

Obtención de la Dosis Efectiva Media (EC50) del Anticuerpo Monoclonal 5C10 para la Toxina de *Loxosceles reclusa*

Yáñez Lucía

Asesores: Moctezuma Claudia; Alagón Alejandro

Profesor Responsable: Ayala Alma

Centro Universitario Anglo Mexicano
Plantel: MORELOS

Introducción

En el mundo se conocen al rededor de 38,000 especies de arañas, de las cuales la Organización Mundial de la Salud sólo considera 4 géneros de importancia médica: *Latrodectus sp.*, *Loxosceles sp.*, *Phoneutria sp.*, y *Atrax sp.*

Las arañas del género *Loxosceles* son comúnmente conocidas como arañas violinistas debido a que en el dorso del cefalotórax poseen una marca en forma de violín. Estas arañas son cosmopolitas, no obstante la mayor parte de las especies se encuentran en América. En México se han descrito 40 especies, entre ellas *Loxosceles boneti* en Morelos.

El veneno de esta araña está constituido por distintos componentes, de los cuales la esfingomielinasa-D (SMD) es la responsable de la actividad tóxica. La mordida de *Loxosceles* produce un cuadro clínico llamado loxoscelismo, que puede presentarse en dos formas: cutáneo o sistémico.

Actualmente la única forma de diagnóstico, se realiza en función de los síntomas que presenta el paciente, los cuales en sus inicios suelen confundirse con diversas patologías. Debido a la importancia de un diagnóstico pronto y acertado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM se generó una batería de anticuerpos monoclonales (AcM) con la finalidad de diseñar un kit de diagnóstico.

Los anticuerpos monoclonales son aquellos producidos por un clon, es decir, por un grupo de células derivadas de una única célula y, por lo tanto, con características idénticas.

Al caracterizar los AcM se observó que uno de ellos, el Ac 5C10, además de reconocer a la SMD, inhibía su actividad. Debido a estas características se consideró importante evaluar el potencial terapéutico del AcM a través de la generación de un Fab quimérico.

Es importante que el Fab quimérico presente una inhibición comparable con la del AcM 5C10, por lo cual el presente trabajo consistió en determinar la dosis efectiva media (EC50) tanto del anticuerpo completo como de su correspondiente Fab. Estos datos serán el punto de comparación para el Fab quimérico.

Objetivos

Cuantificar la potencia neutralizante de dos preparaciones del anticuerpo monoclonal 5C10 contra la esfingomielinasa-D (SMD) de *Loxosceles reclusa*.

Metodología

Resultados

Purificación del AcM 5C10. Se purificó un nuevo lote de anticuerpo monoclonal a partir de líquido ascítico. En los carriles 2 y 6 se tiene el lote previo (cuyo patrón en este análisis es standard STD) y en los carriles 3 y 7 se puede observar el bandeo del anticuerpo purificado. En los carriles 2 y 3 se pueden observar las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos en ambos lotes comparativamente.

1	MPM
2	AcM 5C10 STD

3	AcM 5C10 Recién Purificado
4	
5	
6	AcM 5C10 STD
7	AcM 5C10 Recién Purificado

Digestiones del AcM 5C10 con papaína. Como se puede observar en la figura la digestión del AcM 5C10 fue completa, quedando un patrón de bandeo de pesos muy aproximados en el cual se encuentran los fragmentos Fab, Fc y papaína. En este análisis electroforético se incluyó un Fab policlonal de caballo, el cual nos sirvió de patrón standard (STD)

Análisis electroforético de la digestión del AcM 5C10 con papaína.

Al inyectar las distintas alícuotas a los ratones, no se obtuvieron resultados sobre los cuales se pudiera continuar el trabajo, se cree que esto se debe a la desnaturalización de la toxina, por lo cual, se está llevando a cabo en el laboratorio una nueva purificación de la misma. Se procederá a repetir el experimento con la cepa de ratones en espera de nuevos y confiables resultados.

BIBLIOGRAFÍA

Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C. & K. Winkel. 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45: 489-499

Janeway, C; Travers, P; Walport, M; Capra, D. INMUNOBIOLOGÍA, *El Sistema Inmunitario en Condiciones de Salud y Enfermedad*.

Moctezuma, C; Producción de una forma de anticuerpo recombinante quimérico antiesfingomielinasa D de araña *Loxosceles*. 2007.

Preparación de distintas alícuotas con 3LD50 de SMD y diferentes concentraciones del Fab

Preparación de distintas alícuotas con 3LD50 de SMD y diferentes concentraciones del AcM

Purificación y cuantificación del digestión del AcM 5C10 con papaína

Análisis y evaluación de los resultados para el establecimiento de la EC50.

Inyección de ratones
Balb/C

Digestión del AcM 5C10 con Papaína

Purificación del AcM 5C10 a partir de líquido ascítico

6.5

16.5

25

32.5

47.5

62

83

175

Condiciones reductoras

Condiciones no
reductoras

16.5

25

32.5

47.5

16.5

25

32.5

47.5

1 2 3 4 5

1 2 3 4 5 6

1. Marcador de peso molecular.
2. AcM 5C10 5 μ g
3. Fab STD de caballo 5 μ g
4. Papaína 5 μ g
5. AcM 5C10 digerido 5 μ g

1. Marcador de peso molecular.
2. Carril vacío.
3. AcM 5C10 5 μ g
4. Fab STD de caballo 5 μ g
5. Papaína 5 μ g
6. AcM 5C10 digerido 5 μ g

* Se cargaron 5 μ g/pozo.

1 2 3 4 5 6 7

Ensayo de inhibición enzimática.
IN VITRO

ELISA

Ensayo de inhibición enzimática.
IN VITRO

ELISA

Inyección de ratones
Balb/C

Incubación del Fab con la toxina a 37°C durante 1 hora

Incubación del AcM con la toxina a 37°C durante 1 hr