °C
	Amplificación	40 segundos	72 °C
1	Amplificación	5 min	72 °C

* La temperatura depende de la Tm de los oligonucleótidos utilizados.

La comparación de las secuencias de la toxina CssII y la variante E15R se observa en la figura 10, con su correspondiente predicción de estructuras secundarias, hecha por el servidor PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

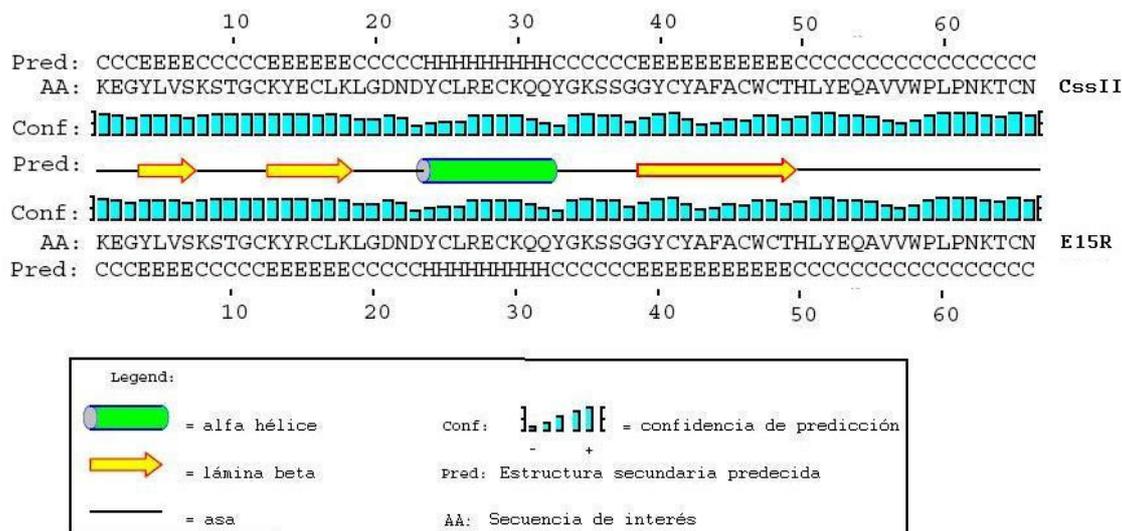


Fig. 10. Predicción de estructura secundaria para CssII y E15R.

Una vez terminadas y comprobadas las respectivas reacciones de PCR por gel de agarosa para ADN (1 % de agarosa en “buffer” TBE), se procedió a correr un gel preparativo de la misma reacción y posteriormente a purificar el ADN a partir de banda de gel de agarosa, utilizando el “kit” QIAquick® Gel Extraction de Qiagen, de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Este ADN purificado fue ligado en el vector de clonación pGEM, siguiendo las indicaciones del proveedor para una ligación rápida, que consiste en una reacción de 1 μ L del vector, 3 μ L del inserto, 1 μ L de la T4 DNA Ligasa y 5 μ L del “buffer” para la enzima por 1 h a temperatura ambiente. Con 5 μ L de la reacción de ligación se transformaron químicamente 100 μ L de células quimiocompetentes *E. coli* XL1 Blue descongeladas en hielo, preparadas de acuerdo al protocolo, con un proceso de 10 min en hielo, 2 min a 42 °C y 5 min en hielo, con posterior recuperación de las células en 1 mL de medio LB a 37 °C con agitación. Posterior a esa recuperación, se plaquearon las células en cajas con agar LB/amplicilina, preparadas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido (X-gal) e IPTG. Se dejaron toda la noche a 37 °C.

Las clonas positivas se seleccionaron mediante el sistema de la β -galactosidasa, es decir, mediante un sistema colorido en la que se observan dos tipos de colonias: blancas y azules, seleccionadas por resistencia a ampicilina, ya que ambos tipos de bacterias portan el plásmido. Las colonias azules corresponden a las células transformadas con el vector que lleva el gen de la β -galactosidasa funcional y produce por inducción con IPTG dicha enzima capaz de hidrolizar al X-Gal y generar color azul. Las colonias blancas corresponden a las células transformadas con el vector que lleva un gen de la β -galactosidasa no funcional por inserción de un fragmento de DNA dentro del mismo., posteriormente mediante PCR se confirmó que tuvieran el inserto del tamaño esperado (200-300 pb).

5.7.1 Obtención del ADN plasmídico

Una vez identificadas las clonas positivas, se dejaron cultivos independientes de dichas colonias, en 3 mL de medio LB/ampicilina durante toda la noche a 37 °C con agitación, para obtener el ADN plasmídico mediante Lisis Alcalina. Las células fueron recuperadas del medio mediante centrifugación a 14,000 rpm durante un minuto, resuspendiendo después el botón celular en 500 μ L de “buffer” TE 50:20. Se centrifugaron nuevamente las células en las mismas condiciones y se resuspendieron en 500 μ L de la Solución I. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de la Solución II preparada en el momento, mezclando por inversión e incubando en hielo por 5 min, pasados los cuales, se adicionaron 200 μ L de la Solución III fría. Nuevamente se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 min. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min y posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, adicionando 800 μ L de etanol al 100 % para la precipitación del ADN plasmídico. Se mezcló por inversión y después de una incubación de 2 min a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó en las mismas condiciones anteriores (10 min a 14,000 rpm). El precipitado fue lavado dos veces con 500 μ L de etanol al 70 %, secando posteriormente a 37 °C. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 60 μ L de agua tetradestilada estéril, se añadió 1 μ L de ARNasa 4 mg/mL y se dejó 30 min a 37 °C, congelando después a -20 °C para su almacenamiento.

Para la obtención de muestras de plásmido más puras, se utilizó el “kit” High Pure Plasmid Isolation de Roche, de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

5.7.2 Secuenciación del ADN

Las muestras para secuenciación de ADN se prepararon con 3-5 μL de ADN plasmídico, 1 μL del oligonucleótido correspondiente y completando a un volumen final de 16 μL con agua tetradestilada estéril. El análisis de la secuencia ocurre por secuenciación automatizada del ADN mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Esta secuenciación se basa en el método de Sanger y una polimerasa termoestable que utiliza terminadores fluorescentes que permiten una secuenciación de tipo cíclico mediante un simple proceso de PCR.

El análisis de las secuencias se hizo utilizando el programa 4Peaks® para Mac y Chromas® para Windows y la versión del programa BLAST que se encuentra en la dirección electrónica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

5.7.3 Obtención de la secuencia codificante de interés y construcción en el vector de expresión pQE30

De la construcción en el vector pGEM, se obtuvo el ADN codificante mediante digestión con las enzimas de restricción BamHI y PstI. Posteriormente el ADN se purificó a partir de una banda de gel de agarosa mediante el “kit” QIAquick® Gel Extraction de Qiagen.

Este ADN purificado se subclonó en el vector de expresión pQE30 previamente digerido con las enzimas BamHI y PstI, mediante una ligación llevada a cabo siguiendo las recomendaciones del proveedor en una reacción de 16 h a 16 °C. Este vector tiene un promotor fuerte (PT5), el cual es inducido por IPTG y permite obtener la proteína fusionada a seis histidinas, lo que facilitó su posterior purificación.

Con 5 μL de la reacción de ligación, se transformaron químicamente 100 μL de células *E. coli* DH5 α descongeladas en hielo, preparadas de acuerdo al protocolo, con un proceso de 10 min en hielo, 2 min a 42 °C y 5 min en hielo, con posterior recuperación de las células en medio LB a 37 °C con agitación. Posterior a esa recuperación, se plaquearon

las células en cajas con agar LB/ampicilina. De las clonas que crecieron, se seleccionaron mediante PCR aquellas que tuvieran un inserto del tamaño esperado (200-300 pb).

El ADN plasmídico de las colonias positivas fue recuperado mediante las condiciones experimentales anteriormente mencionadas.

Las reacciones para secuenciación se prepararon de la misma manera y los programas para análisis de secuencia fueron los mismos.

5.7.4 Expresión de las proteínas

Posterior a la confirmación de la secuencia esperada del ADN plasmídico recuperado, se transformaron químicamente 3 μ L del mismo en 100 μ L de células *E. coli* BL21, preparadas de acuerdo al protocolo, mediante choque térmico: incubación 10 min en hielo, 2 min a 42 °C y 5 min en hielo. La recuperación se llevó a cabo en 1 mL de medio LB por 1 h a 37 °C con agitación, las células se plaquearon en cajas con agar LB/ampicilina. La cantidad sembrada fue de 100 μ L. Las cajas se dejaron toda la noche a 37 °C.

De las colonias que crecieron, se seleccionó una para preinocular en 5 mL de medio LB/ampicilina, dejando toda la noche a 37 °C con agitación. A partir de ese preinóculo, se inocularon 500 mL de medio LB/ampicilina y el cultivo se dejó a 37 °C con agitación para el crecimiento de las bacterias, hasta alcanzar una OD₅₅₀ de 0.4-0.6. En ese momento, se añadió IPTG al medio para una concentración final de 1 mM. Se dejó el cultivo con agitación, pero disminuyendo la temperatura a 30 °C, por un lapso de 6-8 h.

5.7.5 Recuperación de las proteínas

Los cultivos fueron centrifugados a una velocidad de 6,000 rpm durante 20 min, dividiéndolos en botellas de centrífuga de 250 mL. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 mL de “buffer” Tris 50 mM pH 8 centrifugando posteriormente en las mismas condiciones. Nuevamente se desechó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 5 mL del mismo “buffer”. Se pasó el volumen total de un mismo cultivo a un tubo limpio, completando el volumen a 8 mL. Se rompieron las células en la prensa de French a 900 psi para la celda de 4 mL (presión interna de 1,800 psi). Se

observó que nuestra proteína se expresaba de forma insoluble, es decir, en cuerpos de inclusión, por lo que se procedió a hacer un lavado de éstos. El líquido colectado de la prensa se centrifugó por 10 min a 6,500 rpm desechando posteriormente el sobrenadante y resuspendiendo el sedimentado en 40 mL de “buffer”, para volver a centrifugar en las mismas condiciones. Se repitió este paso de lavado una vez más.

El sobrenadante fue desechado y en el poco volumen que quedó, se resuspendió el sedimentado, agregando después “buffer” Tris 50 mM pH 8, 6 M de cloruro de guanidina hasta 12.5 mL para disolver los cuerpos de inclusión y extraer la proteína. Después de unos minutos, se centrifuga a 6,000 rpm por 30 min. El extracto (sobrenadante) es lo que se utiliza para la purificación por afinidad.

5.7.6 Purificación por afinidad

El sobrenadante obtenido se acopló a una resina de Ni-NTA (de Qiagen), previamente equilibrada con “buffer” Tris 50 mM pH 8, 6M cloruro de guanidina. El acoplamiento se llevó a cabo con agitación suave constante por espacio de 12 h a 4 °C. Posteriormente, la resina acoplada con la proteína de interés se lavó 3-4 veces con 12 mL del mismo “buffer” centrifugando por 2 min a 5000 rpm.

Una vez lavada la resina, se empacó en una columna adecuada al volumen, se hicieron lavados con una solución de Tris 50 mM pH 8, 6M cloruro de guanidina y 20 mM de Imidazol y se procedió a eluir con “buffer” Tris 50 mM pH 8, 6M cloruro de guanidina con 400 mM de Imidazol. Para cada proteína se colectaron 5-6 fracciones de 1 mL.

5.7.7 Plegamiento *in vitro*

Las toxinas fusionadas a 6His se redujeron con 1,4-Ditiotreitol (DTT) en las siguientes condiciones: “Buffer” Tris 50 mM pH 8, 6M cloruro de guanidina en presencia de 0.05 g de DTT por cada 12.5 mg de proteína recombinante con un tiempo de incubación de 30 min. Posteriormente la proteína recombinante reducida se separó mediante rpHPLC con el fin de eliminar sales y DTT oxidado/reducido. Se realizó un posterior paso de plegamiento *in vitro*, en una reacción a 4 °C durante 24 h en “buffer” Tris 0.2 M con 2 M de cloruro de guanidina pH 8 y con GSH:GSSG en una relación 1 mM:0.1mM.

5.7.8 Purificación por rpHPLC

Las proteínas previamente plegadas *in vitro* se purificaron por HPLC de fase reversa utilizando como solventes TFA 1 % en agua (A) y TFA 1 % en acetonitrilo (B), con un gradiente de B de 20 a 60 % en 40 min (1 % por minuto), con un flujo de salida de 1 mL por minuto. Para cada corrida en el HPLC, se inyectó 1 mL de muestra, utilizando para la separación una columna C18.

5.7.9 Proteólisis con Factor Xa

La proteólisis se llevó a cabo utilizando FXa, que tiene como sustrato específico la secuencia Ile-Glu/Asp-Gly-Arg, llevando a cabo la reacción de la siguiente manera: La proteína de fusión a 6 His se resuspendió en 100 μ L de Tris 20 mM pH 8, agregando después 20 μ L (20 unidades) del Factor Xa, llegando a una relación molar aproximada de 60:1. La reacción se dejó a temperatura ambiente por 16 h.

5.7.10 Repurificación por HPLC de intercambio iónico

El producto de la reacción de proteólisis con FXa se sometió a una repurificación por HPLC de intercambio iónico, utilizando como solventes ácido acético 1 M (A) y acetato de amonio 2 M con ácido acético 1 M (B), con un gradiente de B de 10 a 50 en 40 min (1 % por minuto) con un flujo de salida de 1.5 mL por minuto. Se utilizó una columna catiónica, inyectando 500 μ L por corrida.

5.7.11 Electroforesis de proteínas

Para evaluar y confirmar la presencia de proteínas en las diferentes etapas del proceso de expresión y purificación, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. El gel separador se preparó al 15 % y fue precedido por un gel concentrador al 4 %. Las muestras, previa aplicación en el gel, fueron tratadas con “buffer” de tratamiento a ebullición durante 5 min.

El gel se corrió a 30 mA y posteriormente fue tratado con la solución de tinte. Para quitar el exceso de colorante, el gel fue sometido a lavados en una solución desteñidora.

5.7.12 Espectrometría de masas

Las masas moleculares de los péptidos obtenidos fueron determinadas por el Dr. Fernando Zamudio mediante la técnica de MALDI-TOF o ESI-ION-TRAP.

5.8 Caracterización de las toxinas

Para evaluar las propiedades de las toxinas recombinantes en comparación con la toxina nativa se llevaron a cabo tres ensayos con las toxinas purificadas: determinación de la toxicidad, ensayos de dicroísmo circular y ensayos de unión.

5.8.1 Ensayos de toxicidad

Los ensayos de toxicidad, previamente aceptados por el Comité de Bioética del IBt-UNAM, se realizaron vía intracraneal (IC) y vía intraperitoneal (IP) en ratones CD1 machos de 20 g. Para los ensayos vía IC, los ratones, previamente anestesiados con éter dietílico, se inyectaron incerebroventricularmente en la parte media entre el ojo izquierdo y la oreja izquierda. Las toxinas fueron disueltas en una solución de PBS. El volumen final inyectado fue de 5 μ L. Los ratones fueron inyectados con una microjeringa de 10 μ L modificada con un capilar de plástico en la aguja para que solo penetraran 3 mm de la misma. Los efectos de las toxinas recombinantes se observaron durante 2 h posterior a la inyección. Se inyectaron 5 mL de PBS como control negativo y 15 ng, equivalente a 3 dosis letales medias (DL_{50}) de la toxina, vía intracraneal [Martin *et al.*, 1987] de la toxina nativa como control positivo. Para los ensayos vía IP, se inyectaron grupos de 5 ratones CD1 machos de 20 g de peso en promedio, con 2.5 μ g por ratón de toxina nativa como control positivo. Los efectos de las toxinas se observaron hasta 4 h después de la inyección.

5.8.2 Ensayos de electrofisiología

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron en células HEK (siglas en inglés de “Human Embryonic Kidney”), las cuales expresan constitutivamente el canal de sodio $Na_v1.6$ humano, que es el único subtipo de canal de sodio, de los evaluados anteriormente

(Na_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6) para el cual la toxina nativa C_{ss}II es específica [Estrada *et al.*, 2007].

Como control se registró la corriente iónica de las células libres de toxina y después se volvió a registrar la corriente en presencia de 500 nM (concentración no saturante) de toxina. Cada una de las toxinas nC_{ss}II, rC_{ss}II, y rE15R se analizaron por separado. Las toxinas se mezclaron con la solución estándar extracelular inmediatamente antes de realizar el ensayo.

Las corrientes fueron registradas con la técnica de Fijación de Voltaje en Microáreas de Membrana (“Patch Clamp”) en configuración de célula completa, por la Dra. Rita Restano.

5.8.3 Ensayos de dicroísmo circular

Las toxinas purificadas y liofilizadas se resuspendieron en una solución al 60 % de trifluoroetanol para promover los puentes de hidrógeno en las estructuras secundarias [Sonnichsen *et al.*, 1992]. La concentración utilizada de la toxina fue de 250 µg/mL. La absorbancia por dicroísmo circular se realizó en un rango de 260 a 180 nm. La solución amortiguadora se preparó con Tris a una concentración 0.1 M pH 7.1, y las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. La longitud de la celda utilizada fue de 1 mm. Los datos se colectaron a 0.1 nm con velocidad de detección de 50 nm/min y una constante de tiempo de 0.5 seg.

5.8.4 Ensayos de unión

La preparación de sinaptosomas, iodación de las toxinas y ensayos de unión fueron realizados por la Dra. Georgina Estrada, de acuerdo a los protocolos reportados [Estrada *et al.*, 2007; Estrada-Tapia, 2008].

5.8.4.a Preparación de sinaptosomas de cerebro de rata

Los sinaptosomas fueron preparados a partir de cerebros de ratas adultas albinas de la cepa Wistar. Todo el protocolo de separación se realizó a una temperatura de 0 a 4 °C a partir de la extracción del cerebro completo. Primeramente se homogeneizó el cerebro en

una solución de sacarosa 0.32 M, pH 7.4. La solución homogeneizada se centrifugó a 3000 rpm por 5 min recuperando el sobrenadante, éste fue centrifugado a 14000 rpm por 20 min. Se recuperó el precipitado, que contiene los sinaptosomas, y se resuspendió en la misma solución de sacarosa. Se hicieron alícuotas de 50 µL almacenándolas a -70 °C.

5.8.4.b *Marcaje de la toxina nativa C_{ss}II con ¹²⁵I*

La toxina C_{ss}II fue marcada radiactivamente usando yodo 125 (¹²⁵I) por reacción con peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno con 1 nmol de toxina y 1 mCi de Na¹²⁵I. La toxina monoiodada se purificó por HPLC.

5.8.4.c *Ensayos de unión a sinaptosomas*

Los ensayos de unión fueron realizados usando concentraciones crecientes de toxina no marcada en presencia de la toxina marcada a concentración constante. Los sinaptosomas de cerebro de rata fueron resuspendidos en 200 µL de la solución del medio conteniendo la toxina nativa marcada (¹²⁵I-nC_{ss}II). Después de incubar por 1 h a temperatura ambiente la mezcla se resuspendió en 3 mL de solución de lavado fría y filtrada a vacío usando filtros GF/C (Whatman). Los filtros, reteniendo los sinaptosomas, se lavaron rápidamente 2 veces con 3 mL de la misma solución, para posteriormente analizar la cantidad de marca retenida. Cada experimento se realizó al menos tres veces.

5.9 Evaluación inmunológica de nC_{ss}II, rC_{ss}II, HisrC_{ss}II y rE15R

5.9.1 Inmunización de conejos

Se inmunizaron cuatro conejos de la cepa Nueva Zelanda Blanco, de sexo femenino y de 2.5 kg de peso. Los inmunógenos utilizados fueron la toxina nativa (nC_{ss}II), la toxina recombinante (rC_{ss}II), la recombinante de fusión (HisrC_{ss}II) y una variante (E15R), en razón de un inmunógeno por conejo. Se hizo una inmunización primaria de 3 µg de cada toxina utilizando Adyuvante Completo de Freund, seguida de 6 refuerzos en dosis incrementadas de antígeno: 5 µg, 10 µg, 30 µg, 30 µg, 50 µg y 50 µg, utilizando Adyuvante Incompleto de Freund y Alúmina alternativamente.

Las primeras cinco inmunizaciones se realizaron cada 10 días, mientras que la sexta y la séptima se hicieron con un intervalo de 14 días a partir de la anterior. Después de la cuarta inmunización, se tomó de cada conejo una muestra de sangre de 1 mL para medir títulos de anticuerpos en suero.

Antes de la primera inmunización, se tomó 1 mL de sangre de cada conejo como muestra de suero preinmune.

5.9.2 ELISA

Para medir títulos de anticuerpos en suero, se utilizó la técnica de ELISA indirecta. Para esto, en placas de 96 pozos, se colocaron 100 μ L de una solución de 3 μ g/mL de antígeno en “buffer” de carbonato en cada pozo correspondiente. Después de incubación a 37 °C por 2 h, se hicieron lavados de la placa con PBST. Para bloquear la placa, se colocaron en cada pozo 300 μ L de una solución de bloqueo, por toda la noche a 4 °C. Posteriormente se hicieron 3 lavados de la placa con PBST. Se prepararon diluciones seriales de los sueros a analizar y por duplicado se colocaron 100 μ L de cada dilución en el pozo correspondiente, con posterior incubación de 1 h a 37 °C. Se hicieron nuevamente 3 lavados de la placa con PBST. Después se colocaron 100 μ L por pozo del anticuerpo de cabra anticonejo acoplado a la enzima peroxidasa, diluido 1 en 1,000 incubando también 1 h a 37 °C. Posteriormente se hicieron 3 lavados finales con PBST para después agregar 100 μ L por pozo de la solución del sustrato ABTS de la enzima peroxidasa. Se esperaron posteriormente 10 min para el desarrollo de color. Se detuvo la reacción con una solución de paro. Se hizo la lectura de absorbancia en el lector de placas a 405 nm.

5.9.3 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) Intraperitoneal de la toxina nativa C_{ssII}

Para determinar la DL₅₀ de la toxina nC_{ssII}, se inyectaron intraperitonealmente dosis conocidas de toxina disuelta en PBS a grupos de cinco ratones de la cepa CD1. Al final se hizo recuento de animales muertos del total de inyectados. El análisis estadístico, se realizó mediante un análisis de regresión no lineal con pendiente variable en el programa Prism 4 (GraphPad Inc), que proporciona un algoritmo de ajuste de la curva no lineal

(pendiente variable) con los cuatro parámetros de la ecuación logística, en la cual se fijaron los parámetros Supervivencia Máxima y Supervivencia Mínima.

5.9.4 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) Intraperitoneal del veneno total de *Centruroides suffusus suffusus*

Para determinar la DL₅₀ del veneno de *C. s. suffusus*, se inyectaron intraperitonealmente dosis conocidas de veneno disuelto en PBS a grupos de tres ratones de la cepa CD1. Al final se hizo recuento de animales muertos del total de inyectados. El análisis estadístico, se realizó mediante un análisis de regresión no lineal con pendiente variable en el programa Prism 4 (GraphPad Inc), que proporciona un algoritmo de ajuste de la curva no lineal (pendiente variable) con los cuatro parámetros de la ecuación logística, en la cual se fijaron los parámetros Supervivencia Máxima y Supervivencia Mínima.

5.9.5 Ensayos de neutralización

5.9.5.a Con la toxina nC_{ssII}

Se administraron 200 µL de cada suero a evaluar con 3DL₅₀ de la toxina (intraperitonealmente), previamente incubados a 37 °C por 1 h, en ratones CD1 y se observaron los tiempos de vida y síntomas presentados en cada ratón. Como control positivo se utilizó suero preinmune con 3DL₅₀ de nC_{ssII}, también incubado a 37 °C por 1 h y como control negativo, suero preinmune incubado en las mismas condiciones.

5.9.5.b Con la toxina nC_{n2}

Se administraron 200 µL de cada suero a evaluar con 3DL₅₀ de C_{n2}, la toxina más letal y abundante del veneno del alacrán *C. noxius*, previamente incubados a 37 °C por 1 h, en grupos de 6 ratones CD1 y se observaron los tiempos de vida y síntomas presentados en cada ratón. Como control positivo se utilizó suero preinmune con 3DL₅₀ de C_{n2}, también incubado a 37 °C por 1 h y como control negativo, suero preinmune incubado en las mismas condiciones.

5.9.6 Determinación de la Dosis Efectiva 50 (DE₅₀) de los sueros inmunes de conejo

Para la determinación de las DE₅₀ de los sueros inmunes de conejo, se administraron 3DL₅₀ de veneno total de *C. s. suffusus* en conjunto con dosis crecientes de cada suero, previamente incubados a 37 °C por 1 h, en grupos de 5 ratones de la cepa CD1. Posteriormente a la administración, se hizo recuento de sobrevivientes. El análisis de datos se realizó con el programa Prism 4 (GraphPad, Inc.) que proporciona un algoritmo de ajuste de la curva no lineal (pendiente variable) con los cuatro parámetros de la ecuación logística, en la cual se fijaron los parámetros Supervivencia Máxima y Supervivencia Mínima. La pendiente DE₅₀ y el coeficiente de Hill fueron variables y ajustados durante las interacciones del modelo con base a los datos experimentales. Las pendientes o DE₅₀s fueron comparadas utilizando el “logrank test” en el mismo programa Prism 4 para calcular los valores. El “logrank test” es equivalente al método de Mantel-Haenszel para valores binarios (en nuestro caso supervivencia o no supervivencia). Este método permite calcular los valores P de significancia para la comparación de las DE₅₀s calculadas por cada antígeno utilizado.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de la toxina nativa

La toxina nativa C_{ss}II se obtuvo mediante la separación del veneno soluble del alacrán *C. suffusus suffusus* usando las condiciones mencionadas en la Sección 5.6 y de acuerdo a como se muestra en los cromatogramas en la figura 11. La toxicidad de C_{ss}II a ratones CD-1 y el peso molecular esperado, obtenido por espectrometría de masas, corroboraron la identidad de este péptido.

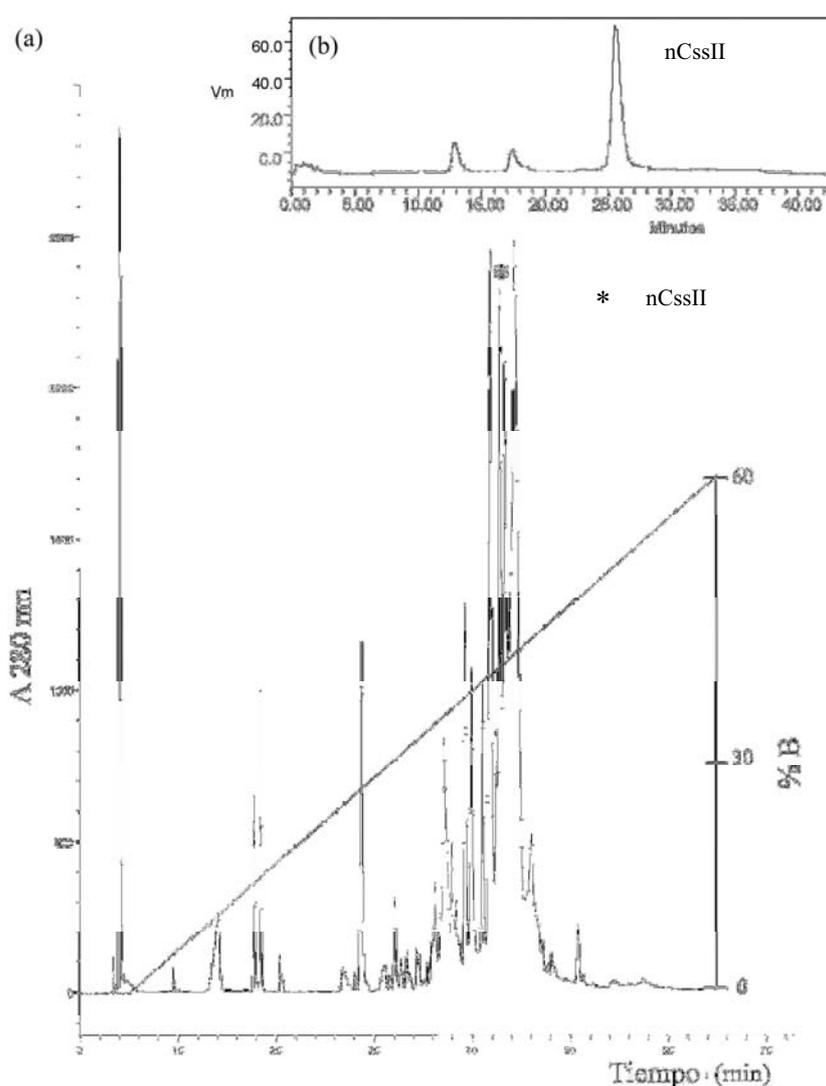


Fig. 11. Purificación de la toxina nativa C_{ss}II. a) Purificación de la toxina C_{ss}II (*) por HPLC de fase reversa (rpHPLC), a partir del veneno de *Centruroides suffusus suffusus*. b) Repurificación de la toxina C_{ss}II por HPLC de intercambio iónico.

6.2 Construcción, clonación, expresión y purificación de las toxinas recombinantes

Las construcciones en los vectores pGEM y su posterior digestión con las enzimas de restricción BamHI y PstI (figura 12), se realizaron correctamente comprobando además que el ADN de interés tuviera la secuencia correcta.

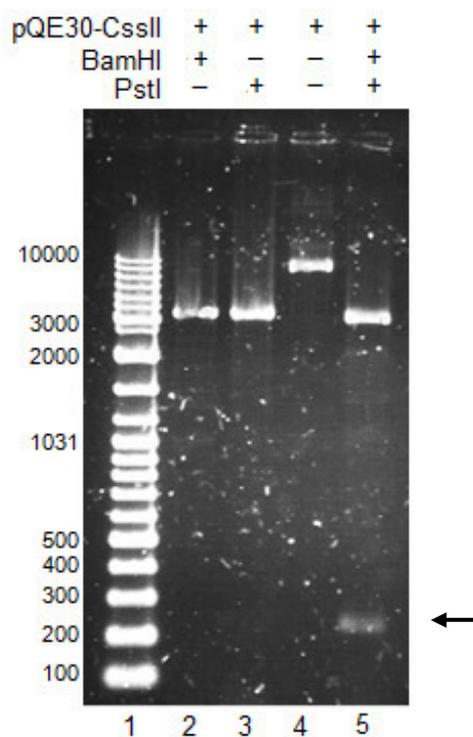


Fig. 12. Gel de agarosa al 1 % de la reacción de digestión de pGEM-CssII. Línea 1, Marcador; Línea 2 y 3, Digestiones simples con BamHI y PstI; Línea 4, pGEM-CssII, Línea 5, Digestión doble con BamHI y PstI.

La posterior subclonación en pQE-30 para las proteínas de interés HisrCssII, rCssII, rE15R, también fue exitosa confirmando la presencia del inserto mediante la técnica de secuenciación. La expresión de las proteínas mediante la construcción en el vector pQE-30 permitió obtener cada toxina fusionada a seis histidinas y con el sitio de corte para el Factor Xa, como se esquematiza en la figura 13.

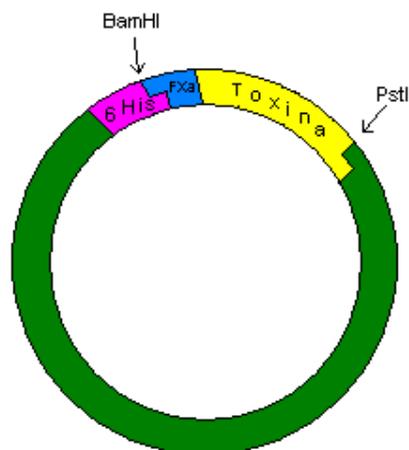


Fig. 13. Representación esquemática de la toxina en pQE-30.

De acuerdo al análisis por electroforesis de proteínas, observamos, primeramente que nuestros péptidos se expresan en pequeñas cantidades en BL21, aún sin agregar el inductor IPTG, un fenómeno que se ha observado con anterioridad; esto probablemente es debido a que el promotor no es fuertemente controlado. También se observa que nuestras proteínas de interés se expresan mayoritariamente en cuerpos de inclusión, es decir, en la fracción insoluble (figura 14).

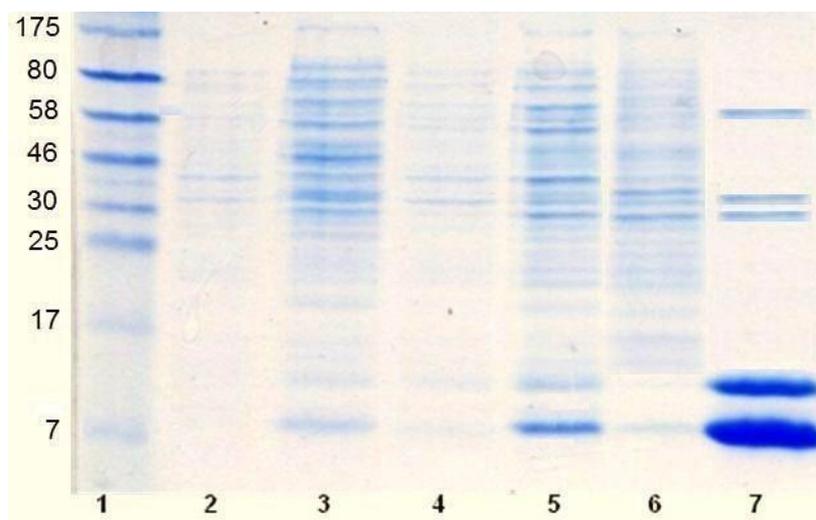


Fig. 14. Gel de poliacrilamida al 15 %. Línea 1, Marcador; Línea 2, Células sin transformar; Línea 3, Preinóculo; Línea 4, Células completas antes de inducir; Línea 5, Células completas 8 hrs. post-inducción; Línea 6, Fracción soluble; Línea 7, Fracción insoluble.

La fusión de la toxina a seis residuos de histidinas, permitió la purificación por afinidad de cada una de las toxinas de interés, mediante una resina de Ni-NTA. Posteriormente fue posible desplazar a la proteína de la resina con un “buffer” de imidazol. Una vez purificadas las toxinas, un paso de plegamiento *in vitro* fue necesario, ya que por evidencias anteriores se sabe que en la expresión de rC_{ss}II se obtienen múltiples isoformas de la toxina, es decir, múltiples estados oxidados de las mismas, con patrones de puentes disulfuro diferentes [Estrada-Tapia, 2008]. Las múltiples isoformas oxidadas de la toxina fueron reducidas mediante DDT y así, posteriormente a un plegamiento *in vitro*, fue posible obtener una sola isoforma de la proteína, lo cual se corrobora por su análisis en rHPLC. La identidad del péptido se corrobora por espectrometría de masas. Un ejemplo se muestra en la figura 15, que indica un cromatograma de HPLC en el que observamos una sola fracción proteica correspondiente a la variante rE15R después del plegamiento *in vitro*.

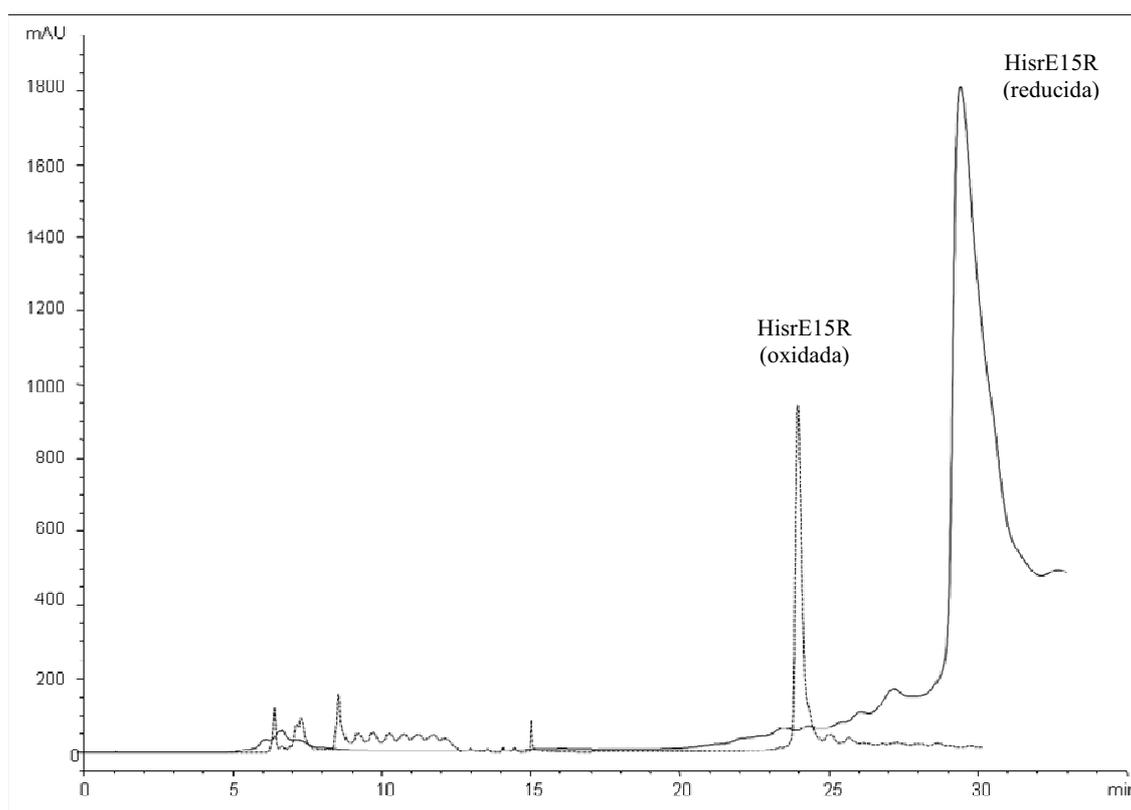


Fig. 15. rE15R correctamente plegada.

Posteriormente al plegamiento *in vitro*, se realizó una digestión proteolítica con el Factor Xa, lo que nos permitió obtener solo los aminoácidos correspondientes a la proteína de interés (proteína madura), ya que el FXa al reconocer el sitio IEGR, hidroliza el enlace peptídico correspondiente al residuo de arginina y libera todos los precedentes (16 aminoácidos en total), convirtiendo HisrCssII en rCssII (Tabla 7). La hidrólisis con FXa es igualmente realizada con todas las variantes diseñadas. Un análisis posterior por HPLC acoplado a intercambio iónico, nos permitió observar una fracción libre de las seis histidinas y otra más que no alcanza a cortarse, correspondiente al sustrato inicial (figura 16).

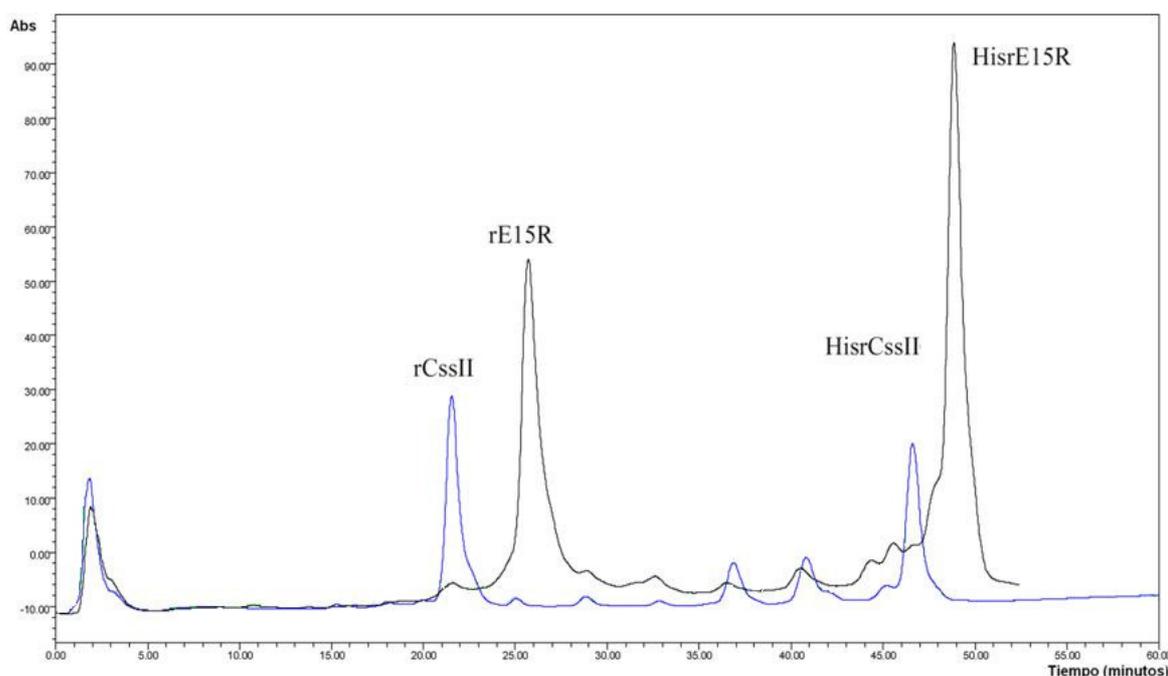


Fig. 16. Gráfica de HPLC acoplado a intercambio iónico después de proteólisis con FXa. (rCssII: toxina CssII cortada con FXa; HisrCssII: toxina CssII resistente al corte; rE15R: variante E15R cortada con FXa; HisrE15R: variante E15R resistente al corte).

En la figura 17 se muestran los espectros de masas correspondientes a la toxina rE15R después de cada uno de los pasos anteriores. La variante fusionada a histidinas después del plegamiento *in vitro* (A) y la variante después del corte proteolítico (B).

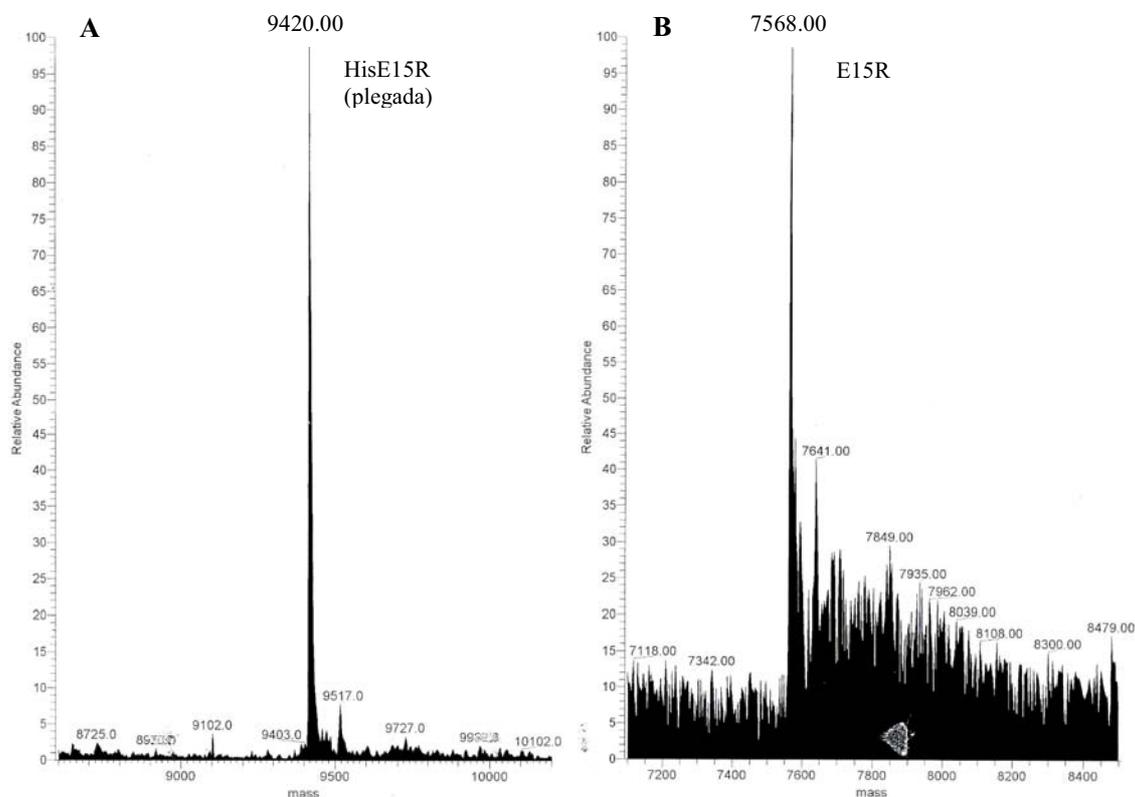


Fig. 17. Espectros de masas de E15R plegada fusionada a histidinas (A) y E15R cortada (B).

Cabe mencionar que la toxina nativa se encuentra amidada en el último aminoácido, es decir, en el carboxilo terminal. Debido a que *E. coli* no lleva a cabo modificaciones post-traduccionales, tales como la amidación de proteínas, la expresión heteróloga en este sistema no nos permite obtener la toxina amidada. Estas diferencias entre las toxinas expresadas y la nativa, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias aminoacídicas de nC_{ss}II, rC_{ss}II sin cortar y rC_{ss}II cortada.

Péptido	Secuencia de aminoácidos
nC _{ss} II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNDCYLRCKQYQYKSSGGYCYAFACWC THLYEQAVVWPLPNKTCN *
HisrC _{ss} II	MRGSHHHHHGSIEGRKEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNDCYLRCKQYQYKSSGGYCYAFACWC THLYEQAVVWPLPNKTCN
rC _{ss} II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNDCYLRCKQYQYKSSGGYCYAFACWC THLYEQAVVWPLPNKTCN

* Amidación en el carboxilo terminal

6.3 Caracterización de las toxinas

6.3.1 Variante no tóxica

Con el fin de obtener variantes no tóxicas, se llevaron a cabo los experimentos biológicos en ratones CD1. Las pruebas biológicas realizadas anteriormente y durante este proyecto revelan que la proteína C_{ss}II recombinante presenta una toxicidad similar y mismos síntomas en ratones CD1, que la toxina nativa, vía IC. En administración IP, esta toxicidad es un poco menor, pero los síntomas presentados son los mismos. La proteína de fusión HisrC_{ss}II también es tóxica, pero en una proporción aproximadamente 5 veces menor a la toxina nativa, tanto vía IC, como vía IP. Estos datos concuerdan con los reportados anteriormente en nuestro grupo de investigación [Estrada *et al.*, 2007]. La variante rE15R no presentó toxicidad en los ratones. Los resultados mostraron que inyecciones de rE15R via intracraneal o intraperitoneal de 1 (equivalente a 200 DL50 IC de la toxina nativa) y 30 µg (equivalente a ~30 DL50 IP de la toxina nativa) en ratones de 20 g, respectivamente no produjeron síntomas tóxicos en los ratones. Estos resultados se observan en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados de los ensayos de toxicidad para las toxinas evaluadas.

Toxina	DL ₁₀₀ Intracraneal (ng)	DL ₁₀₀ Intraperitoneal (µg)
nC _{ss} II	15	3.6
rC _{ss} II	15	6
HisrC _{ss} II	75	15
E15R	>1000	>30

6.3.2 Ensayos de electrofisiología

Para poder determinar la funcionalidad de las toxinas de interés, de acuerdo a su unión a los canales de sodio, se realizaron ensayos de electrofisiología para cada una de las toxinas. Los resultados se observan en la figura 18. Las curvas corriente-voltaje se obtienen normalizando la corriente con la máxima corriente obtenida (20 mV) para graficar el valor de la misma a diferentes potenciales y ajustando a la suma de 2 ecuaciones de Boltzmann.

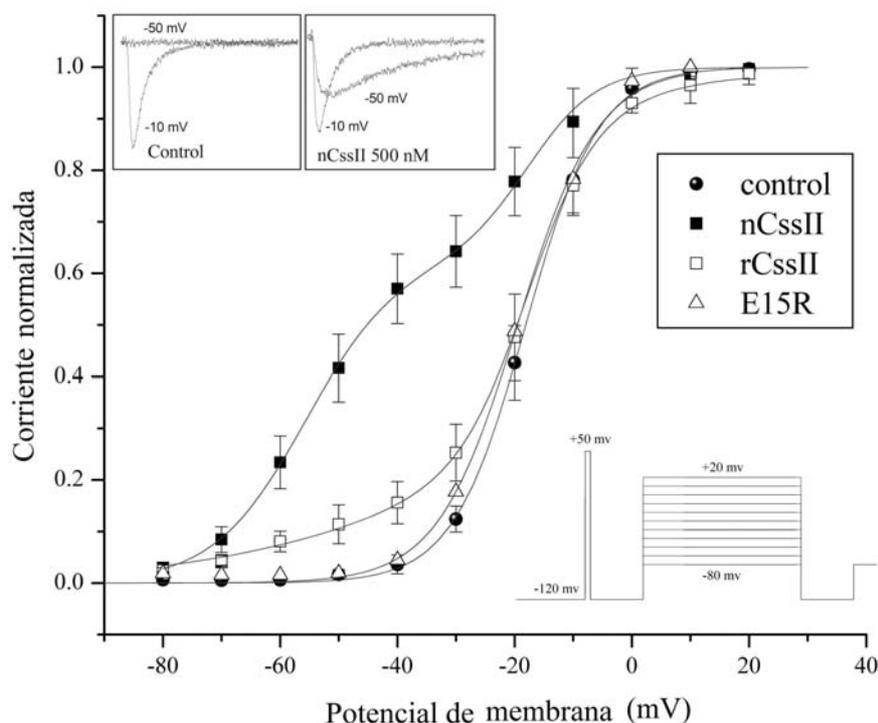


Fig. 18. Curva corriente-voltaje del canal Nav1.6 en presencia y ausencia de 500 nm de cada una de las toxinas recombinantes. En los recuadros se muestran las curvas de corriente de sodio en la célula a voltajes de -50 y -10 mV, en ausencia y presencia de 500 nM de toxina, en función del tiempo.

En estos ensayos, observamos que en ausencia de toxinas (experimento control), los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav1.6) se abren aproximadamente a -40 mV, pero en cambio cuando la toxina nativa C_{ss}II está presente, se observa una apertura de los canales a potenciales más negativos. Cuando se aplicó toxina recombinante rC_{ss}II, el efecto causado es el mismo, pero la magnitud de dicho efecto fue distinta. Con respecto a nuestra variante no tóxica rE15R, se observa que esta no afecta a los canales iónicos Nav1.6 como las toxinas nativa y recombinante C_{ss}II. Este dato está correlacionado con la falta de toxicidad que se muestra al inyectar vía IC hasta 1 μ g (200 DL50) o vía IP hasta 30 μ g (~30 DL50).

6.3.3 Ensayos de dicroísmo circular

Para comparar la estructura secundaria de las toxinas recombinantes con respecto a la toxina nativa, se llevaron a cabo ensayos de dicroísmo circular. Los resultados de este

análisis mostraron resultados similares para las tres recombinantes y la toxina nativa; se observa que todas muestran espectros con un mínimo a 208 y a 222 nm indicativo de estructura secundaria α hélice, siendo estos mínimos característicos de la estructura α/β estabilizada por cisteínas que presentan la mayoría de las toxinas de alacrán. Esto se muestra en la figura 19.

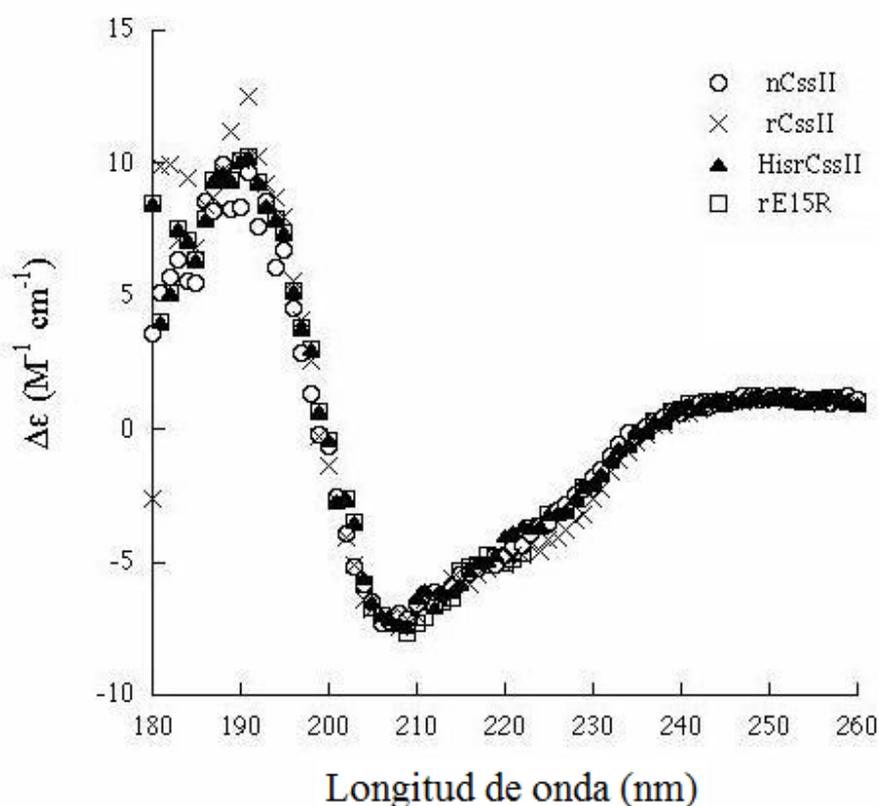


Fig. 19. Espectro por dicroísmo circular para las toxinas nCssII, rCssII, HisrCssII y rE15R.

6.3.4 Ensayos de unión

Como una forma complementaria a los ensayos funcionales de modulación del canal por la toxina nativa y por las variantes recombinantes, se llevaron a cabo ensayos de unión en sinaptosomas de cerebro de rata, para evaluar a las toxinas en función del reconocimiento por el receptor. Se observó que todos los péptidos recombinantes fueron capaces de desplazar a la toxina nativa de sus receptores en el cerebro de rata lo que

implica estas toxinas compiten por los mismos blancos moleculares, que en este caso sería el canal de sodio. Esto se muestra en la figura 20.

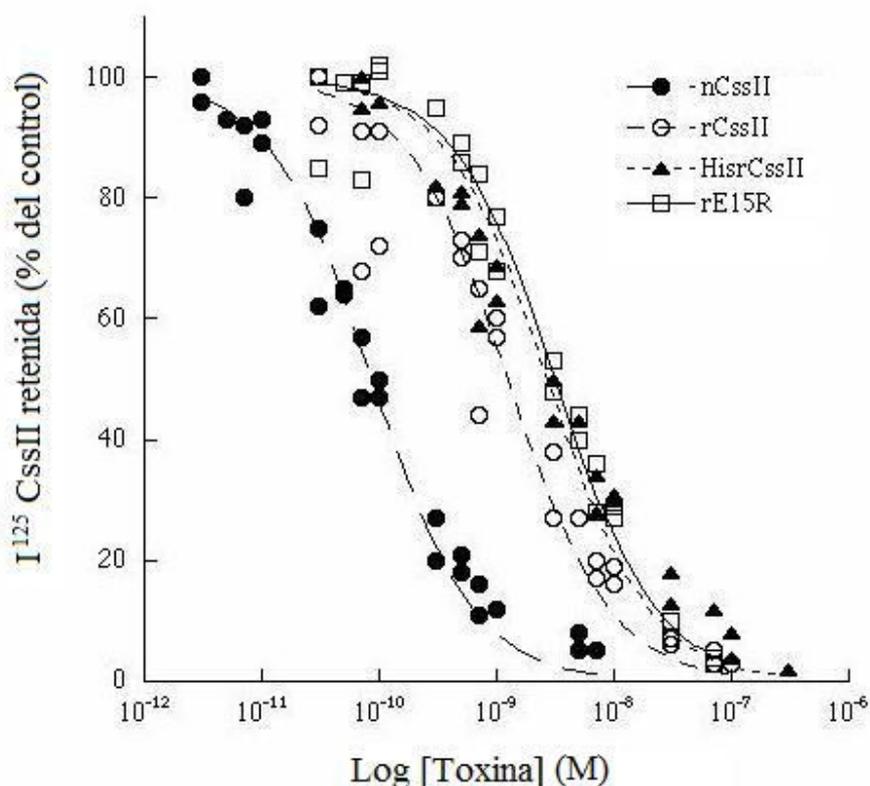


Fig. 20. Ensayos de unión de las toxinas nCssII, rCssII, HisrCssII y rE15R y su competencia con I^{125} CssII

6.4 Evaluación inmunológica de nCssII, rCssII, HisrCssII y rE15R

6.4.1 Inmunización de conejos y detección de anticuerpos por el método de ELISA

Para poder tener anticuerpos neutralizantes, se realizaron inmunizaciones en conejos con las toxinas nCssII, rCssII, HisrCssII y rE15R. En este caso evaluamos la recombinante rE15R, la cual no es tóxica a ratones, ya que en nuestro objetivo de tesis pretendemos evaluar la capacidad inmunogénica de un péptido no tóxico. Las toxinas nativa CssII y recombinantes HisrCssII y rCssII fueron evaluadas a su vez para su comparación entre

ellas. Estas inmunizaciones se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo de inmunización mostrado en la Tabla 9.

Tabla 9. Protocolo de inmunización de conejos con los peptidos nC_{ss}II, rC_{ss}II, HisrC_{ss}II y E15R.

Número	Día	[Sol. Toxina] (µg/mL)	Sol. Toxina (µl)	PBS (µl)	Adyuvante (µl)	Adyuvante	µl totales subcutáneos por conejo	Observaciones
1	1	1	3	497	500	CF	1000*	Sacar 1 mL para blanco (suero preinmune)
2	12	1	5	495	500	IF	1000*	
3	21	1	10	490	500	Alum	1000*	
4	30	1	30	470	500	IF	1000*	
5	40	1	30	470	500	Alum	1000*	Muestra de 1 mL para medir títulos de Ac's
6	54	1	50	450	500	IF	1000*	Muestra de 1 mL para medir títulos de Ac's
	64							Muestra de 1 mL para medir títulos de Ac's
7	67	1	50	450	500	Alum	1000*	
	77							Sangría final

(*) Repartida por lo menos en dos sitios

Para poder evaluar la generación de anticuerpos, después de la cuarta inmunización, se midieron los títulos de anticuerpos en muestras de sueros, por la técnica de ELISA indirecta, dando resultados positivos en los cuatro conejos pero no de la misma magnitud en cada uno de ellos (alrededor de 7000 para el de la toxina nativa y entre 35,000 y 45,000 para las otras 3 toxinas). Después de la quinta inmunización, los títulos no subieron significativamente, con excepción de los del conejo inmunizado con la toxina nativa, cuyo título de anticuerpos se elevó a 16,000). Para una tercera medición, los títulos de los anticuerpos levantados contra las toxinas nC_{ss}II y rE15R disminuyeron, mientras que los de los anticuerpos levantados contra las toxinas rC_{ss}II y HisrC_{ss}II aumentaron considerablemente. Se realizó el último refuerzo y pasados diez días, se llevó a cabo un sangrado a muerte. En la medición final de títulos, observamos que los títulos de los conejos inmunizados con las toxinas nC_{ss}II y rC_{ss}II aumentaron, mientras que los de los conejos inmunizados con las toxinas HisrC_{ss}II y rE15R disminuyeron. Cabe mencionar, que para un segundo ensayo de la ELISA de la primera muestra de sangre y para los ensayos a partir de la segunda muestra, se utilizó la proteína de fusión (HisrC_{ss}II) para

sensibilizar la placa, sin observarse una diferencia significativa entre los resultados. Estos resultados se muestran en la figura 21 y en forma resumida en la tabla A (Anexo 1).

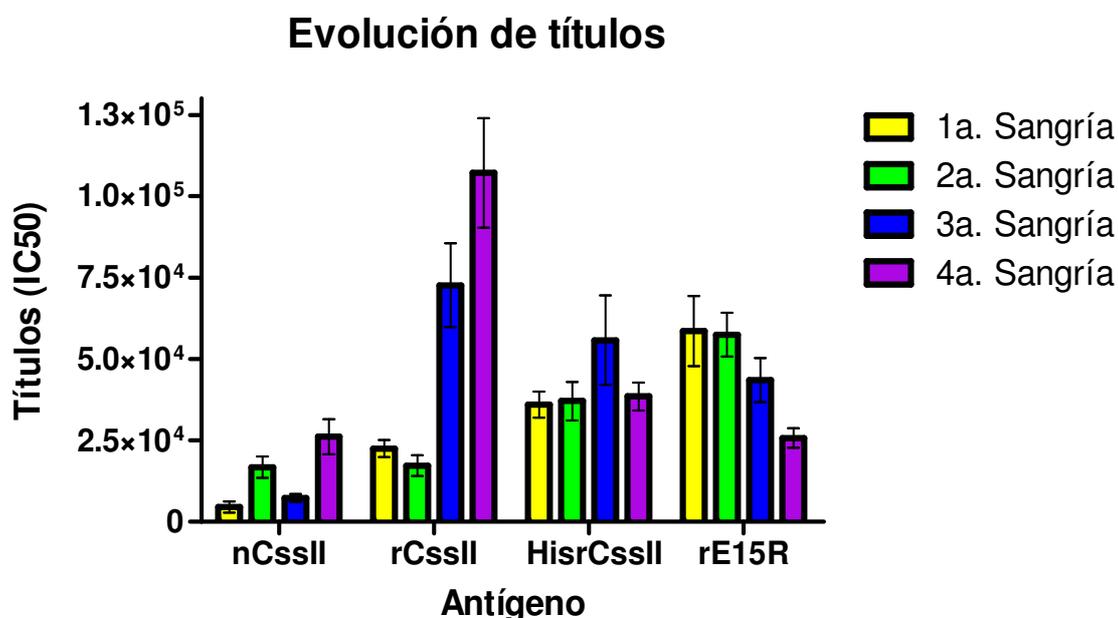


Fig. 21. Títulos de anticuerpos obtenidos en las diferentes sangrías.

6.4.2 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) IP de la toxina nativa CsslI y del veneno total de *Centruroides suffusus suffusus*

Para saber las condiciones de toxicidad que manejamos durante el proyecto, se llevó a cabo la determinación de la DL₅₀ de la nCsslI y del veneno total de *C. s. suffusus* vía IP. Para el primer caso se utilizaron grupos de 5 ratones en cada punto evaluado y para el segundo caso, se utilizaron grupos de 3 ratones en cada punto evaluado.

Los resultados experimentales para la determinación de la DL₅₀ de la toxina nCsslI se muestran en la Tabla B (Anexo 1). El análisis estadístico para determinar la DL₅₀ se realizó mediante el programa Prism 4 (GraphPad, Inc.), con un análisis de regresión con pendiente variable, como se menciona en la sección de materiales y métodos. La figura 22

muestra la gráfica del análisis. La DL_{50} vía IP de la toxina nC_{ss}II fue de 0.7 μ g/20 g de ratón.

Los resultados experimentales para la determinación de la DL_{50} del veneno de *C. s. suffusus* se muestran en la Tabla C (Anexo 1). El análisis estadístico se determinó de la misma manera que para la toxina nC_{ss}II. La figura 22 muestra la gráfica del análisis. La DL_{50} vía IP del veneno total de esta especie fue de 10.3 μ g/20 g de ratón.

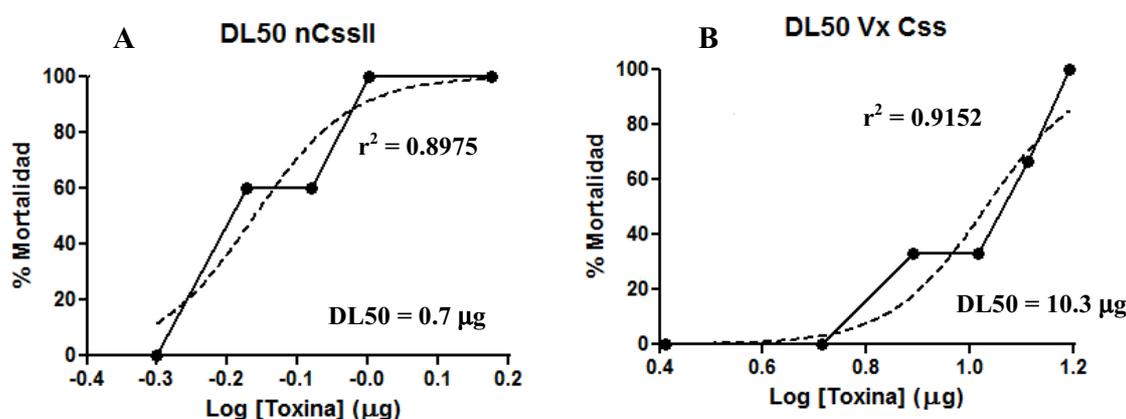


Fig. 22. Gráficas del análisis de la DL_{50} IP de la toxina nC_{ss}II (A) y del veneno de *C. s. suffusus* (B) en ratones CD1.

6.4.3 Pruebas de neutralización y Determinación de las Dosis Efectivas 50 (DE_{50}) de los sueros inmunes de conejo

Los sueros obtenidos de la sangría final se evaluaron de tres formas (títulos en la Tabla A, Anexo 1): neutralizando a la toxina nC_{ss}II, a Cn2 (la toxina más abundante y letal del veneno de *C. noxius*) y determinando las DE_{50} de los sueros para el veneno total de *C. s. suffusus*.

Los primeros ensayos que se hicieron para evaluar neutralización de la toxina nC_{ss}II, se realizaron en grupos de 6 ratones de la cepa CD1 (Sección experimental 5.9.5.a). Estos datos mostraron neutralización de la toxina con protección superior al 65% para los ratones tratados con 200 μ L de los sueros evaluados. El suero anti-rC_{ss}II protegió a todos

los ratones evaluados (100 %), el suero anti-nC_{ss}II protegió a cinco de seis ratones (83 %) y los sueros anti-HisrC_{ss}II y anti-rE15R solo protegieron cada uno a cuatro de seis ratones (67 %); estos resultados se muestran en la tabla 10. Es importante mencionar que si bien los ratones que murieron también presentaron síntomas de toxicidad, el tiempo de muerte fue más largo que los controles positivos. Los controles positivos (nC_{ss}II más suero preimmune) murieron todos con síntomas graves de toxicidad: dificultad respiratoria, taquicardia y convulsiones; en un tiempo promedio de 45 min, mientras que los ratones tratados murieron en un promedio de 180 min. Como control negativo se inyectaron 200 µL suero preimmune a un grupo de 6 ratones, los cuales no presentaron síntomas de toxicidad

Para los ensayos de neutralización de la toxina Cn2 (DL₅₀ = 0.25 µg) y utilizando grupos de 6 ratones CD1 (Sección experimental 5.9.5.b), ningún ratón tratado con los sueros a evaluar murió (protección del 100 %) y solo algunos presentaron síntomas leves de toxicidad, como comezón y erizamiento del pelo. En el caso de los controles positivos, los seis ratones presentaron síntomas graves de toxicidad, como dificultad respiratoria, taquicardia, convulsiones y contracción de la cola, la cual se tornó de color azulado. Después de esta sintomatología, el 100 % de los ratones murieron (Tabla 10).

Para poder determinar la eficacia de los sueros inmunes obtenidos y con el fin de poder hacer más comparativos los resultados, se hicieron pruebas de dosis efectiva 50 (DE₅₀), inyectando diferentes cantidades de los diferentes sueros a grupos de 5 ratones CD1 con 3DL₅₀ de veneno total de *C. s. suffusus* (Sección experimental 5.9.6). Los datos experimentales que se obtuvieron se muestran en la tabla D (Anexo 1), en razón de sobrevivientes/total de animales para cada cantidad de suero evaluada.

Mediante el programa Prism 4 y con los datos mostrados en la tabla D (Anexo 1), se obtuvieron las correspondientes DE₅₀ para cada suero. La figura 23 muestra las gráficas correspondientes para cada análisis, mientras que la tabla 10 y la figura 24 muestran un análisis comparativo de la eficiencia de los sueros.

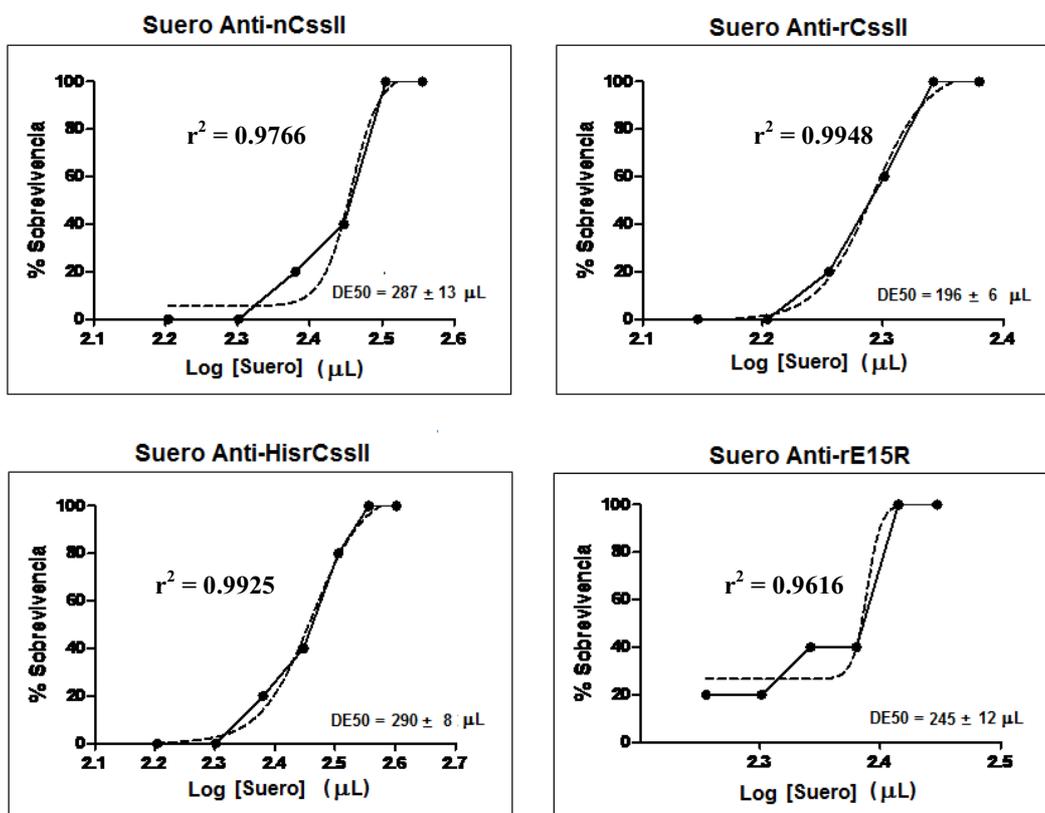


Fig. 23. Gráficas de análisis de las DE_{50} de los sueros inmunes.

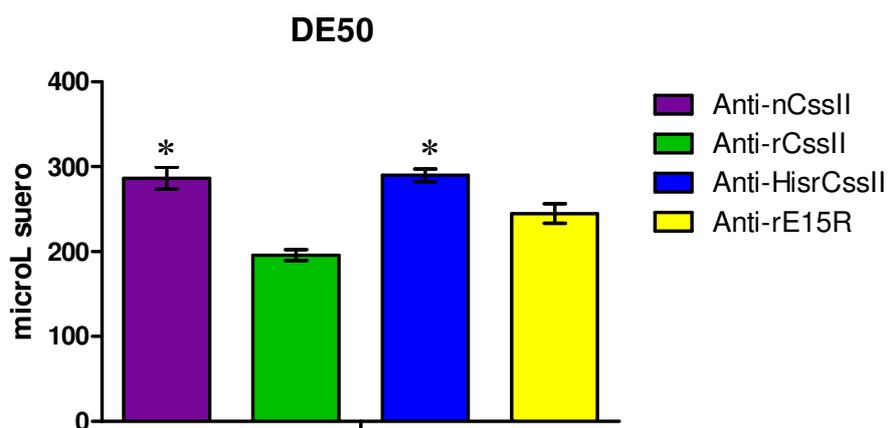


Fig. 24. DE_{50} de los sueros inmunes
 (* No presentan diferencia estadísticamente significativa entre sí)

La tabla 10, resume los ensayos de neutralización y determinación de DE₅₀ llevados a cabo para cada uno de los sueros producidos en conejo: contra la nCssII, la rCssII, la HisrCssII y rE15R.

Tabla 10. Ensayos de neutralización para CssII y Cn2 y determinación de DE50 para el veneno de *C. s. suffusus*.

DL ₅₀	Suero usado	Volumen de Suero (μL)	Títulos	Sobrevivientes (vivos/Total)		μL suero Veneno C _{ss}
				C _{ss} II	C _n 2	
3	Preimmune	200	0	0/6	0/6	>500
3	Anti-nC _{ss} II	200	26,100 ± 5,500	5/6	6/6	287 ± 13
3	Anti-rC _{ss} II	200	107,200 ± 16,800	6/6	6/6	196 ± 6
3	Anti-HisrC _{ss} II	200	38,400 ± 4,200	4/6	6/6	290 ± 8
3	Anti-rE15R	200	25,700 ± 3,000	4/6	6/6	245 ± 12
-	Preimmune	200	-	6/6	6/6	-

7. DISCUSIÓN

7.1 Expresión heteróloga de toxinas de alacrán y los problemas de plegamiento

Los primeros estudios que emplearon toxinas de alacrán como ligandos a canales iónicos, se realizaron con toxinas que eran obtenidas de fuentes naturales [Auguste *et al.*, 1992]. Desde finales de la década de los 80's y principios de los 90's, se reportan toxinas de alacrán expresadas de forma heteróloga. Diversos sistemas de expresión se han empleado, como: bacterias, plantas, levaduras, células de insecto y células animales [Bougis *et al.*, 1989; Pang *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1991]. Se expresado heterológamente y de forma exitosa 30 toxinas en la bacteria *E. coli*. Las toxinas expresadas son de las especies de alacranes de los géneros *Androctonus*, *Buthus*, *Centruroides* y *Tityus*. Sin embargo, poco se ha investigado acerca del correcto plegamiento de las mismas. La gran mayoría de estas toxinas son estabilizadas por 3 o 4 puentes disulfuro. El correcto plegamiento de las toxinas, es fundamental para su actividad biológica [Mouhat *et al.*, 2004; Park *et al.*, 1991]. Entre las principales desventajas del sistema de expresión heteróloga en *E. coli* se encuentra el hecho las proteínas expresadas no se pliegan correctamente [Yin *et al.*, 2007]. Esto ocurre con mayor frecuencia en toxinas con 4 puentes disulfuro y que afectan canales de sodio dependientes de voltaje, ya que por su alta hidrofobicidad tienden a formar agregados. El grupo de Gurevitz (1997) reportó el primer caso de una toxina recombinante de alacrán plegada *in vitro*, lo cual dio lugar a que su actividad biológica y funcional fuera análoga a la de la toxina nativa LqhIT2 [Turkov *et al.*, 1997]. En nuestro grupo de investigación se estableció un método de plegamiento *in vitro* para la toxina recombinante C_{ss}II [Estrada *et al.*, 2007], lo que permitió obtener las variantes de este trabajo correctamente plegadas con un necesario paso de plegamiento *in vitro*.

Con la caracterización de las toxinas observamos que el protocolo de plegamiento *in vitro* nos permite tener la toxina recombinante C_{ss}II funcional, lo cual se observa, primero en la toxicidad (ensayos *in vivo*), presentados en la tabla 8, en los ensayos de electrofisiología y en los ensayos de unión (ensayos *in vitro*), presentados en las figuras 18 y 20. Si bien la actividad biológica de la toxina recombinante C_{ss}II es menor a la de la toxina nativa, esto puede deberse a la diferencia química que existe entre la toxina nativa y

la toxina recombinante: la primera se encuentra amidada en el carboxilo terminal, mientras que la segunda no. Esta característica puede ser importante, ya que se ha reportado que neuropéptidos amidados en el C-terminal, presentan una mayor actividad con respecto a los neuropéptidos sin amidar [Benkhadir *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003; Merkler, 1994; Sabatier *et al.*, 1993]. En este trabajo, la diferencia de actividad biológica no sería atribuible al plegamiento, porque los ensayos de dicroísmo circular (figura 19) muestran un patrón de estructuras secundarias similar al de la toxina C_{ss}II nativa.

La variante recombinante rE15R no causa efectos de toxicidad *in vivo* (toxicidad en los ratones), ni incrementos en la apertura de los NaCh a potenciales más negativos (tabla 8 y figura 18). En los ensayos electrofisiológicos, la actividad sobre los canales de sodio es idéntica a la de las células en ausencia de toxinas. Sin embargo, a pesar de no existir un efecto en los ensayos de unión, se observa que la toxina sigue teniendo afinidad por las membranas de los sinaptosomas (figura 20). Por otro lado, su inocuidad no es debida a un mal plegamiento, ya que los ensayos de dicroísmo circular (figura 19) muestran que presenta el mismo patrón de estructura que la toxina nativa. La ausencia de toxicidad en esta variante, concuerda con los antecedentes (ver sección 2.3) en los que se reporta que el glutámico 15 es importante para que las toxinas β de alacrán tengan su efecto sobre el sensor de voltaje de los canales de sodio dependientes de voltaje [Cestèle *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2005; Karbat *et al.*, 2004].

7.1.2 Importancia del Glutámico 15.

Se sabe que las toxinas de alacrán tipo β actúan sobre el canal de sodio dependiente de voltaje por un mecanismo denominado “trampa del sensor de voltaje”, descrito por el grupo de Catterall en 1998 para el canal de sodio Nav1.2 y la beta-toxina C_{ss}IV del alacrán *C. s. suffusus* [Cestèle *et al.*, 1998], en el cual se sugiere que el glutámico 15 en la toxina C_{ss}IV, podría ser relevante para el mecanismo mencionado. Cuando se evaluaron mutaciones de la toxina C_{ss}IV, E15Q (para neutralizar la carga) y E15R (para cambiar la carga), se observó un menor efecto en los ensayos de actividad más no en la afinidad hacia el canal de sodio [Cohen *et al.*, 2005].

En la Tabla 11, se muestra una comparación en la secuencia aminoacídica de las toxinas C_{ss}II y C_{ss}IV (ambas del alacrán *C. s. suffusus*); los guiones en C_{ss}IV representan los residuos de aminoácidos idénticos con respecto a C_{ss}II.

Tabla 11. Comparación aminocídica entre las toxinas C_{ss}II y C_{ss}IV

Péptido	Secuencia de aminoácidos
nC _{ss} II	KEGYLVSKSTG CKYE CLKLGDN DY CLRECKQQYGKSSGGY CYAFAC WCTHLYEQAVVWPLPNKTCN*
nC _{ss} IV	-----NSY--F--F-----R-----G-----G-----

* Amidación en el carboxilo terminal

Se observa una homología mayor al 87 %, con el patrón de cisteínas conservado e importantemente con el glutámico 15 conservado (en negritas). Esto mismo ocurre para otras toxinas β de alacrán [Possani *et al.*, 1999]. Debido a esto, se decidió construir una variante que tuviera el cambio en el glutámico 15 a una arginina (E15R), con lo cual se esperaba evitar un puente salino entre la toxina C_{ss}II y las argininas del sensor de voltaje. Nuestros resultados con esta mutante correlacionaron con los antecedentes.

7.2 Evaluación inmunológica de nC_{ss}II, rC_{ss}II, HisrC_{ss}II y rE15R

7.2.1 DL₅₀ de la toxina nativa C_{ss}II y del veneno total de *Centruroides suffusus suffusus*.

Las DL₅₀ de la nC_{ss}II y del veneno de *C. s. suffusus* son diferentes a los previamente reportados. Para el caso de la toxina nC_{ss}II, la DL₅₀ reportada es de 0.5 µg por 20 g de ratón [Martin *et al.*, 1987], y en nuestro caso es de 0.71 µg por 20 g de ratón, lo que implica que es 0.7 veces menos tóxica que la dosis reportada. Para el caso del veneno total de *C. s. suffusus*, se reporta que la DL₅₀ es de 12 µg por 20 g de ratón [Martin *et al.*, 1987], mientras que en este trabajo resultó de 10.7 µg por 20 g de ratón, 1.1 veces más tóxico. Para ambos resultados, la diferencia es muy pequeña, y podría simplemente deberse al error experimental, o que para la determinación de la DL₅₀ en este trabajo, se utilizó una cepa diferente de ratones (CD1) que la cepa utilizada en los reportes de referencia (C57BL/6).

7.2.2 Neutralización de la toxina nativa C_{ss}II y del veneno total de *Centruroides suffusus suffusus* por los anticuerpos producidos en conejo.

En el 2000, el grupo de Chávez-Olórtegui, reportó la neutralización del veneno total de *Tityus serrulatus*, por los anticuerpos producidos contra un péptido no tóxico recombinante (TsNTxP) [Guatimosim *et al.*, 2000]. Más adelante, se reportó que los anticuerpos producidos contra las toxinas recombinantes AaH I, AaH II y AaH III, de *Androctonus australis* Hector, neutralizan la fracción tóxica del veneno del alacrán [Legros *et al.*, 2002]. En el 2003 se reportó que los anticuerpos producidos contra la toxina recombinante Cn5 neutralizaban los efectos de la toxina nativa Cn2 de *Centruroides noxius* [García *et al.*, 2003]. Estos son ejemplos representativos de que toxinas recombinantes, tóxicas o no, pueden producir anticuerpos neutralizantes contra las toxinas análogas nativas, contra otras toxinas de la misma especie e incluso contra los venenos totales.

Nuestros resultados se suman a esta teoría, ya que los anticuerpos producidos contra nC_{ss}II rC_{ss}II, HisrC_{ss}II y rE15R, reconocieron en mayor o menor medida a la toxina nativa nC_{ss}II y a la recombinante HisrC_{ss}II. Además los anticuerpos producidos contra las toxinas nativa y recombinante C_{ss}II neutralizaron los efectos de la toxina nativa nC_{ss}II, así como los producidos por el veneno total de *C. s. suffusus*. Los títulos de anticuerpos variaron, pero fueron mayores en el suero anti-rC_{ss}II.

Cabe mencionar que los resultados no pueden ser comparables, ya que solo se inmunizó un conejo por antígeno y las respuestas individuales pueden ser muy variadas. Por este motivo se hicieron las determinaciones de las DE₅₀ de los distintos sueros inmunes.

7.2.3 Reactividad cruzada

En este trabajo obtuvimos reconocimiento de los anticuerpos anti-rC_{ss}II y anti-HisrC_{ss}II por las toxinas nativas C_{ss}II (de *C. s. suffusus*), Cn2 (de *C. noxius*) y CII1 y CII2 (de *C. l. limpidus*). Además, todos los sueros evaluados, presentaron neutralización los efectos causados por la toxina Cn2. La reactividad cruzada entre toxinas de alacrán ya ha sido reportada (Tabla 2), proponiendo que existen epítopes antigénicos compartidos, conservados evolutivamente entre géneros. El presente trabajo, confirma esta regla, con una toxina (C_{ss}II) no evaluada anteriormente. Estos resultados de reactividad cruzada entre

CssII y Cn2 concuerdan además con el antecedente de que ambas toxinas pertenecen al mismo grupo estructural [Possani *et al.*, 1999].

La Tabla 12, hace una comparación entre las secuencias de las toxinas nativas CcssII, Cn2, CII1 y CII2, los guiones representan a los residuos de aminoácidos idénticos en cada toxina con respecto a nCcssII. Para Cn2 se observa una homología mayor a 89 %, mientras que para CII1 es mayor a 86 % y para CII2 esta homología es mayor a 87 %.

Tabla 12. Comparación aminoacídica entre las toxinas CcssII, Cn2, CII1 y CII2.

Péptido	Secuencia de aminoácidos
nCcssII	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN*
nCn2	-----D-N-----█-----█-----█-----█-----█-----GA-----█-----█-----█-----I-----R-S
nCII1	----I-NL-----█-----Y-----█-----█-----█-----GA-----█-----G-----█-----█-----K-----T
nCII2	-----NH-----█-----F-----█-----█-----█-----GA-----█-----G-----█-----N-----█-----K-----█

* Amidación en el carboxilo terminal

7.2.4 DE₅₀ de los sueros inmunes de conejo

La determinación de la dosis efectiva 50 (DE₅₀) de un suero anti-toxina o anti-veneno se ha utilizado ya anteriormente para evaluar la eficacia de los mismos. Aunque para sueros levantados contra toxinas o venenos de alacranes, estos estudios no se han realizado, algunas referencias reportan DE₅₀ de sueros producidos contra el veneno de una oruga quemadora –*Lonomia oblicua caterpillars*- [Rocha-Campos *et al.*, 2001], contra el veneno de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* [Almeida *et al.*, 1998], contra el veneno de la serpiente *Vipera berus* [Lomonte *et al.*, 1996] y contra el veneno de la serpiente *Naja kaouthia* [Sells *et al.*, 1994]. Los resultados muestran DE₅₀ muy variadas, por lo que no es posible la comparación entre los diversos estudios para poder determinar si hay un estándar en cuanto a la DE₅₀ de los sueros anti-venenos. En otro estudio, se determinó la DE₅₀ de sueros producidos en equinos y en ovinos contra el veneno de diferentes serpientes, para poder compararlos y decidir cuál era el suero más efectivo [Sjostrom *et al.*, 1994].

De esta manera, y con el fin de poder comparar los sueros que producimos durante el desarrollo de este trabajo, procedimos a determinar la DE₅₀ de cada suero. Así,

observamos que el suero anti-rC_{ss}II es el más efectivo significativamente, lo que concuerda además, con que es el que presenta los títulos más altos de anticuerpos. En cambio, observamos que el suero menos efectivo (anti-HisrC_{ss}II), no es el que presenta un menor título de anticuerpos, lo que indicaría que probablemente estos anticuerpos no son tan específicos. Estadísticamente y de acuerdo a un análisis de significancia mediante la comparación de los valores P, por el programa Prism 4 (GraphPad, Inc.), las únicas dos DE₅₀ que no presentan diferencia estadística entre sí, son las correspondientes al suero anti-nC_{ss}II y anti-HisrC_{ss}II, en otras palabras, los sueros de los conejos anti-rC_{ss}II y anti-rE15R fueron significativamente mejores que los sueros anti-nC_{ss}II y anti-HisrC_{ss}II en lo que se refiere a la protección contra el veneno total de *C. s. suffusus*.

Analizando solo los sueros anti-nC_{ss}II y anti-rE15R, que presentan los mismos títulos de sueros aproximadamente, observamos que el suero del conejo inmunizado con rE15R es más efectivo que el otro, con una diferencia significativa entre ellos (7-15%). Lo anterior indica que rE15R, que no presenta toxicidad en ratones (tabla 8), puede ser utilizada como inmunógeno para la producción de anticuerpos neutralizantes contra el veneno de *C. s. suffusus*, de manera comparativa a la toxina nativa.

Este resultado muestra una respuesta a nuestra hipótesis inicial, ya que se demuestra que un péptido recombinante no tóxico (rE15R) puede ser utilizado para generar anticuerpos neutralizantes en el suero de animales inmunizados con éste, para el caso de conejos.

8. CONCLUSIONES

Nuestro grupo de investigación tiene interés en el estudio de la composición del veneno del alacrán *C. s. suffusus* y en cómo usar los componentes del veneno para generar un antídoto contra su picadura. La alternativa actual que se utiliza para la generación de antivenenos es la inmunización de caballos con el veneno total, pero es conocido que el veneno del alacrán contiene toxinas irrelevantes a la intoxicación, por tal conocimiento este trabajo trató de profundizar en generar anticuerpos basados en una sola molécula, que a la vez fuera afuncional, para poder inmunizar animales con un antígeno que no tenga efectos tóxicos sobre los mismos.

Los resultados de este trabajo y el análisis de los mismos nos permitieron obtener las siguientes conclusiones:

- Se expresaron de manera exitosa los péptidos recombinantes rCssII, HisrCssII y rE15R, siguiendo el protocolo descrito [Estrada *et al.*, 2007; Estrada-Tapia, 2008]. Un paso de plegamiento *in vitro* fue necesario para tener las toxinas correctamente plegadas.
- Se demostró que el péptido recombinante rE15R no presenta toxicidad en ratones CD1 con 1 µg IC y 30 µg IP del mismo, lo que equivale a 200 DL50 y 30 DL50 de la toxina nativa (efecto *in vivo*).
- Este mismo péptido no presentó efecto sobre el canal de sodio (efecto *in vitro*), pero presentó competencia por el sitio de unión de la toxina nativa CssII y una estructura secundaria análoga a la de la misma, de acuerdo a los ensayos de unión y dicroísmo circular, respectivamente.
- Los conejos inmunizados con nCssII, rCssII, HisrCssII y rE15R produjeron anticuerpos neutralizantes en distintas proporciones, para la toxina nativa CssII y para el veneno total de *C. s. suffusus*, con lo que se concluye que estos péptidos son inmunogénicos. La toxina rCssII resultó ser la más inmunogénica.
- Un volumen de 200 µL de cada uno de los sueros fue capaz de neutralizar el efecto de la toxina Cn2, una toxina de otro alacrán del género *Centruroides*: *C. noxius*. Las toxinas CII1 y CII2 fueron reconocidas en placa por los sueros anti-rCssII y anti-

HiscssII. Estos datos sugieren que existe reconocimiento molecular hacia epitopes comunes de las toxinas de alacranes del mismo género, por parte de los sueros obtenidos.

- La proteína recombinante rE15R, que no presenta toxicidad en ratones, fue capaz de generar anticuerpos que neutralizan el efecto de la toxina nativa CcssII, la toxina Cn2 y el veneno total de *C. s. suffusus*, con lo que se demuestra que una variante no tóxica puede ser utilizada para protocolos de inmunización.
- Se demuestra también que solamente neutralizando la molécula (o moléculas) mayoritaria(s) responsable(s) de los efectos tóxicos es posible neutralizar los efectos letales producidos por el veneno total del alacrán. Además esta neutralización puede ser obtenida por el reconocimiento de epítopes diferentes a aquellos involucrados directamente en la actividad funcional del receptor, como es el caso de rE15R (la cual compite por el sitio de unión de la toxina nativa, pero no afecta al canal), o bien aquellos involucrados directamente en el reconocimiento y afinidad por el receptor, como es el caso de rCcssII (la cual no está amidada en el C-terminal).
- De acuerdo a los resultados, se estima que una mezcla de toxinas recombinantes de alacrán inmunogénicas puede ser una alternativa para la producción de antivenenos de alacrán y de esta manera evitar la formación de anticuerpos irrelevantes a la intoxicación.

Parte de este trabajo de tesis está publicado en una solicitud de patente y en un artículo de la revista Immunology Letters.

- G.A. Corzo-Burguete, G. Estrada-Tapia, K. Hernández-Salgado, B.I. García-Gómez, L.D. Possani-Postay, (2008), Inmunógenos recombinantes para la producción de antivenenos contra el veneno de alacranes del género *Centruroides*. UNAM México. Oficina de Patentes México (solicitud en trámite: MX/a/2008/00)
- Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera, A., Coronas, F.I. Possani, L.D., Corzo, G., (2009), Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CcssII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, Immunol Lett., 125:93-99.

9. PERSPECTIVAS

Las perspectivas de este trabajo son:

- Purificar los anticuerpos producidos que reconozcan específicamente a nCssII, para ver si se logra mejorar la capacidad neutralizante contra la toxina nativa CssII y contra el veneno total de *C. s. suffusus*.
- Llevar a cabo ensayos de reconocimiento en placa y de neutralización para otras toxinas del género, como CII1, CII2 (ambas de *C. l. limpidus*), Cii1 (de *C. infamatus infamatus*) y CsEM1 (de *C. sculpturatus*), con el fin de ver si existe reactividad cruzada para todas las toxinas de un género.
- Llevar a cabo ensayos de neutralización para el veneno total de otras especies del género, como *C. noxius*, *C. limpidus*, *C. infamatus* y *C. sculpturatus*, para ver si es posible obtener neutralización total o parcial para estos venenos con un suero producido contra una sola toxina.
- Mejorar el protocolo de inmunización para tratar de obtener anticuerpos más específicos y hacerlo en un número mayor de animales para mejorar la estadística de los resultados.
- Llevar a cabo ensayos de neutralización en animales previamente inmunizados con la anatoxina rE15R, con el fin de ver si se obtiene neutralización *in vivo*.
- Realizar inmunizaciones con mayores cantidades de rE15R, para tratar de obtener un mayor título de anticuerpos.
- Diseñar variantes de otras toxinas que tengan conservado el glutámico 15 y que no estén amidadas en el carboxilo terminal, para observar el efecto de la mutación sin la variable de la amidación.

10. REFERENCIAS

- Adam, K., and C. Weiss (1956), 5-Hydroxytryptamine in scorpion venom, *Nature*, 178, 421-422.
- Alagón, A., A. Chávez-Haro, C. DelaMora-Zerpa, C. Larralde, N. Lamas, E. Martín, N. Osnaya-Romero, Y. Pérez, L. D. Possani, and L. Romero-Zamora (2003), Alacranismo, *Practica Médica Efectiva*, 5, 1-4.
- Albuquerque, E., J. Daly, and J. Warnick (1988), Macromolecular sites for specific neurotoxins and drugs on chemosensitive synapses and electrical excitation in biological membranes, *Ion Channels*, 1, 95-162.
- Almeida, C., M. Kanashiro, F. Rangel Filho, M. Mata, T. Kipnis, and W. Da Silva (1998), Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk, *The Vet Rec*, 143, 579-584.
- Auguste, P., M. Hugues, B. Gravé, J. Gesquière, P. Maes, A. Tartar, G. Romey, H. Schweitz, and M. Lazdunski (1992), Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization, *J Biol Chem*, 265, 4753-4759.
- Bagchi, S., and S. Deshpande (1999), Indian red scorpion (*Buthus tumulus*) venom-induced augmentation of cardiac reflexes is mediated through the involvement of peripheral 5-HT₃ and central 5-HT₁ receptor subtypes, *Toxicon*, 37, 1697-1709.
- Benkhadir, K., R. Kharrat, S. Cestèle, A. Mosbah, H. Rochat, M. El Ayeb, and H. Karoui (2004), Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels, *Peptides*, 25, 151-161.
- Blaustein, M., R. Rogowski, M. Scheneider, and B. Krueger (1991), Polypeptide toxins from the venoms of Old World and New World scorpions preferentially block different potassium channels, *Mol Pharmacol*, 40, 932-942.
- Borges, A., L. De Sousa, J. Espinoza, R. Santos, E. Kalapothakis, D. Valadares, and C. Chávez-Olórtegui (2008), Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian antivenoms, *Toxicon*, 51, 66-79.
- Bosmans, F., M. Martin-Eauclaire, and K. J. Swartz (2008), Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels, *Nature*, 456, 202-208.
- Bougis, P. E., H. Rochat, and L. A. Smith (1989), Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II, *J Biol Chem*, 264, 19259-19265.
- Bugli, F. et al. (2008), Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice, *Toxicon*, 51, 547-554.
- Cahalan, M. (1975), Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom, *J Physiol*, 244, 511-534.
- Campos, F. V., B. Chanda, P. S. Beirão, and F. Bezanilla (2007), β -Scorpion Toxin Modifies Gating Transitions in All Four Voltage Sensors of the Sodium Channel, *J Gen Physiol*, 130, 257-268.

- Catterall, W. A., S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, F. H. Yu, K. Konoki, and T. Scheuer (2007), Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins, *Toxicon*, *49*, 124-141.
- Celis, A., R. Gaxiola-Robles, E. Sevilla-Godínez, M. D. Orozco-Valerio, and J. Armas (2007), Tendencia de la mortalidad por picaduras de alacrán en México, 1979–2003, *Rev Panam Salud Publica*, *21*, 373-380.
- Cestèle, S., Y. Qu, J. C. Rogers, H. Rochat, T. Scheuer, and W. A. Catterall (1998), Voltage Sensor–Trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by, *Neuron*, *21*, 919-931.
- Chase, P., L. Boyer-Hassen, J. McNally, H. Vazquez, A. Theodorou, F. Walter, and A. Alagon (2009), Serum levels and urine detection of *Centruroides sculpturatus* venom in significantly envenomated patients, *Clin Toxicol (Phila)*, *47*, 24-28.
- Chavez-Olortegui, C., F. Molina, and C. Granier (2001), Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with a and b-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion, *Mol Immunol*, *38*, 867-876.
- Chippaux, J., and M. Goyffon (2008), Epidemiology of scorpionism: A global appraisal, *Acta Trop*, *107*, 71-79.
- Chávez-Olortegui, C., E. Kalapothakis, A. Moreira-Ferreira, A. Ferreira, and C. Diniz (1997), Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *tityus*, *Toxicon*, *35*, 213-221.
- Clare, J. J., S. N. Tate, M. Nobbs, and M. A. Romanos (2000), Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets, *Drug Discov Today*, *5*, 506-520.
- Cohen, L., I. Karbat, N. Gilles, N. Ilan, M. Benveniste, D. Gordon, and M. Gurevitz (2005), Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels, *Biol. Chem.*, *280*, 5045-5053.
- D'Suze, G., S. Moncada, C. González, C. Sevcik, and A. Alagón (2007), Antigenic cross-reactivity between sixteen venoms from scorpions belonging to six genera, *Clin Toxicol*, *45*, 158-163.
- DGEPI (2009), Estadísticas de salud en México, Dirección General de Epidemiología (DGEPI), <http://www.dgepi.salud.gob.mx/>, consultada en Junio, 2009.
- Das Gupta, S., A. Gomes, A. Gomes, A. Basu, and S. Lahiri (1989), Immunological cross reactivity & paraspecificity of the scorpion *Heterometrus bengalensis* antivenom, *Indian J Med Res*, *90*, 140-146.
- Devaux, C., O. Clot-Faybesse, M. Juin, K. Mabrouk, J. Sabatier, and H. Rochat (1997), Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog, *FEBS Lett*, *412*, 456-460.
- El Ayeb, M., P. Delori, and H. Rochat (1983), Immunochemistry of scorpion alpha-toxins: antigenic homologies checked with radioimmunoassays (RIA), *Toxicon*, *21*, 709-716.
- Espino-Solís, G., L. Riaño-Umbarila, B. Becerril, and L. Possani (2009), Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives, *J Proteomics*, *72*, 183-199.

- Estrada, G., B. I. Garcia, E. Schiavon, E. Ortiz, S. Cestèle, E. Wanke, L. D. Possani, and G. Corzo (2007), Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CssII: Heterologous expression and proper folding in vitro, *Biochim Biophys Acta*, 1770, 1161 - 1168.
- Estrada-Tapia, G. (2008), Obtención de toxinas recombinantes ricas en puentes disulfuro para estudios de la relación estructura-función, , (11).
- García, C., E. S. Calderón-Aranda, G. A. Anguiano, B. Becerril, and L. D. Possani (2003), Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius Hoffmann'*, *Toxicon*, 41, 417-427.
- García-Gómez, B. I., T. C. Olamendi-portugal, J. Paniagua, J. Van Der Walt, K. Dyason, and L. D. Possani (2009), Heterologous expression of a gene that codes for Pg8, a scorpion toxin of *Parabuthus granulatus*, capable of generating protecting antibodies in mice, *Toxicon*, 53, 770-778.
- Gazarian, K. G., T. Gazarian, R. Hernández, and L. D. Possani (2005), Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines, *Vaccine*, 23, 3357-3368.
- Genotipos_E.coli (2009), Genotipos de cepas de E. coli, http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes, consultada en Junio, 2009.
- González-Rivera, A., P. A. Álvarez-Navarro, E. Lombardo-Aburto, H. Hernández-Orozco, M. López-Alquicira, E. Solórzano-García, and E. Ortega-Martínez (2004), Alacranismo, *Acta Pediatr Méx*, 25, 48-58.
- Granja-Bermúdez, V. M., R. Martínez-Zúñiga, and P. Chico-Aldama (1999), Alacranismo, *Rev Alerg Asma Inmunol Pediatr*, 8, 109-112.
- Guatimosim, S. C., E. Kalapothakis, C. R. Diniz, and C. Chávez-Olórtegui (2000), Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein, *Toxicon*, 38, 113-121.
- Gurevitz, M., I. Karbat, L. Cohen, N. Ilan, R. Kahn, M. Turkov, M. Stankiewicz, W. Stühmer, K. Dong, and D. Gordon (2007), The insecticidal potential of scorpion b-toxins, *Toxicon*, 49, 473-489.
- Inceoglu, B., J. Lango, A. Rabinovich, P. Whetstone, and B. D. Hammock (2006), The neutralizing effect of a polyclonal antibody raised against the N-terminal eighteen-aminoacid residues of birtoxin towards the whole venom of *Parabuthus transvaalicus*, *Toxicon*, 47, 144-149.
- Ismail, M. (2003), Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy, *Int J Antimicrob Agents*, 21, 170-174.
- Johnson, T. M., M. W. Quick, T. T. Sakai, and N. R. Krishna (2000), Expression of functional recombinant scorpion beta-neurotoxin C_{ss} II in E. coli, *Peptides*, 21, 767-772.
- Karbat, I., L. Cohen, N. Gilles, D. Gordon, and M. Gurevitz (2004), Conversion of a scorpion toxin agonist into an antagonist highlights an acidic residue involved in voltage sensor trapping during activation of neuronal Na⁺ channels, *FASEB J*, 18, 683-689.
- Ke, S., and E. L. Madison (1997), Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method, *Nucleic Acid Res*, 25, 3371-3372.

- Kharrat, R., I. Zenouaki, Z. Ben Lasfar, K. Miled, and M. El Ayeb (1997), Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxic polymeric forms conferring protection against scorpion venoms, *Toxicon*, 35, 915-930.
- Kozminsky-Atias, A., A. Bar-Shalom, D. Mishmar, and N. Zilberberg (2008), Assembling an arsenal, the scorpion way, *BMC Evol Biol*, 8, 333-345.
- Krzemien, D., K. Schaller, S. Levinson, and J. Caldwell (2000), Immunolocalization of sodium channel isoform NaCh6 in the nervous system, *J Comp Neurol*, 420, 70-83.
- Legros, C., H. Kaabi, M. El Ayeb, B. Céard, H. Vacher, P. Bougis, and M. Martin-Eauclaire (2002), Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins, *Vaccine*, 20, 934-942.
- Licea, A., B. Becerril, and L. Possani (1996), Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, *Toxicon*, 34, 843-847.
- Liu, Z., G. Yang, B. Li, C. Chi, and X. Wu (2003), Cloning, co-expression with an amidating enzyme, and activity of the scorpion toxin BmK ITa1 cDNA in insect cells, *Mol Biotechnol*, 24, 21-26.
- Lomonte, B., G. León, and L. Hanson (1996), Similar effectiveness of Fab and F(ab')₂ antivenoms in the neutralization of hemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice, *Toxicon*, 34, 1197-1202.
- Maniatis, T., J. Sambrook, and E. Fritsch (1989), *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Martin, M. F., L. G. Garcia Y Perez, M. El Ayeb, C. Kopeyan, G. Bechis, E. Jover, and H. Rochat (1987), Purification and Chemical and Biological Characterizations of Seven, *J Biol Chem*, 262, 4452-4459.
- Martin-Eauclaire, M., M. Alami, A. Giamarchi, V. Missimilli, J. Rosso, and P. E. Bougis (2006), A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins, *Vaccine*, 24, 1990-1996.
- Mendes, T., F. Dias, C. Horta, I. Pena, E. Arantes, and E. Kalapothakis (2008), Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component, *Toxicon*, 52, 787-793.
- Merkler, D. J. (1994), C-Terminal amidated peptides: Production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity, *Enzyme Microb Technol*, 16, 450-456.
- Morey, S., K. Kiram, and J. Gadaq (2006), Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom, *Toxicon*, 47, 188-195.
- Mouhat, S., B. Jouirou, A. Mosbah, M. De Waard, and J. Sabatier (2004), Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels, *Biochem J*, 378, 717-726.
- Nair, R., and P. Kuryo (1975), Investigations on the venom of the South Indian scorpion *Heterometrus scaber*, *Biochim Biophys Acta*, 13, 165-174.
- Nishikawa, A., C. Caricati, M. Lima, M. Dos Santos, T. Kipnis, V. Eickstedt, I. Knysak, M. Da Silva, H. Higashi, and W. Da Silva (1994), Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions, *Toxicon*, 32, 989-998.
- Olvera, A. et al. (2006), North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens', *Toxicon*, 48, 64-74.

- Osnaya-Romero, N., T. De Jesús Medina-Hernández, S. Flores-Hernández, and G. León-Rojas (2001), Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, Mexico, *Toxicon*, 39, 781-785.
- Ozkan, O., and A. Carhan (2008), The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom, *Toxicon*, 52, 375-379.
- Pallaghy, P., K. Nielsen, D. Craik, and R. Norton (1994), A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides, *Protein Sci*, 3, 1833-1839.
- Pang, S., S. Oberhaus, J. Rasmussen, D. Knipple, J. Bloomquist, D. Dean, K. Bowman, and J. Sanford (1992), Expression of a gene encoding a scorpion insectotoxin peptide in yeast, bacteria and plants, *Gene*, 116, 165-172.
- Park, C., S. Hausdorff, and C. Miller (1991), Design, synthesis, and functional expression of a gene for charybdotoxin, a peptide blocker of K⁺ channels, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 2046-2050.
- Pessini, A., T. Takao, E. Cavalheiro, W. Vichnewski, S. Simpaio, J. Giglio, and E. Arantes (2001), A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids, *Toxicon*, 39, 1495-1504.
- Possani, L. D., B. Becerril, M. Delepierre, and J. Tytgat (1999), Scorpion toxins specific for Na⁺ channels, *Eur J Biochem*, 264, 287-300.
- Possani, L. D., B. M. Martin, I. Svendsen, G. S. Rode, and B. W. Erickson (1985), Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*, *Biochem J*, 229, 739-750.
- Ramanaiah, M., P. Parthasarathy, and B. Venkaiah (1990), Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom, *Biochem Int*, 20, 301-310.
- RedTox (2009), Información sobre animales ponzoñosos, <http://www.redtox.org/RT2/servlet/CtrlHome>, consultada en Junio, 2009.
- Rocha-Campos, A., L. Goncalves, H. Higashi, I. Yamagushi, I. Fernandes, J. Oliveira, M. Ribela, M. Sousa-E-Silva, and W. Díaz Da Silva (2001), Specific heterologous F(ab')₂ antibodies revert blood incoagulability resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars, *Am J Trop Med Hyg*, 64, 283-289.
- Rodríguez De La Vega, R. C., and L. D. Possani (2005), Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution, *Toxicon*, 46, 831-844.
- Sabatier, J., H. Zerrouk, H. Darbon, K. Mabrouk, A. Benslimane, H. Rochat, M. Martin-Eauclaire, and J. Van Rietschoten (1993), P05, a new leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the alpha-amidated analog, a ligand of Ca(2⁺)-activated K⁺ channels with increased affinity, *Biochemistry*, 32, 2763-2770.
- Sells, P., R. Jones, G. Laing, D. Smith, and R. Theakston (1994), Experimental evaluation of ovine antisera to Thai cobra (*Naja kaouthia*) venom and its alpha-neurotoxin, *Toxicon*, 32, 1657-1665.
- Sjostrom, L., I. Al-Abdulla, S. Rawat, D. Smith, and J. Landon (1994), A comparison of ovine and equine antivenoms, *Toxicon*, 32, 427-433.

- Sonnichsen, F., J. Van Eyk, R. Hodges, and B. Sykes (1992), Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide, *Biochemistry*, *31*, 8790-8798.
- Srairi-Abid, N., H. Kaabi, S. Mlayah-Bellalouna, T. Mejri, F. Sampieri, and M. El Ayeb (2008), Immunological characterization of a non-toxic peptide conferring protection against the toxic fraction (AahG50) of the *Androctonus australis hector* venom, *Toxicon*, *51*, 353-362.
- Stewart, L., M. Hirst, M. López Ferber, A. Merryweather, P. Cayley, and R. Possee (1991), Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene, *Nature*, *352*, 85-88.
- Turkov, M., S. Rashi, Z. Noam, D. Gordon, R. B. Khalifa, M. Stankiewicz, M. Pelhate, and M. Gurevitz (1997), In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*, *Protein Expr Purif*, *10*, 123-131.
- Wood, J. N., J. P. Boorman, K. Okuse, and M. D. Baker (2004), Voltage-Gated Sodium Channels and Pain Pathways, *J Neurobiol*, *61*, 55-71.
- Yin, J., G. Li, X. Ren, and G. Herrler (2007), Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes, *J Biotechnol*, *127*, 335-347.
- Yu, F. H., and W. A. Catterall (2003), Overview of the voltage-gated sodium channel family, *Genome Biol*, *4*, 207.
- Zamudio, F., R. Saavedra, B. Martin, G. Gurrola-Briones, P. Herion, and L. Possani (1992), Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, *Eur J Biochem*, *204*, 281-292.
- Zenouak, I., R. Kharrat, J. Sabatier, C. Devaux, H. Karoui, J. Van Rietschoten, M. El Ayeb, and H. Rochat (1997), In vivo protection against *Androctonus australis hector* scorpion toxin and venom by immunization with a synthetic analog of toxin II, *Vaccine*, *15*, 187-194.

11. ANEXO 1

TABLAS ADICIONALES

Tabla A. Títulos de anticuerpos obtenidos en las diferentes sangrías.

Sangría y suero	Antígeno para sensibilizar placa	Títulos
1a		
Anti-nCssII	nCssII	7,517 ± 2,446
Ant-rCssII	nCssII	34,754 ± 5,584
Anti-HisrCssII	nCssII	42,202 ± 5,352
Anti-rE15R	nCssII	44,521 ± 4,596
Anti-nCssII	HisrCssII	4,529 ± 1,751
Ant-rCssII	HisrCssII	22,494 ± 2,579
Anti-HisrCssII	HisrCssII	35,980 ± 4,011
Anti-rE15R	HisrCssII	58,577 ± 10,790
2a		
Anti-nCssII	HisrCssII	16,759 ± 3,308
Ant-rCssII	HisrCssII	17,218 ± 3,198
Anti-HisrCssII	HisrCssII	37,090 ± 5,908
Anti-rE15R	HisrCssII	57,514 ± 6,719
3a		
Anti-nCssII	HisrCssII	7,277 ± 1,262
Ant-rCssII	HisrCssII	72,670 ± 12,838
Anti-HisrCssII	HisrCssII	55,785 ± 13,665
Anti-rE15R	HisrCssII	43,525 ± 6,782
4a (Final)		
Anti-nCssII	HisrCssII	26,132 ± 5,382
Ant-rCssII	HisrCssII	107,182 ± 16,848
Anti-HisrCssII	HisrCssII	38,467 ± 4,246
Anti-rE15R	HisrCssII	25,743 ± 3,057

Tabla B. Resultados experimentales para la determinación de la DL₅₀ IP de la toxina nC_{ss}II

Dosis (μg)	Animales Muertos	Animales totales	% Mortalidad
0.5	0	5	0
0.67	3	5	60
0.83	3	5	60
1	5	5	100
1.5	5	5	100

Tabla C. Resultados experimentales para la determinación de la DL₅₀ del veneno de *Centruroides suffusus suffusus*

Dosis (mg)	Animales Muertos	Animales totales	% Mortalidad
2.59	0	3	0
5.18	0	3	0
7.77	1	3	33.3
10.36	1	3	33.3
12.95	2	3	66.6
15.54	3	3	100

Tabla D. Resultados experimentales de las pruebas de DE₅₀ para las sueros inmunes en animales retados con veneno total de *C. s. suffusus*.

Suero anti-nC_{ss}II		Suero anti-rC_{ss}II		Suero anti-HisrC_{ss}II		Suero anti-rE15R	
μL suero	Sobrevivientes /Total	μL suero	Sobrevivientes /Total	μL suero	Sobrevivientes /Total	μL suero	Sobrevivientes /Total
160	0/5	140	0/5	160	0/5	180	1/5
200	0/5	160	0/5	200	0/5	200	1/5
240	1/5	180	1/5	240	1/5	220	2/5
280	2/5	200	3/5	280	2/5	240	2/5
320	5/5	220	5/5	320	4/5	260	5/5
360	5/5	240	5/5	360	5/5	280	5/5
-	-	-	-	400	5/5	-	-

12. ANEXO 2

GLOSARIO DE TÉRMINOS MÉDICOS

Alacranismo: Problema de salud pública originado por la picadura de alacranes venenosos.

Alteraciones de la presión arterial: Cualquier variación de la presión arterial normal. Incluye Hipertensión (más de 140/90 mm de Hg) e Hipotensión (menos de 100/60 mm de Hg).

Alteraciones del ritmo cardiaco: Arritmias. Toda irregularidad en el ritmo natural del corazón. Incluye: Bradicardia (pulso muy lento, por debajo de 60 latidos por minuto), Taquicardia (pulso muy rápido, por encima de 100 latidos por minuto) y Fibrilación (latidos rápidos no coordinados; son contracciones de fibras musculares cardíacas individuales).

Amaurosis pasajera: Pérdida de la visión en un ojo debido a la ausencia temporal de sangre en la retina.

Artralgia: Dolor en una o más articulaciones.

Broncoespasmo: Estrechamiento de la luz bronquial como consecuencia de la contracción de la musculatura de los bronquios, lo que causa dificultades al respirar.

Choque anafiláctico: Reacción grave y a veces potencialmente mortal del sistema inmunitario a un antígeno al que una persona ha estado expuesta antes. La reacción puede incluir picazón de la piel, edema, colapso de los vasos sanguíneos, desmayo, dificultad para respirar y muerte.

Cianosis peribucal: Coloración azulada de la piel y mucosas en la boca y su área periférica, usualmente debida a la existencia de por lo menos, 5 g% de hemoglobina reducida en la sangre circulante o de pigmentos hemoglobínicos anómalos (metahemoglobina o sulfohemoglobina) en los glóbulos rojos.

Diarrea: Alteración de las heces en cuanto a volumen, fluidez o frecuencia en relación anormal a la fisiológica. Más de tres deposiciones al día o el aumento de la cantidad de heces a más de 200 g / 24 h en sujetos adultos.

Dificultad respiratoria: Afección que involucra una sensación de dificultad o incomodidad al respirar o la sensación de no estar recibiendo suficiente aire.

Diplopía: Síntoma que se manifiesta por la visión doble de un objeto.

Dislalia: Trastorno en la articulación de los fonemas. Se trata de una incapacidad para pronunciar correctamente ciertos fonemas o grupos de fonemas.

Distensión abdominal: Aumento del volumen del abdomen por diferentes causas, entre ellas, la acumulación de líquido en la cavidad abdominal o la acumulación de aire en el intestino.

Dolor: Experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño real o potencial de un tejido.

Edema: Acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial y también en las cavidades del organismo.

Epifora: Acumulación de lágrimas producidas en cantidad normal que no pueden evacuarse en su totalidad.

Estornudo: Acto reflejo convulsivo de expulsión de aire desde los pulmones a través de la nariz y boca. Por lo común es provocado por partículas extrañas que provocan la irritación de la mucosa nasal.

Fasciculación lingual: Movimiento involuntario de la lengua.

Fotofobia: Intolerancia anormal a la luz.

Hipertermia: Trastorno grave que se presenta cuando un organismo homeotérmico no alcanza a disipar más calor del que genera o absorbe.

Irritabilidad: Respuesta exagerada a los estímulos.

Náusea: Situación de malestar en el estómago, asociada a la sensación de tener necesidad de vomitar.

Nistagmus: Movimiento incontrolado e involuntario de los ojos.

Parestesia: Sensación de hormigueo, ardor o adormecimiento del músculo y la piel.

Priapismo: Erección involuntaria y muy dolorosa del pene.

Prurito: Es un hormigueo o irritación de la piel que provoca el deseo de rascarse en el área afectada. (Nasal: Prurito en la nariz).

Rash: Erupción que se manifiesta con cambios en el color o la textura de la piel.

Reacción adversa: Cualquier respuesta a un medicamento que sea nociva y no intencionada, y que tenga lugar a dosis que se apliquen normalmente en el ser humano para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades, o para la restauración, corrección o modificación de funciones fisiológicas.

Sensación de cuerpo extraño faríngeo: Sensación de una “masa” en la faringe, o “nudo en la garganta”, generalmente no relacionado con la ingesta y que no impide la deglución.

Sialorrea: Exceso de producción de saliva.

Urticaria: enfermedad de la piel caracterizada por lesiones cutáneas edematosas, de contornos delimitados y con un halo eritematoso, generalmente evanescentes y cambiantes, acompañada de prurito.

Vómito: Expulsión violenta y espasmódica del contenido del estómago a través de la boca.