

Tesis de Posgrado

Purificación química del veneno de la araña Latrodectus

Scavini, Luis Mario

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Scavini, Luis Mario. (1963). Purificación química del veneno de la araña Latrodectus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1209_Scavini.pdf

Cita tipo Chicago:

Scavini, Luis Mario. "Purificación química del veneno de la araña Latrodectus". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1209_Scavini.pdf

FCEN-BA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PURIFICACION QUIMICA DEL VENENO DE LA ARAÑA

LATRODECTUS

LUIS MARIO SCAVINI

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN QUIMICA.

AÑO 1963

TESIS: 1443

PCVMA

Padrino de tesis

Dr. Ignacio Firosky

A la memoria de
mi MADRE

I N D I C E

PROLOGO.

1. MATERIAL DE ESTUDIO.....	pág.	1
2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TOXICIDAD DEL VENENO DE LA ARAÑA <u>LATRODECTUS</u>	"	2
3. FRACCIONAMIENTO DEL VENENO DE LA ARAÑA <u>LATRODECTUS</u> POR PRECIPITACION SALINA.....	"	15
4. FRACCIONAMIENTO DEL VENENO DE LA ARAÑA <u>LATRODECTUS</u> POR ETANOL.....	"	29
5. ELECTROFORESIS EN PAPEL DEL VENENO DE LA ARAÑA <u>LATRODECTUS</u>	"	39
6. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE LA TOXINA DEL VENENO DE LA ARAÑA <u>LATRODECTUS</u>	"	49
7. DISCUSION DE RESULTADOS - CONCLUSIONES.....	"	61
8. BIBLIOGRAFIA.....	"	65

P R O L O G O

Los resultados experimentales que se exponen en este trabajo relativos a la purificación química del veneno de la araña del género Latrodectus son parte de un programa de investigaciones sobre diversos aspectos de este arácnido no aclarados aún.

Este programa que fuera diseñado, organizado y dirigido por el Dr. Ignacio PIROSKY fué desarrollado por un equipo integrado por los doctores ABALOS J.W., SCAVINI L.M., FERRARESI R.W., y los estudios respectivos fueron realizados en el Instituto Nacional de Microbiología y en la provincia de Santiago del Estero desde fines del año 1960 hasta abril de 1962.

En una comunicación presentada al Congreso de "Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Area", - PIROSKY y ABALOS (1961) informan sobre algunas particularidades del citado programa. Los párrafos que nos permitimos transcribir ilustran al respecto.

"La fauna de arañas de la Argentina comprende alrededor de 400 especies. Pero cabe destacar que Latrodectus mactans y curacaviensis son las dos especies que definitivamente figuran como causantes de incidentes serios y mortales en el hombre en la Argentina.

"El conlejo mactans-curacaviensis se lo encuentra en todo el territorio de la Argentina, desde el límite norte hasta Tierra del Fuego en el extremo sur.

II.//.

"En la provincia de Santiago del Estero, existen muchos sitios de excelentes criaderos naturales de Latrodectus. Las arañas se encuentran en gran número en las palmas de los cactus, Opuntia - quimili, donde ellas tejen su malla irregular de tan resistentes filamentos. Estos campos de cactus a menudo se extienden sobre centenares de hectáreas despobladas y las arañas se multiplican por decenas de millares. También se las encuentra en la superficie de la tierra, alojadas en cuevas abandonadas de armadillo (Disipodidae). Frecuentemente se las encuentra en áreas domésticas alojadas en pilas de ladrillos o de leña y entre plantas del jardín. Localmente son conocidas con los nombres de "araña del rastrojo", "araña del lino", "araña pequeña copa colorada" y "araña coral".

"Estas arañas se encuentran generalmente en el perímetro doméstico. Frecuentemente los trabajadores son víctimas cuando cosechan trigo y lino.-

Este año hemos planeado coleccionar 100.000 (cien mil) ejemplares de Latrodectus en Santiago del Estero.

"El Dr. ABALOS se halla trabajando para determinar los medios para una apropiada identificación de las especies del género. Este estudio involucra la morfología, sistemática, hábitos, comportamiento en la cautividad y las diferencias en cada uno de los estadios del ciclo vital.

"Los otros miembros del equipo tienen a su cargo el estudio de la naturaleza química del veneno y diversos problemas inmunológicos e inmunoquímicos."

Por mi parte, no puedo ocultar mi íntima satisfacción

II//

por las condiciones excepcionalmente favorables que se me ofrecía para iniciarme en la investigación científica sobre un tema original y de tanto interés como es la purificación química del veneno de la araña del género Latrodectus de nuestro país. Un material único, por su calidad y abundancia, un asesoramiento y un instrumental y equipo científico del más alto nivel; me dieron fundamento y aliento para intentar la separación y purificación del factor tóxico del veneno de este arácnido.

Este problema de la araña del género Latrodectus, citado ya por Aristóteles (tomado de ROBERT 1901) por la gravedad del accidente producido por su picadura en el hombre, toma particular vigencia a comienzos de este siglo cuando SCHERBINA (1903) demuestra el valor antigénico del veneno de la araña Kara-Kurt (Latrodectus-tredecimguttatus) obteniendo por inmunización de un camello un suero del cual 0.1 de mililitro protege al ratón blanco contra 2 dosis letales mínimas.

El género Latrodectus se halla ampliamente difundido en el mundo, y se lo encuentra en todo el continente americano, en Sud Africa, Australia, Sur de Europa y en el Cáucaso.-

El accidente provocado por la picadura de este arácnido en el hombre determina un síndrome neurotóxico de un dramatismo inusitado con contracturas y espasmos musculares y una mortalidad que oscila entre el 5 y el 10 por ciento, no habiéndose encontrado fármaco que calme esos dolores.

En el sitio de la picadura solo se observa la puntura determinada por los quelíceros de la araña. Frecuentemente este -

III//

III//

sitio de la picadura ni puede ser localizado.

Entre el momento de la picadura y los primeros síntomas transcurre un tiempo variable entre pocos minutos y una hora.

El cuadro clínico se caracteriza por espasmos y contracturas musculares generalizados de gran intensidad, por una opresión precordial con sensación de muerte, profusa transpiración, temperatura, hipertensión con discreta leucocitosis.

El Dr. BLAIR (1934) quien se ha hecho picar experimentalmente por una Latrodectus a los fines de un prolijo estudio clínico, manifiesta en su publicación que debiera completar dicho estudio, pero que no se atrevía a un segundo ensayo porque la araña -- Latrodectus era peligrosamente tóxica para el hombre. El médico que asistió al Dr. BLAIR en dicha experiencia declara que el dolor provocado por la picadura de esta araña era el más "abyecto" que había tenido oportunidad de observar.

Las contracturas musculares son en algunos casos de tal intensidad, que el cuadro clínico puede confundirse con un tétanos o una peritonitis aguda.

La acción farmacológica de este veneno se realiza por intermedio del sistema nervioso central. Los registros electroencefalográficos en animales de laboratorio han demostrado un aumento de la actividad del cerebro, con aparición de ondas de mayor amplitud y frecuencia. Las contracturas y espasmos musculares se manifiestan aún en los animales descebrados mientras mantengan su médula intacta. En cambio dichas contracciones no se manifiestan en la pata desnervada de un animal completo no obstante ha-

IV///

IV//

llarse dicha pata conectada con todo el organismo por la circulación sanguínea. SAMPAYO (1942). TROISE (1928) - (1929).

No se ha encontrado un fármaco que calme los intensos dolores provocados en el hombre por la picadura de la araña Latrodectus.

Se han ensayado 75 medicamentos sintomáticos inclusive la morfina sin ningún resultado. BOGEN (1926)

Diversos autores han obtenido por inmunización de animales de laboratorio suero antivieno Latrodectus, solo para uso experimental.

KONSTANSOFF (1906) inmuniza un camello con extractos de cefalotórax de Latrodectus tredecimguttatus, obteniéndose un suero del cual 0.01 de mililitro protege al ratón blanco contra 5 dosis letales mínimas del veneno. HOUSSAY y NEGRETE (1919), PROISE (1928) BOGEN (1926), D'AMOUR (1936) y FINALYSON (1937) obtienen suero antitóxico por inmunización de conejos u otros animales de laboratorio del cual 0.05 y 0.2 mililitros protege al ratón blanco contra 2 a 10 D.L.M.

MAXIANOVICH (1938) por inmunización de un equino, obtiene un suero del cual 2 mililitros protegen al cavia contra la picadura de 3 arañas kara-kurt (Latrodectus tredecimguttatus).

PIROSKY (1942) obtiene por hiperinmunización de equinos un suero antitóxico específico que purifica y concentra por digestión enzimática y termocoagulación diferencial. Un mililitro de esta antitoxina protege contra 3.000 DL₅₀ en el ratón blanco y no protege contra una dosis letal mínima de Cetanus negriven-

V//

V//

ter ni de Lycosa raptoris.

Desde entonces, año 1942, el Instituto Nacional de Microbiología produce la antitoxina purificada y concentrada anti-Latroectus, en forma sistemática y en gran escala. La administración por vía intramuscular de 2 mililitros de esta antitoxina a numerosos pacientes afectados por Latroectus, ha demostrado sin excepción un efecto terapéutico de eficacia espectacular. La recuperación se inicia a la media hora de su administración y la recuperación total del paciente se produce dentro de las tres horas.

Aquí corresponde destacar un hecho de indudable interés, y que pone en evidencia la importancia que tiene el conocimiento de la estructura química del veneno Latroectus. Contrariamente a otras toxinas que también actúan por intermedio del sistema nervioso central, como la tóxina tetánica cuya combinación con el tejido nervioso es difícilmente desplazable por la antitoxina específica, la tóxina Latroectus es desplazada fácilmente del sistema nervioso central por la antitoxina específica, como lo demuestra el efecto terapéutico en pacientes con gran síndrome neurotóxico. Esto pone en evidencia la labilidad de la combinación de la toxina con el sistema nervioso central. Esta mayor avidez de la tóxina Latroectus por la antitoxina específica que por el sistema nervioso central, es un problema inmunológico que interesa estudiar.

Los resultados experimentales que presentamos en esta Tesis, los consideramos de interés científico por cuanto esta-

VI//

blecen las bases metodológicas para la prosecución de estos estudios. Por otra parte cabe destacar que son los primeros aportes que sobre el tema figuran en la literatura científica mundial.

En efecto, la cuidadosa compulsión bibliográfica a nuestro alcance no nos permitió encontrar ningún trabajo sobre el tema - motivo de esta Tesis.

Agradecemos al Profesor B.A. HOUSSAY el habernos permitido consultar su tan completo fichero particular sobre todo lo relativo a los arácnidos. Esta tarea fué realizada en colaboración con el Dr. FERRARESI R.

Al Dr. J.W. ABALOS, quien desde hace más de veinte años estudia con su particular vocación la bio-ecología de los arácnidos y otros animales ponzoñosos, nuestro agradecimiento por el empeño y el cuidado puesto en el envío del material que ha hecho posible este estudio.

Agradecemos al Dr. I. PIROSKY el honor que nos dispensa al acompañarnos como padrino de esta Tesis, por sus críticas y enseñanzas y su constante colaboración durante la realización de este trabajo.

Al Dr. César MILSTEIN nuestro agradecimiento por su asesoramiento técnico.

A los Doctores GUAGNINI O. y GUATELLI M.A., mi reconocimiento por las críticas formuladas para la mejor confección del texto.-

CAPITULO I

MATERIAL DE ESTUDIO

Para la realización de estas investigaciones hemos utilizado un total de 2.000 glándulas de la araña *Latrodectus*.

Estas glándulas fueron obtenidas de arañas recolectadas exclusivamente en el territorio de la Provincia de Santiago del Estero, República Argentina. La recolección de las arañas, así como la separación de las glándulas contenidas en los quelíceros y el envío de las mismas en forma adecuada, periódica e ininterrumpida al Instituto Nacional de Microbiología de Buenos Aires, fue organizada y supervisada por el Dr. Jorge G. Abalos, a cargo del Instituto de Animales Venenosos de la provincia antes citada y en calidad de Idénico Científico del Instituto Nacional de Microbiología.

Las glándulas, a medida que eran separadas de los quelíceros fueron conservadas a -20°C . El envío de dicho material a nuestro Instituto se hacía por vía aérea en forma tal que llegaba a destino en pocas horas. Cada remesa estaba constituida por 500 glándulas aproximadamente, dispuestas en tubo de vidrio con tapón lacrado. Inmediatamente de recibidas eran conservadas

2...

en desecador con cloruro de calcio al vacío en cámara fría a 4°C.

Las glándulas así conservadas tenían un peso promedio de 170 (cien) miligramos por glándula (Dato obtenido por repetidas pesadas con 100 glándulas por pesada).

La solución de veneno se obtuvo por trituración de glándulas en mortero y extracción con buffer. En general se trabajó con soluciones de veneno de una concentración de 10 miligramos de glándulas por mililitro de solvente.

De los solventes ensayados para la extracción del veneno contenido en las glándulas -buffer de fosfato o de acetato con diferente molaridad y pH- se adoptó el ácido acético - acetato de sodio pH 6.5 y 0.01 molar.

Para cada experiencia se preparó una solución de veneno ad hoc, que se utilizó en el aso previa centrifugación a 4°C a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos.

3...

CAPITULO 2EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TOXICIDAD DELVENENO DE LA ARANA LATROPHESTUS

Con el propósito de conocer la sensibilidad térmica del veneno de la araña Latrodectus, se realizaron los ensayos que a continuación se detallan.

Materiales:a) Obtención del veneno.

Cientos miligramos de glándulas fueron extraídas con 20 mililitros de buffer de ácido acético - acetato de sodio de pH 6.5 y 0.01 M.; la extracción se realizó por trituración en mortero, separando el sobrenadante por centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 3000 rpm. El precipitado se somete a una segunda extracción con nueva cantidad de buffer cuyo sobrenadante, previa separación por centrifugación se añade al primero, completándose la solución obtenida a un total de 66 mililitros con la misma solución buffer. La concentración final de la solución de veneno fue de 9 miligramos de glándula por mililitro.

b) Acción de la temperatura.

De la solución de veneno así obtenida se distribuyeron 3 mililitros en diferentes tubos de Wassermann colocando un tubo

en cada baño se preparaba ad hoc, de modo tal que el contenido del tubo estuviese a nivel del agua del baño. Se estudió el efecto producido por las temperaturas de -76°C , de -14°C , y de 4 , 12 , 25 , 45 , 50 , 55 , y 60°C durante 2 minutos.

a) Inactivación.

El efecto de las distintas temperaturas se midió por la inactivación al ratón blanco por vía venosa de un volumen constante de 0.5 mililitros de las diferentes diluciones preparadas a partir de cada una de las muestras estudiadas. Los ensayos se hicieron por duplicado.

b) Resultados.

La dosis letal mínima (D.L.M.) de la solución original fue de 35 gramos en peso de glándulas. Ver tabla N° 1, por secciones a y b. No hubo variación apreciable de la dosis letal mínima por efecto de temperaturas comprendidas entre -14 y 25° ; a 45°C la D.L.M. fue de 40 ± 45 gramos , a 50°C la dosis letal mínima fue de 50 a 60 gramos, a 55°C fue de 50 a 70 gramos y a 60°C la dosis letal mínima fue superior a 170 gramos. Ver Tablas N° 2, 3, 4, 5, 6, y 7, y GRÁF. N° 1

En la tabla N° 8 puede verse el efecto de una temperatura de -76°C con la subsiguiente deshidratación por liofilización. Esta última operación fue realizada a una presión de 50 micrones en cuatro horas. El producto de secado obtenido fue redisolto en el buffer ácido acético - acetato de sodio pH 6.5 y 0.01 M , en estas condiciones la D.L.M. pasó de 35 gramos a 40 gramos en un

5...

ensayo y 50 gramos en otro. A -76°C y deshidratación por liofilización se produce una pérdida de la toxicidad de un 15 por ciento. Estas experiencias demuestran que el factor tóxico del veneno de la araña *Latrodectus* es termolábil, pues se destruye a 6°C .

6...

ACCIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE EL VENENODOSIS LETAL MÍNIMA DE VENENO N°1

SOLUCIÓN STANDARD DE VENENO = 9 mg/ml.

1 ml SOLUCIÓN STANDARD + 9 ml SOL FISIOLÓGICA	SOL FISIOLÓGICA HASTA 25 ml	LAUCHAS 3 / dosis	OBSERVACIONES				
			1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	4/T
0.10	2.40	cabeza	o	o	o	o	0/3
0.15	2.35	lomo	o	o	o	o	0/3
0.20	2.30	cola	1+	1+	o	o	2/3
0.25	2.25	pata derecha	o	3+	o	o	3/3
0.30	2.20	pata izquierda	2+	1+	o	o	3/3
0.40	2.10	blanca	3+	o	o	o	3/3

D.L.M = 35 mg.

DOSIS LETAL MÍNIMA DE VENENO N°2

SOLUCIÓN STANDARD DE VENENO = 9 mg/ml.

1 ml SOLUCIÓN STANDARD + 9 ml SOL FISIOLÓGICA	SOL FISIOLÓGICA HASTA 25 ml	LAUCHAS 3 / dosis	OBSERVACIONES				
			1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	4/T
0.10	2.40	cabeza	o	o	o	o	0/3
0.15	2.35	lomo	o	o	o	o	0/3
0.20	2.30	cola	1+	2+	o	o	3/3
0.25	2.25	pata derecha	1+	1+	o	o	2/3
0.30	2.20	blanca	3+	o	o	o	3/3

D.L.M = 35 mg.

Serie No. 1:

Determinación de la dosis letal mínima (D.L.M.) de la solución original de veneno *Leurodoctus*. La solución standard de veneno preparada para estos ensayos contiene 9 mg. de plásmas/ml o como es decir, de 35 raras.

La inoculación se hizo de 0.5 ml. de cada solución al ratón blanco de 1 - 2 meses. vía intravenosa.

VENENO N°1 : TEMPERATURA : -14°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiológ.	sol. fisiol. a 2.5 ml.	Lauchas 3/dosis	Observaciones				
			1º día	2º día	3º día	4º día	4/T
0.15	2.35	cabeza	0	1+	0	0	1/3
0.20	2.30	lomo	1+	1+	0	0	2/3
0.30	2.20	cola	2+	1+	0	0	3/3
0.40	2.10	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 358

VENENO N°1 : TEMPERATURA : +4°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiológ.	sol. fisiol. a 2.5 ml.	Lauchas 3/dosis	Observaciones				
			1º día	2º día	3º día	4º día	4/T
0.20	2.30	cabeza	0	1+	0	0	1/3
0.30	2.20	lomo	1+	1+	0	0	2/3
0.40	2.10	cola	2+	1+	0	0	3/3
0.50	2.00	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 40 Mg.

VENENO N°1 : TEMPERATURA : +10°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiológ.	sol. fisiol. a 2.5 ml.	Lauchas 3/dosis	Observaciones				
			1º día	2º día	3º día	4º día	4/T
0.20	2.30	cabeza	1+	0	0	0	1/3
0.30	2.20	lomo	2+	0	0	0	2/3
	2.10	cola	3+	0	0	0	3/3
	2.00	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 40 Mg.

VENENO N°2 : TEMPERATURA : -14°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiológ.	sol. fisiol. a 2.5 ml.	Lauchas 3/dosis	Observaciones				
			1º día	2º día	3º día	4º día	4/T
0.15	2.35	cabeza	1+	0	0	0	1/3
0.20	2.30	lomo	1+	2+	0	0	3/3
0.30	2.20	cola	3+	0	0	0	3/3
0.40	2.10	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 35 Mg.

VENENO N°2 : TEMPERATURA : +4°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiológ.	sol. fisiol. a 2.5 ml.	Lauchas 3/dosis	Observaciones				
			1º día	2º día	3º día	4º día	4/T
0.15	2.35	cabeza	1+	0	0	0	1/3
0.20	2.30	lomo	1+	1+	0	0	2/3
0.30	2.20	cola	2+	1+	0	0	3/3
0.40	2.10	pata derecha	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 35 Mg.

VENENO N°2 : TEMPERATURA : +10°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiológ.	sol. fisiol. a 2.5 ml.	Lauchas 3/dosis	Observaciones				
			1º día	2º día	3º día	4º día	4/T
0.20	2.30	cabeza	0	1+	0	0	1/3
0.30	2.20	lomo	2+	0	0	0	2/3
0.40	2.10	pata derecha	2+	1+	0	0	3/3
0.50	2.00	pata izquierda	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 40 Mg.

Tabla N° 2

Determinación de la dosis total mínima (D.T.M.) de la actividad de veneno introducida sorbita durante 24 a temperatura de -14°C, 0°C y 10°C.

La inoculación fue de 2.5 ml. de cada dilución al ratón blanco de 25 - 30 grs. vía intravenosa.

VEHENO N°1 TEMPERATURA +35°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5ml	Lanchas 3/Basis	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	+/T
0.10	2.40	cabeza	0	0	0	0	0/3
0.15	2.35	lomo	0	0	0	0	0/3
0.20	2.30	cola	1+	2+	0	0	2/3
0.25	2.25	pata derecha	2+	1+	0	0	2/3
0.30	2.20	pata izquierda	3+	0	0	0	3/3
0.35	2.15	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M = 35/Mg.

VEHENO N°2 : TEMPERATURA +35°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5ml	Lanchas 3/Basis	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	+/T
0.10	2.40	cabeza	0	0	0	0	0/3
0.15	2.36	lomo	0	1+	0	0	1/3
0.20	2.30	cola	2+	0	0	0	2/3
0.25	2.25	pata derecha	2+	1+	0	0	2/3
0.30	2.20	pata izquierda	3+	0	0	0	3/3
0.35	2.15	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M = 35/Mg.

Tabla No. 14

Observación de la dosis letal mínima (D.L.M.) de la solución de toxina botulínica sometida a una temperatura de 35°C durante 24 horas.

La inoculación fue de 0.3 ml. de cada dilución al ratón blanco de 15 - 20 grs. vía intravenosa, observándose durante los tres días.

VENENO N°1 : TEMPERATURA +45°C

1 ml. sol. standard + 9 ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5 ml.	Lechea 3/ Dosis	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	+/T
0 10	2 40	cabeza	o	o	o	o	0/3
0 15	2 35	lomo	o	o	o	o	0/3
0 20	2 30	cola	2+	1+	o	o	3/3
0 25	2 25	pata derecha	3+	o	o	o	3/3
0 30	2 20	pata izquierda	3+	o	o	o	3/3
0 35	2 15	blanca	3+	o	o	o	3/3

D.L.M = 40 Mg.

VENENO N°2 : TEMPERATURA +45°C

1 ml. sol. standard + 9 ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5 ml.	Lechea 3/ Dosis	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	+/T
0 05	2 45	cabeza	o	o	o	o	0/3
0 10	2 40	lomo	o	o	o	o	0/3
0 20	2 30	cola	2+	o	o	o	2/3
0 25	2 25	pata derecha	2+	1+	o	o	3/3
0 30	2 20	pata izquierda	3+	o	o	o	3/3
0 35	2 15	blanca	3+	o	o	o	3/3

D.L.M = 45 Mg.

Tabla N° 1

Se determinó el efecto de la dosis letal (D.L.M) del veneno administrado a una temperatura de 45°C durante 24 horas. La dosis letal fue de 40 Mg. de cada dilución al ratón blanco de 20 g. de peso. La letalidad fue determinada durante un periodo de 24 horas.

VENENO N°1 TEMPERATURA +50°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5ml ³ /Dosis	Lanchas	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	+T
0.05	2.45	cabeza	0	0	0	0	0/3
0.10	2.40	lomo	0	0	0	0	0/3
0.15	2.35	cola	0	0	0	0	0/3
0.20	2.30	pata derecha	0	1+	0	0	1/3
0.25	2.25	pata izquierda	2+	0	1+	0	3/3
0.30	2.20	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 50 Mg.

VENENO N°2 : TEMPERATURA +50°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5ml ³ /Dosis	Lanchas	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	+T
0.05	2.45	cabeza	0	0	0	0	0/3
0.10	2.40	lomo	0	0	0	0	0/3
0.15	2.35	cola	0	0	0	0	0/3
0.20	2.30	pata derecha	0	0	0	0	0/3
0.25	2.25	pata izquierda	0	0	0	0	0/3
0.30	2.20	blanca	2+	0	0	0	2/3

D.L.M. = 60 Mg.

Resultados:

Se determinó la dosis letal (D.L.M.) de veneno al aplicar en un laboratorio a 50°C durante 24 horas, a un grupo de ratas, un extracto de ratón blanco de 100 mg. de la toxina, observándose muerte dentro de 4 días.

VENENO N°1 · TEMPERATURA ±55°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiol.	sol. fisiol. a 2.5ml.	Leuchas 3/basis	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	+/-
0 10	2 40	cabeza	0	0	0	0	0/3
0 15	2 35	lomo	0	0	0	0	0/3
0 20	2 30	cola	1+	1+	0	0	2/3
0 30	2 20	pata derecha	3+	0	0	0	3/3
0 35	2 15	pata izquierda	3+	0	0	0	3/3
0 40	2 10	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M = 50 Mg.

VENENO N°2 : TEMPERATURA ±55°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5ml.	Leuchas 3/basis	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	+/-
0 10	2 40	cabeza	0	0	0	0	0/3
0 15	2 35	lomo	0	0	0	0	0/3
0 20	2 30	cola	0	0	0	0	0/3
0 25	2 25	pata derecha	0	0	0	0	0/3
0 30	2 20	pata izquierda	0	0	0	0	0/3
0 35	2 15	blanca	2+	0	0	0	2/3

D.L.M = 70 Mg.

Tabla N° 6:

Determinación de la dosis letal (D.L.M.) de veneno *Callosiphum unguiculatum* a una temperatura de 55°C durante 20'.
La inoculación fue de 0,5 ml. de cada dilución al ratón blanco de 18 - 20 g. vía intravenosa.

VENENO N°1 TEMPERATURA +60°C

1ml. de sol. standard + 9ml. de sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5ml.	Lanchas 3/Dosis	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	5°
0 15	2 35	cabeza	0	0	0	0	0/3
0 20	2 30	lomo	0	0	0	0	0/3
0 30	2 20	cola	0	0	0	0	0/3
0 35	2 15	pata derecha	0	0	0	0	0/3
0 45	2 05	pata izquierda	0	0	0	0	0/3
0 50	2 00	blanca	0	0	0	0	0/3

D.L.M. -

VENENO N°2 : TEMPERATURA +60°C

1ml. sol. standard + 9ml. sol. fisiol.	sol. fisiol. a 2.5ml	Lanchas 3/Dosis	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	5°
0 15	2 35	cabeza	0	0	0	0	0/3
0 20	2 30	lomo	0	0	0	0	0/3
0 30	2 20	cola	0	0	0	0	0/3
0 40	2 10	pata derecha	0	0	0	0	0/3
0 50	2 00	pata izquierda	0	0	0	0	0/3
0 60	1 40	blanca	0	0	0	0	0/3

D.L.M. -

Tabla N° 2

Observación de la lesión local producida... de la...
... a temperatura de 60°C...
...

La intensidad de la... de cada... al... el...
... via intravenosa.

ACCIÓN DE LA LIOFILIZACIÓN

DOSIS LETAL MINIMA DE VENENO N°1

SOLUCIÓN STANDARD DE VENENO = 5mg/ml.

1ml. sol. standard + 4ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5ml ³ /dosis	Lanchas	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	⁺ /r
0 10	2 40	cabeza	0	0	0	0	0/3
0 15	2 35	lomo	0	0	0	0	0/3
0 20	2 30	cola	0	1+	0	0	1/3
0 25	2 25	pata derecha	2+	0	0	0	2/3
0 30	2 20	pata izquierda	2+	1+	0	0	3/3
0 35	2 15	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 50 Mg.

DOSIS LETAL MINIMA DE VENENO N°2

SOLUCIÓN STANDARD DE VENENO = 5mg/ml.

1ml. sol. standard + 4ml. sol. fisiol.	sol. fis. a 2.5ml ³ /dosis	Lanchas	Observaciones				
			1°	2°	3°	4°	⁺ /r
0 10	2 40	cabeza	0	0	0	0	0/3
0 15	2 35	lomo	0	0	0	0	0/3
0 20	2 30	cola	1+	1+	0	0	2/3
0 25	2 25	pata derecha	2+	1+	0	0	3/3
0 30	2 20	pata izquierda	3+	0	0	0	3/3
0 35	2 15	blanca	3+	0	0	0	3/3

D.L.M. = 40γ

Resultados

Se determinó la dosis letal mínima (D.L.M.) de la sustancia en estudio a una temperatura de -70°C durante 24 y 48 horas para ser liofilizada.

Se encontró que la D.L.M. de esta sustancia al ratón blanco es de 50 mg. y 40γ respectivamente.

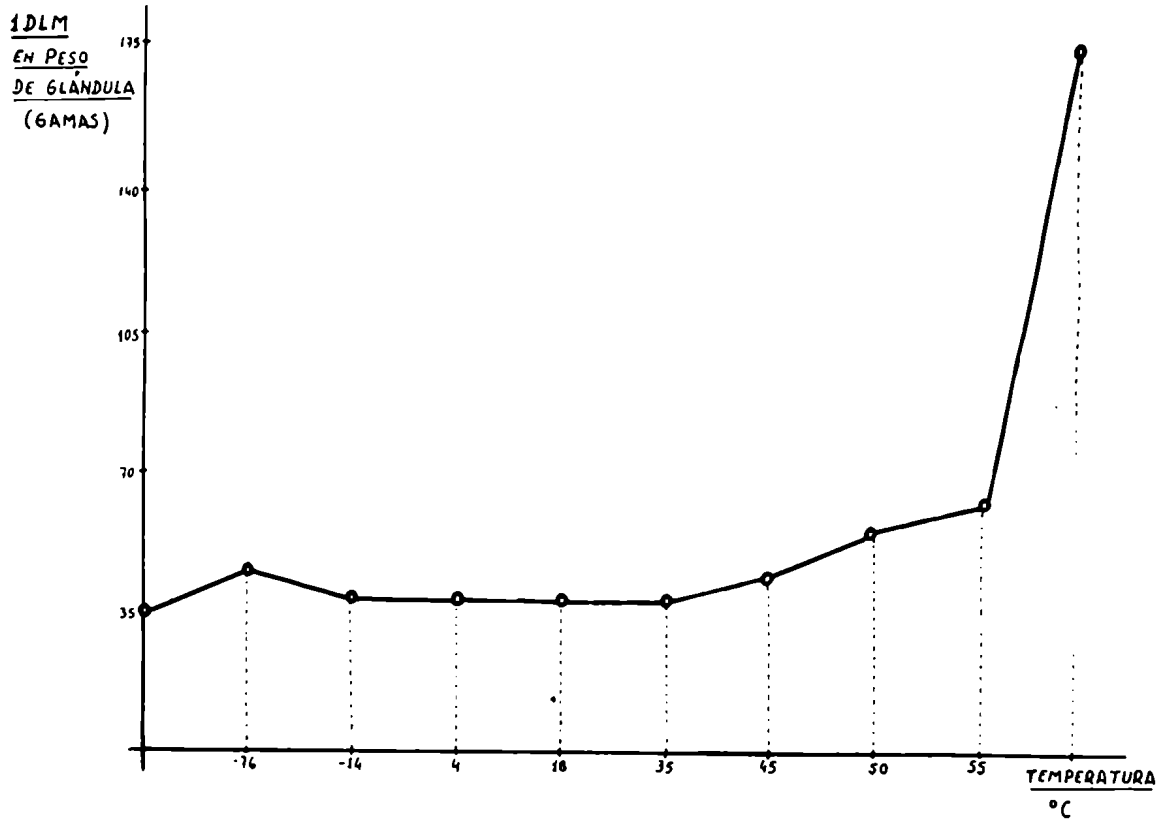


Gráfico N°1.- Acción de la temperatura sobre la toxicidad del veneno de la araña Latrodectus, expresada en peso de glándulas para una dosis letal mínima.-

CAPITULO IFRACCIONAMIENTO DEL VENENO DE LA ARaña LATRODORUMCON PRECIPITACION SALINA

ENRIK y col. (1959), fraccionan el veneno Latrodorus laqueus por medio de sulfato de amonio. La fracción precipitada entre el 40 y 50 por ciento de saturación contenía la mayor actividad tóxica, separando al mismo tiempo una enzima proteolítica, la proteasa. La fracción precipitada entre 70 y 80 por ciento de saturación permitía aislar una segunda enzima, la coagulasa.

Por nuestra parte estudiamos el fraccionamiento del veneno de la araña Latrodorus por acción del sulfato de amonio sólido y de la solución saturada de la misma sal.

Materialesa) Obtención de la solución de veneno.

Se pesaron 10 miligramos de glándulas que fueron extraídas con solución de buffer de ácido acético - acetato de sodio de pH 6.5 y 0.01 M. La extracción fue realizada por trituración en mortero con 2 mililitros de buffer separando el sobrenadante por centrifugación a 4°C a 3000 r.p.m. durante 30 minutos. El sedimento fue extraído por segunda vez en las

nimas condiciones, procediéndose antes sobrenadantes y completando a un volumen de 12 mililitros. La D.L. de esta solución fue de 5 microlitros, esto es 20 veces en peso de glándulas.

b) Fraccionamiento por sulfato de amonio sólido.

1ª precipitación:

A 8 mililitros de la solución de veneno se añade 352 miligramos de sulfato de amonio sólido pro análisis Merck, para una concentración del 20 por ciento de saturación. La sal fue añadida en pequeñas porciones con agitación, manteniéndose la mezcla una hora a 0°C. Se centrifuga a 4°C, 1000 rpm. durante 3 minutos y se obtiene un precipitado y un sobrenadante.

El precipitado se disuelve en 1 mililitro del buffer de acetato y se dializa frente al mismo buffer con agitador magnético en cámara fría a 4°C durante 48 horas, cambiándose el líquido de diálisis cada 6 horas hasta ausencia en el líquido de diálisis del catión amonio por reactivo de Nessler y del anión sulfato por cloruro de bario; el dializado se completa a un volumen de 2 mililitros para su valoración espectrofotométrica del contenido en proteínas y su toxicidad por inoculación al ratón blanco por vía intravenosa expresada en dosis letales mínimas (L.D.₅₀).

2ª precipitación:

Al líquido sobrenadante anterior se añade 120 miligramos de sulfato de amonio pro análisis para alcanzar una saturación del 40 por ciento, procediéndose de igual modo que el descrito más arriba. Se obtiene nuevamente un precipitado y un sobrenadante.

dante.

El precipitado se disuelve como en el caso anterior en 1 mililitro de buffer, se dializa y se lleva a un volumen de hasta 2 mililitros para la valoración de proteínas y toxicidad.

3.º precipitación

Al líquido sobrenadante se añade 157 miligramos de sulfato de amonio para alcanzar una saturación del 50 por ciento. Después de una hora a 0°C, se centrifuga en las condiciones ya señaladas, separándose por tercera vez un precipitado y un sobrenadante. Este tercer precipitado se disuelve y se dializa y completa a volumen de 2 mililitros para su valoración. Las cantidades de sulfato de amonio corresponden a las indicadas en la tabla elaborada por OMAZ y col. (1957).

4.º precipitación

El tercer sobrenadante así obtenido se añade 152 miligramos de sulfato de amonio para alcanzar una saturación del 50 por ciento. El precipitado se disuelve, se dializa y se completa a volumen hasta 2 mililitros. Al sobrenadante se agrega sulfato de amonio hasta 70 por ciento de saturación.

Resultados:

Las tablas N.º 12 y N.º 13 corresponden a los protocolos de la determinación de la D.L.T. de cada uno de los precipitados obtenidos. La tabla N.º 14 correlaciona la concentración de proteínas en valores espectrofotométricos a 280m μ y 260m μ de cada uno de los precipitados. Estos valores se dan en soluciones diluidas y en soluciones sin diluir o total (estos si-

El peso en gramos X a ser añadido a 100 mililitros de una solución de saturación S_1 para producir una solución de saturación S_2 puede calcularse de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$X = \frac{100 \times (S_2 - S_1)}{1 - \frac{S_2}{100}}$$

Los valores correspondientes a esta fórmula se hallan consignados en la tabla siguiente: NISHIZAKI (1954)

Grados de temperatura..	0°	10°	20°	25°	30°
Moles de sulfato de amonio en mil gr. de agua.....	5.35	5.53	5.73	5.82	5.91
Gramos de sulfato de amonio en mil gramos de agua.....	706.95	730.73	757.16	769.05	780.95
X en peso.....	41.42	42.22	43.09	43.47	43.95
Gramos en sulfato de amonio en mil mililitros de agua.....	514.72	525.05	536.34	541.24	545.38
Moles de sulfato de amonio en mil mililitros de agua.....	3.96	3.97	4.06	4.10	4.13
Gramos de sulfato de amonio a añadir en mil mililitros de agua (C).....	706.86	730.53	755.82	766.80	777.55
Volumen específico aparente en solución saturada (V).....	0.5262	0.5357	0.5414	0.5435	0.5453
$\frac{V_0}{100}$	0.271	0.281	0.280	0.294	0.298

La D.L.M. de la solución original es de 5 microlitros, siendo la D.L.M. de las fracciones arriba citadas de 70, 25, y 40 microlitros respectivamente. Si estos valores se expresan en peso de glicofila, la D.L.M. de la solución original es de 40 gramos, y de 560, 160, 160 y 320 gramos las diferentes fracciones estudiadas.

En la Tabla N° 16 se consiguen las correlaciones entre concentraciones de proteínas y la D.L.M. de cada fracción. Si consideramos el valor D.L.M. x ΔE_{280} como índice de pureza y lo dividimos al contenido en D.L.M. de la solución original y el valor 1 como factor de su pureza, puede verse que el fraccionamiento del veneno de la araña *Latrodectus* por solución saturada de sulfato de amonio permite obtener una fracción entre 50 y 60 por ciento de saturación con un rendimiento en D.L.M. del 32.4 por ciento y un índice de pureza de 0.85 y una segunda fracción entre 60 y 70 por ciento de saturación con un rendimiento en D.L.M. del 12 por ciento y una pureza de 1.5 .

En la figura N° 2 se hallan graficados estos resultados.

PRECIPITACIÓN DEL VENENO CON
SULFATO de AMONIO

ENTRE 40-50% DE SATURACIÓN

Precipitado org. nel + 2ml. buffer	Completo a 3.5 ml.	Laucho 3/dosis	Observaciones			
			1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
0.10	2.40	cabeza	1+	0	0	0
0.20	2.30	lomo	2+	0	0	0
0.30	2.20	cola	2+	1+	0	0
0.40	2.10	pata derecha	3+	0	0	0
0.50	2.00	pata izquierda	3+	0	0	0

D.L.M. = 20 MC.

PRECIPITACIÓN DEL VENENO CON
SULFATO de AMONIO

ENTRE 0-30% DE SATURACIÓN

Precipitado + 2 ml. buffer	Completo a 2.5 ml.	Laucho 3/dosis	Observaciones			
			1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
0.10	2.40	cabeza				1-
0.20	2.30	lomo	0	0	0	1-
0.30	2.20	cola	0	0	0	1/2
0.40	2.10	pata derecha	0	0	0	0/3
0.50	2.00	pata izquierda	1+	1+	0	3/3

D.L.M. = 100 MC.

ENTRE 50-60% DE SATURACIÓN

Precipitado org. nel + 2 ml. buffer	Completo a 3.5 ml.	Laucho 3/dosis	Observaciones			
			1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
0.10	2.40	pata derecha	0	0	0	0
0.20	2.30	pata izquierda	0	0	0	0
0.30	2.20	blanca	1+	0	0	1/3
0.40	2.10	cabeza	2+	0	0	2/3
0.50	2.00	lomo	2+	1+	0	3/3

D.L.M. = 80 MC.

ENTRE 30-40% DE SATURACIÓN

Precipitado + 2 ml. buffer	Completo a 2.5 ml.	Laucho 3/dosis	Observaciones			
			1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
0.20	2.30	pata derecha	0	0	0	0/3
0.30	2.20	pata izquierda	0	0	0	0/3
0.40	2.10	blanca	1+	1+	0	2/3
0.50	2.00	cabeza	2+	1+	0	3/3
0.60	1.90	lomo	3+	0	0	3/3

D.L.M. = 80 MC.

Observaciones:

La terminación de la dosis letal mínima (D.L.M.) de la molusca de veneno
 bacteriética precipitada entre 30, 40, 40-50 y 50-60% de saturación se obtuvo de
 ensayo añadido en forma sólida. Inoculación de 0.5 ml. de cada dilución al ratón blan-
 co de 10 - 20 grs. vía intravenosa.

ENTRE 60-70% DE SATURACIÓN

precipitado + 2 ml. buffer	Completar ^a 2.5 ml.	Lanchas 3/dosis	Observaciones				
			1:	2:	3:	4:	t/T
0 10	2.40	cabeza	0	0	0	0	0/3
0 20	2.30	lomo	0	0	0	0	0/3
0 30	2.20	cola	1+	1+	0	0	2/3
0 40	2.10	pata derecha	2+	1+	0	0	3/3
0 50	2.00	pata izquierda	3+	0	0	0	3/3

D.L.M = 60 ml.

Tabla 4.3.1

Determinación de la letalidad afina (L.A.) de la infección por virus de la rabia, precipitada entre 60-70% de saturación de la fase de muerte afínida en forma afínida.

Inoculación de 0.5 ml. de cada dilución al ratón blanco de 15-20 gms. vía intravenosa. observaciones durante cuatro días.

PRECIPITACIÓN DEL VENENO DE GLÁNDULAS LATRODECTUS
CON SULFATO DE AMONIO

SATURACIÓN SO ₄ (NH ₄) ₂	ΔE ₂₆₀ diluido	ΔE ₂₆₀ sin diluir	ΔE ₂₆₀ total	Volumen TOTAL	DLM (MC)	DLM ΔE ₂₈₀	Ms total de DLM		
							%	η	
0	0.070	15.00	13.80	2 ml	5	34.50	500	100	1.00
2.50%	0.150	3.20	3.00	2 ml	100	15.00	25	5.0	2.2
5.00%	0.385	1.84	1.70	2 ml	80	68.00	31	6.2	0.5
7.50%	0.105	3.20	2.10	2 ml	20	21.00	125	25	1.6
10.00%	0.102	2.40	2.04	2 ml	80	81.60	31	6.2	0.42
12.50%	0.062	1.20	1.24	2 ml	60	37.20	42	8.5	0.90
15.00% SOPREPASANTE DE 70%	0.138	3.00	2.76	2 ml	-	-	-	-	-

ΔE₂₆₀ : MEDIDA DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS A 260 mμ

ΔE₂₈₀ : MEDIDA DE CONCENTRACIÓN DE NUCLEOPROTEÍNAS A 260 mμ.

DLM : MENOR CANTIDAD DE VENENO EXPRESADO EN (MC) CAPAZ DE PRODUCIR LA MUERTE DEL 50% DE LAS LAUCNAS ANTES DEL 4º DIA.

DLM · ΔE : MENOR CANTIDAD DE UNIDADES A 280 mμ QUE MATA EL 50% DE LAS LAUCNAS

η : RENDIMIENTO

... 12 14

... 12 14
 ... 12 14
 ... 12 14

...

PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO
EN SOLUCIÓN SATURADA

ENTRE 0-40% DE SATURACIÓN

Precipitado orig. ml + 2 ml. buffer	Completo 2.5 ml.	Lanchas 3/dosis	Observaciones			
			1: dia	2: dia	3: dia	4: dia
0.05	2.45	cabeza	0	0	0	0
0.10	2.40	lomo	0	0	0	0
0.15	2.35	cola	0	0	0	0
0.20	2.30	blanca	0	0	0	0
0.35	2.15	pata derecha	2+	0	0	0

VOLUMEN TEÓRICO: 70 ML

ENTRE 40-50% DE SATURACIÓN

Precipitado orig. ml + 2 ml. buffer	Completo 2.5 ml.	Lanchas 3/dosis	Observaciones			
			1: dia	2: dia	3: dia	4: dia
0.05	2.45	cabeza	0	0	1+	0
0.10	2.40	lomo	0	1+	2+	0
0.15	2.35	cola	0	2+	1+	0
0.20	2.30	blanca	0	0	0	0

VOLUMEN TEÓRICO: 20 ML

PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO
EN SOLUCIÓN SATURADA

ENTRE 50-60% DE SATURACIÓN

Precipitado orig. ml + 2 ml. buffer	Completo 2.5 ml.	Lanchas 3 por dosis	Observaciones			
			1: dia	2: dia	3: dia	4: dia
0.05	2.45	cabeza	0	0	0	0
0.10	2.40	lomo	1+	2+	0	0
0.15	2.35	cola	3+	0	0	0
0.20	2.30	pata derecha	3+	0	0	0
0.25	2.25	blanca	3+	0	0	0

VOLUMEN TEÓRICO: 20 ML

ENTRE 60-70% DE SATURACIÓN

Precipitado orig. ml + 2 ml. buffer	Completo 2.5 ml.	Lanchas 3/dosis	Observaciones			
			1: dia	2: dia	3: dia	4: dia
0.05	2.45	cabeza	0	0	0	0
0.10	2.40	lomo	0	0	0	0
0.15	2.35	cola	0	0	0	0
0.20	2.30	pata derecha	2+	1+	0	0

VOLUMEN TEÓRICO: 40 ML

Tabla No. 15:

Intensificación de la actividad expresada en peso total salina (E. . .) de la salinidad en vitreos. Lanchetas precipitadas entre 0-40, 40-50, 50-60 y 60-70% de saturación de sulfato de amonio añadido en forma de solución saturada. Intensificación al ritmo blanco vía intersección 0.5 ml. de cada dilución por animal.

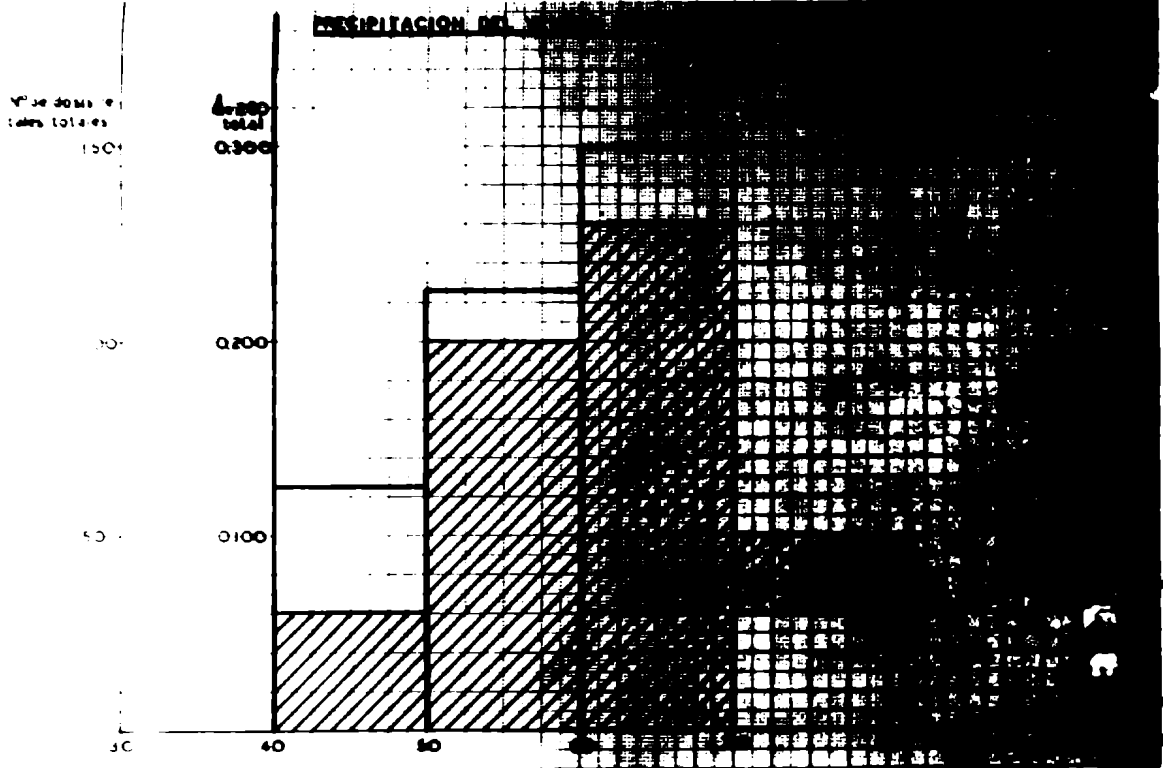


FIGURA 2

EXTRACTO GLANDULAR DEL VENTRO LATO DICTOS
 EN SOLUCION SATURADA.
 EN LA CRAS Y LA
 EN FUNCION DE CANTIDADES
 CORRESPONDIENDO LA PARTE DISE A LOS VALORES

CAPITULO 4FRACCIONAMIENTO DEL VENENO DE LA ARANA LATRODECTUSFOR STADL

"La separación de un componente proteico puro, o grupo de componentes, por extracción fraccionada de un precipitado tiene la ventaja de que el material que permanece insoluble es protegido de los diversos cambios químicos y enzimáticos que ocurren rápidamente en solución. La concentración electrolítica puede ser mantenida en un rango suficientemente bajo, en el cual las interacciones con las proteínas dependen ampliamente de la fuerza iónica y de la propiedad electroquímica específica de la proteína. Las interacciones entre proteínas e iones, así como entre los iones son aumentadas por la adición de agua mezclada con líquidos orgánicos que disminuyen la constante dieléctrica de la solución. Ciertas separaciones pueden ser más efectivamente realizadas en soluciones conteniendo ya sea alcoholes superiores, acetona, diglaxano, éter, alcoholes polihídricos o mezclas de líquidos orgánicos con azúcares o con iones dipolares, tales como glicina, que aumentan la constante dieléctrica de la solución." COHN y col.(1930)

En una serie sucesiva de métodos desarrollados por los au

tores sobre la base de los fundamentos teóricos antes enunciados demuestran la ventaja de separar proteínas en mezclas de etanol-agua de pH, fuerza iónica, temperatura y concentración proteica controlados.

Aplicamos así, la acción de la mezcla etanol-agua a pH, f fuerza iónica y temperatura controlados a la extracción fraccionada del veneno de la araña *Latrodectus*, desarrollando la técnica siguiente:

Modus operandi:

a) Preparación de la solución de veneno.

El veneno se extrajo por trituración de las glándulas en mortero con buffer de ácido acético - acetato de sodio de pH 6.5 y 0.01 molar. La concentración de la solución de veneno utilizada fue de 10 miligramos de glándula por mililitro.

b) Fracionamiento de la solución de veneno.

A 2.25 mililitros de la solución de veneno previamente enfriada a 0°C se agrega con agitación, etanol recientemente destilado y enfriado a 0°C hasta una concentración del 10 por ciento. Se mantiene el sistema 30 minutos a 0°C y se centrifuga a 0°C durante 20 minutos a 4,000 r.p.m.; separado el precipitado es redisolto en agua destilada y liofilizada en el acto como medio de eliminar vestigios de etanol.

Al líquido sobrenadante en las mismas condiciones operativas de temperatura, se agrega etanol frío hasta una concentración del 2% por ciento. Se dejó sedimentar a 0°C durante 30 minutos y

se procedió a la centrifugación como en el caso anterior. El precipitado obtenido es redisolto en agua destilada y liofilizado.

En los pasos sucesivos, cada sobrenadante es tratado sucesivamente con etanol a las concentraciones de 30, 40, 50, 60 y 70 por ciento, en las mismas condiciones arriba descritas, separándose en cada caso el precipitado para su redisolución en agua destilada y subsiguiente liofilización. Ver Tabla # 17

Resultados:

Cada fracción liofilizada de la serie obtenida fue redisolta en buffer de acetato a pH 6.5 y 0.01 M y llevada a un volumen de 2 mililitros. Se valoró concentración en proteínas por lectura espectrofotométrica a 280 y actividad tóxica expresada en dosis letal mínima (D.L.M.) por inoculación al ratón blanco de 18-20 grs. por vía intravenosa.

De las diferentes diluciones preparadas de cada fracción para su valoración se inoculó un volumen de 0.5 mililitros por animal.

En las tablas # 18 y 19 se consignan los protocolos de las valoraciones de la toxicidad.

Como ya se ha dicho la D.L.M. de la solución original de veneno utilizado fue de 5 microlitros correspondiente a 50 gamas en peso de glándula.

La D.L.M. de la fracción obtenida con etanol al 10 por ciento es de 20 microlitros, o sea 200 gamas de peso de glándula; al 20 por ciento es de 40 microlitros y ya entre el 30 por ciento es de 150 microlitros. Entre el 40 y 70 por ciento de concentración de etanol la D.L.M. se halla comprendida entre 160 y 200 mi-

ergo litros.

En la Tabla N° 2 se consignan los valores correspondientes a las fracciones de la solución de veneno obtenidas a las diferentes concentraciones de etanol en lo relativo a concentración de proteínas por lectura espectrofotométrica a ΔE_{280} , ΔE_{260} y ΔE_{280} total resultante del producto del volumen de cada muestra por ΔE , y a continuación el valor D.L.M. x ΔE como índice de pureza. Finalmente, tomando como 100 el total de las D.L.M. de la solución original de veneno y como 1.0 el índice de pureza se indican el rendimiento y la pureza de cada fracción.

La fracción precipitada al 10 por ciento de etanol contiene el 25 por ciento de las dosis letales mínimas con una pureza de 1.3. A las concentraciones crecientes de etanol se produce una pérdida brusca de la toxicidad.

En la figura N° 3 se hallan graficados estos resultados.

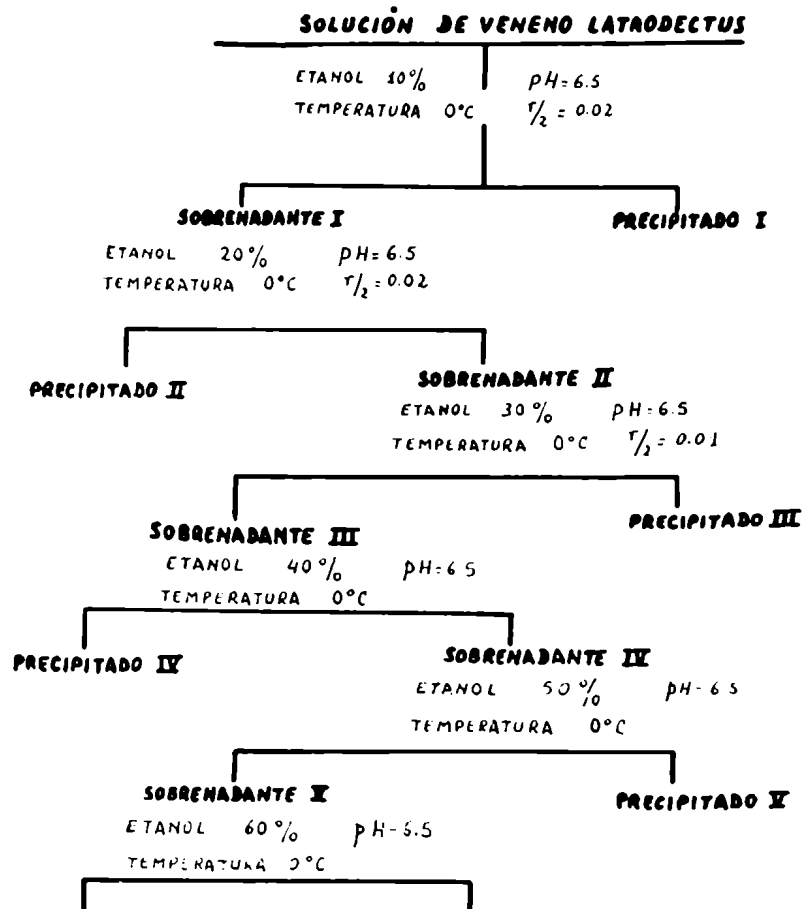


Tabla N°17.- Marcha del fraccionamiento de la solución de veneno de la araña del género Latrodectus por acción del etanol.

PRECIPITACIÓN DEL VENENO LATRODECTUS
MACTANS CON ETANOL a 0°C

ENTRE 20-30%

Precipitado + 2 ml. buffer	Completar Leuchas 2.5 ml. 3/dosis			Observaciones				
	1: dia	2: dia	3: dia	1: dia	2: dia	3: dia	4: dia	5: dia
0.10	cabeza			0	0	0	0	0/3
0.20	lomo			1+	0	0	0	0/3
0.30	cola			2+	0	0	0	0/3
0.50	pata derecha			2+	0	0	0	0/3
0.80	pata izquierda			3+	1+	1+	0	2/3

VOLUMEN TÓXICO : 150 ml

PRECIPITACIÓN DEL VENENO CON
ETANOL a 0°C

ENTRE 0-10%

Precipitado + 2 ml. buffer	Completar Leuchas 2.5 ml. 3/dosis			Observaciones			
	1: dia	2: dia	3: dia	4: dia	5: dia	6: dia	7: dia
0.05	cabeza			0	0	0	0/6
0.10	lomo			1+	0	0	2/5
0.20	cola			2+	0	0	2/3
0.30	pata derecha			2+	0	1+	0 3/3
0.40	pata izquierda			3+	0	0	0 3/3

VOLUMEN TÓXICO : 20 ml

ENTRE 10-20%

Precipitado + 2 ml. buffer	Completar Leuchas 2.5 ml. 3/dosis			Observaciones			
	1: dia	2: dia	3: dia	4: dia	5: dia	6: dia	7: dia
0.05	cabeza			0	0	0	0/6
0.10	lomo			1+	0	0	1/3
0.20	cola			2+	0	0	2/3
0.30	pata derecha			3+	0	0	0 3/3
0.40	pata izquierda			3+	0	0	0 3/3

VOLUMEN TÓXICO : 40 ml

ENTRE 30-40%

Precipitado + 2 ml. buffer	Completar Leuchas 2.5 ml. 3/dosis			Observaciones			
	1: dia	2: dia	3: dia	4: dia	5: dia	6: dia	7: dia
0.30	pata derecha			0	0	0	0/3
0.40	pata izquierda			0	0	0	0/3
0.50	blanca			0	0	0	0/3
0.60	cola			0	1+	1+	0 2/3
0.70	lomo			2+	0	0	0 2/3

VOLUMEN TÓXICO : 60 ml

Tabla No 18.

34

La precipitación de la toxina total (0.10) de 1 vol. cifer e v. n. m. o.
Latrodectus es de 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 por ciento de etanol.

**PRECIPITACIÓN DEL VEHEHO LATRODECTUS
MACTANS CON ETANOL a 0°C.**

ENTRE 40-50 %

Precipitado + 2 ml. buffer	Cantidad a 2.5 ml.	Lanchas 3/dosis	Observaciones				°/T
			1º día	2º día	3º día	4º día	
0 20	2 30	cabeza	o	o	o	o	0/3
0 40	2 10	lomo	o	o	o	o	0/3
0 60	1 90	cola	o	o	o	o	0/3
0 80	1 70	pata derecha	1+	1+	o	o	2/3
0 90	1 60	pata izquierda	2+	o	1+	o	3/3

VOLUMEN TÓXICO - 200 ML

ENTRE 50-60 %

Precipitado + 2 ml. buffer	Cantidad a 2.5 ml.	Lanchas 3/dosis	Observaciones				°/T
			1º día	2º día	3º día	4º día	
0 20	2 30	pata izquierda	o	o	o	o	0/3
0 40	2 10	blanca	o	o	o	o	0/3
0 60	1 90	cola	o	o	o	o	0/3
0 80	1 70	lomo	o	o	o	o	0/3
0 90	1 60	pata derecha	o	o	o	o	0/3

VOLUMEN TÓXICO - 220 ML

Tabla N° 19:

Determinación de la dosis letal mínima (D.L.M.) del veheho Latrodectus precipitado entre 40-60% de saturación etanol.

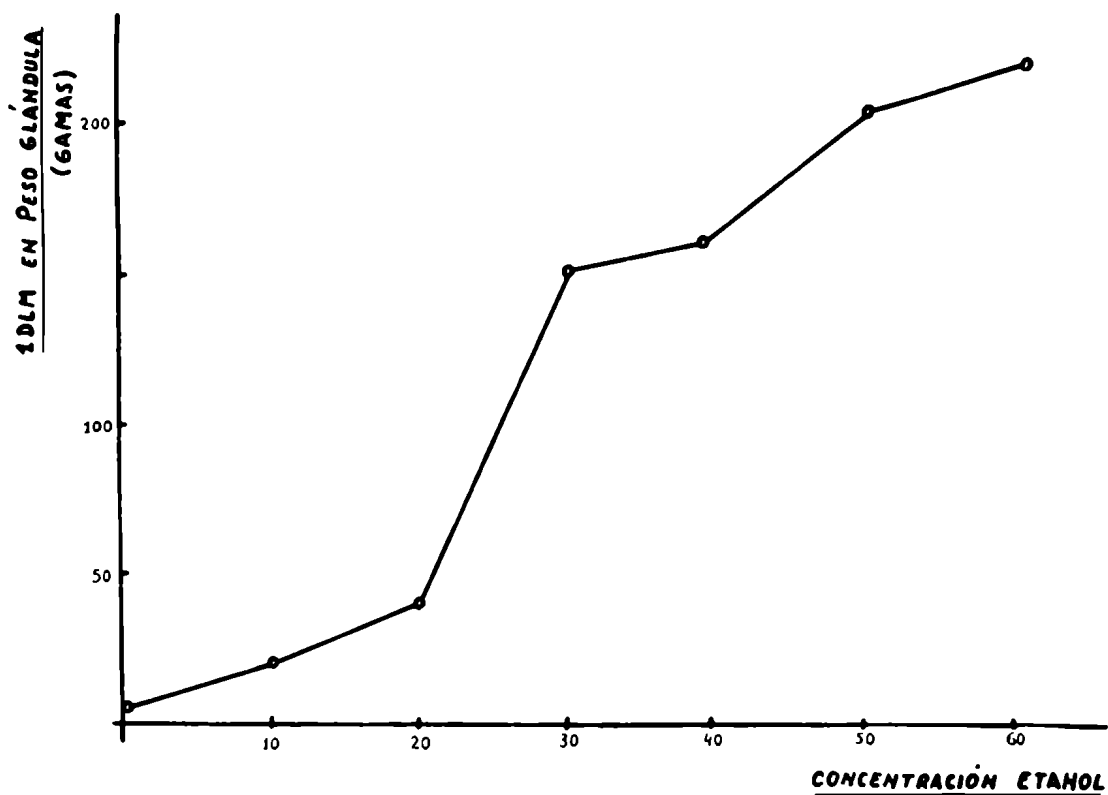


Gráfico Nº2.- Fraccionamiento de la solución de veneno de araña Latrodectus por etanol y pérdida de la toxicidad expresada en peso de glándula para una dosis letal mínima.-

**PRECIPITACIÓN DEL VENENO DE GLÁNDULAS LATRODECTUS
MACTANS CON ETANOL a 0°C.**

CONCENTRAC. DE ETANOL	ΔE_{200} diluído	ΔE_{260} sin diluir	ΔE total	VOLUMEN TOTAL (ml.)	DLM ΔE	DLM (ME)	Nº total de DLM		
							%	η	
0	0.950	0.897	19.21	2.20	42.70	5	562	100	1.0
3-10%	0.100	0.193	3.20	2.00	32.00	20	140	25	1.3
10-20%	0.136	0.153	2.72	2.00	54.00	40	70	12.5	0.80
20-30%	0.054	0.058	1.08	2.00	81.00	150	18	3.2	0.52
30-40%	0.138	0.154	2.76	2.00	138.00	160	28	5.0	0.30
40-50%	0.090	0.089	1.80	2.00	180.00	200	14	2.5	0.23
50-60%	0.180	0.223	3.60	2.00	396.00	220	12	2.1	0.10
SOBRESATURADO 100-50%	—	—	—	2.00	—	200	14	2.5	—

ΔE_{200} = MEDIDA DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS a 280 m μ .

ΔE_{260} = MEDIDA DE CONCENTRACIÓN DE NUCLEOPROTEÍNAS a 260 m μ .

DLM = MENOR CANTIDAD DE VENENO EXPRESADO EN (ME) CAPAZ DE PRODUCIR LA MUERTE
DEL 50% DE LAS LAUCHAS ANTES DEL 4º DIA

DLM $\cdot \Delta E$ = MENOR CANTIDAD DE UNIDADES a 280 m μ QUE MATA EL 50% DE LAS LAUCHAS

Tabla N° 20:

Dosis total mínima y concentraciones producidos en L280 de las *Protoparce* obtenidas a diferentes concentraciones de etanol.

CAPITULO 5ELECTROFESIS EN PAPEL DEL VENENO DE LAARAÑA LATRODECTUS

La técnica de electroforesis ha sido aplicada con resultados interesantes al fraccionamiento de los venenos de serpientes.

Hemos creído útil analizar el comportamiento del veneno de la araña Latrodectus con este método.

Antecedentes.

KUHNIG (1937) separa los componentes iónicos del veneno de Bothrops jararaca, utilizando como soporte el papel de filtro.

KHONGBITIKY (1939) confirma y amplía los resultados anteriores.

DEICALMEZ y col. (1947) separan diversos componentes de veneno de serpientes por electroforesis libre trabajando ya sea con buffer de fosfato a pH. 7.7 y una fuerza iónica de 0.1 o con buffer de dietilbarbiturato sódico - citrato a pH 8.6 y fuerza iónica 0.03, los componentes básicos proteolíticos fueron medidos por el método de la tirosina usando como sustrato hemoglobina denaturada, y la toxicidad fue determinada por inoculación intraperitoneal en ratón blanco.

OSWALDO y col. (1939) también en electroforesis libre empleando buffer veronal ácido - citrato a pH 8.6 y fuerza iónica 0.1 encuentran variación en la distribución de proteínas entre las distintas especies y para una misma especie comprueban diferencias en la distribución de los componentes proteicos del veneno en relación con la zona geográfica de ubicación de la especie estudiada, caso particular del *Cratichneumon* del norte, centro y sur del Brasil.

IRIMACHI y HARRISMAN (1938) fraccionan por electroforesis en papel los venenos de *B. jararacensis*, *B. atrox* y *Cratichneumon terrificus*, aislando diez componentes, algunos con migración hacia el ánodo y otros hacia el cátodo.

KIMURA (1955) estudiando el veneno de *B. jararaca* consigue separar por electroforesis en papel siete componentes, encontrando un área con fluorescencia amarilla por la presencia de una flavina. La corrida se realizó utilizando buffer de Veronal-Veronal ácido a pH 8.6 con un voltaje de 220 mA de 2.5 fuerza iónica de 0.06 con un tiempo de 16 horas.

BEZ y col. (1960) estudian el veneno de *Mastomys natalensis* y separan por electroforesis en papel seis fracciones de las cuales tres son movilidad anódica y tres son catódica. Por difusión de las fracciones separadas identifican una fracción citotóxica, una fracción coagulante y otra anticoagulante.

GRASSET y col. (1955) obtiene por electroforesis en papel del veneno de *Vipera russelli* ocho fracciones, revelables por el

amidoschwartz o la ninhidrina, siendo cinco las más importantes, dos de migración anódica que designan como fracciones 3 y 4, y tres de migración catódica, fracciones 5, 6 y 7. Utilizó buffer de veronal-veronal sódico a pH 8.6 -9.3 con fuerza iónica de 0.1. En las condiciones experimentales citadas se observó una pérdida del 30 al 40 por ciento de la actividad coagulante, hallándose la mayor concentración de esta acción en la fracción tres.

BUCKLER y Col. (1956) estudian por electroforesis en papel los venenos de Buzelli, Agria y Aristians operando con buffer de veronal-veronal sódico a pH 8,6 y fuerza iónica de 0.1, observando predominante migración hacia el ánodo.

DETRAIL y Col. (1959) examinan los venenos de Nais Nais y Nais nigricollis utilizando como soporte un gel de agar, utilizando una concentración inicial de veneno de 10 mg/ml con un voltaje de 250 mA de 20 con 5 horas de corrida en una placa de 50x18 cms. Las distintas fracciones eluidas fueron examinadas en sus propiedades neurotóxicas, enzimáticas e inmunológicas.

KOSHIDA y Col. (1959) separan por electroforesis continua en papel la neurotóxina del veneno de Xantina palestina utilizando buffer de veronal-veronal sódico pH 8.6 fuerza iónica 0.05 y un voltaje de 240. Los autores partieron de una solución de 500 mg. de veneno y obtuvieron dos fracciones neurotóxicas, una en el ánodo y la otra en el cátodo.

CAREY y Col. (1960) aislaron por electroforesis en placas con gel de agar con un voltaje de 4 voltios por centímetro a pH

6.8 en buffer de fosfato con un tiempo de 3 horas del veneno de una vibora marina *Echidna schistosa* tres componentes antigénicos siendo el factor tóxico el más electropositivo.

MAJER y RAC (1961) estudian los componentes del veneno de Cobra y de la vibora Russel por electroforesis en placa utilizando como soporte el gel de almidón de acuerdo al método desarrollado por PAULIK (1959). Las fracciones obtenidas por diferente movilidad son recortadas en segmentos de un cm. de longitud habiendo podido identificar proteasa, coagulasa, fosfolipasa A, nucleasa, L amino oxidasa, colinesterasa y compuestos tóxicos estos últimos por inoculación en el ratón blanco.

Parte experimental.

El fraccionamiento por electroforesis de la solución de veneno de la araña *Latrodectus* se realizó en las condiciones experimentales siguientes:

Se utilizó como soporte papel de Schleicher y Schuel 2043.

Se operó con buffer de fosfato mono y disódico pH 7.6, fuerza iónica 0.1 con 360 voltios y 0.5 mA/cm. o con buffer veronal-veronal sódico a pH 8.6, fuerza iónica 0.1 con 350 voltios y 0.4 mA/cm. la solución de veneno se obtuvo por trituración de glándulas de la araña *Latrodectus* en mortero con CaCl_2 0.15 M. expresándose la concentración y la actividad tóxica de la solución obtenida en peso de glándula.

Las corridas electroforéticas se hicieron a temperatura ambiente o en cámara fría a 4°C.

Ensayo n° 1 :

Se operó con una solución de veneno de una concentración de 30 miligramos de glándula por mililitro de solvente. De esta solución de veneno se depositaron con micropipeta 40 microlitros en cada tira de papel, realizándose la corrida con dos tiras de papel, en buffer de fosfato durante 12 horas, a la temperatura de laboratorio a 20°C.

Finalizada la corrida electroforética se utiliza una de las tiras como testigo ubicándose en la misma los distintos componentes proteicos mediante la coloración con amidoschwartz. La otra tira no coloreada se la secciona en trozos proporcionales a la tira coloreada. Cada trozo obtenido es depositado en tubo de ensayo y se eluye con 2 mililitros de buffer acetato pH 6.5 .

La actividad tóxica de cada eluido se determinó por inoculación en vía venosa al ratón blanco de 20 grs. + 2 grs., prolongándose la observación de los animales inoculados durante 4 días.

La cantidad absoluta de veneno depositada en cada tira de papel corresponde en este ensayo a 1200 gamas en peso de glándula, equivalente a un total de 30 dosis letales mínimas (D.L.M.), teniendo en cuenta que 40 gamas de glándulas contenidas en la solución patrón equivalen a 1 D.L.M..

Como puede verse en la figura n° 6 la corrida electroforética sobre papel del veneno de la araña Latrodectus pone en evi-

dercia cuatro fracciones con distinta movilidad entre el ánodo y el cátodo designadas como fracciones 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

La inoculación por vía venosa en el ratón blanco de los eluidos de cada una de las fracciones hasta una dosis máxima de 156 gamas no mostró efectos tóxicos.

Ensayo N° 2:

Se operó con un extracto patrón de glándulas correspondiente a 40 miligramos de glándula por mililitro, depositándose en sendas tiras de papel 120 y 320 gamas de peso de glándula. La corrida electroforética se hizo en buffer de veronal-veronal sódico pH 8,6 fuerza iónica 0.1 con 350 volts y 0.4 mA por cm. durante 8 horas a temperatura ambiente.

En estas condiciones, como puede verse en la figura n° 7, se obtienen cinco fracciones de cuyos eluidos inoculados hasta la cantidad máxima de 416 gamas en el ratón blanco no se observaron efectos tóxicos.

Ensayo N° 3:

La concentración de la solución patrón fué de 50 miligramos por mililitro depositándose en cada tira de papel 80 microlitros, haciéndose la corrida en buffer de veronal-veronal sódico pH 8.8, fuerza iónica 0.1 con 250 volts y un mA de 2.2 durante 16 horas en cámara fría a 4°C.

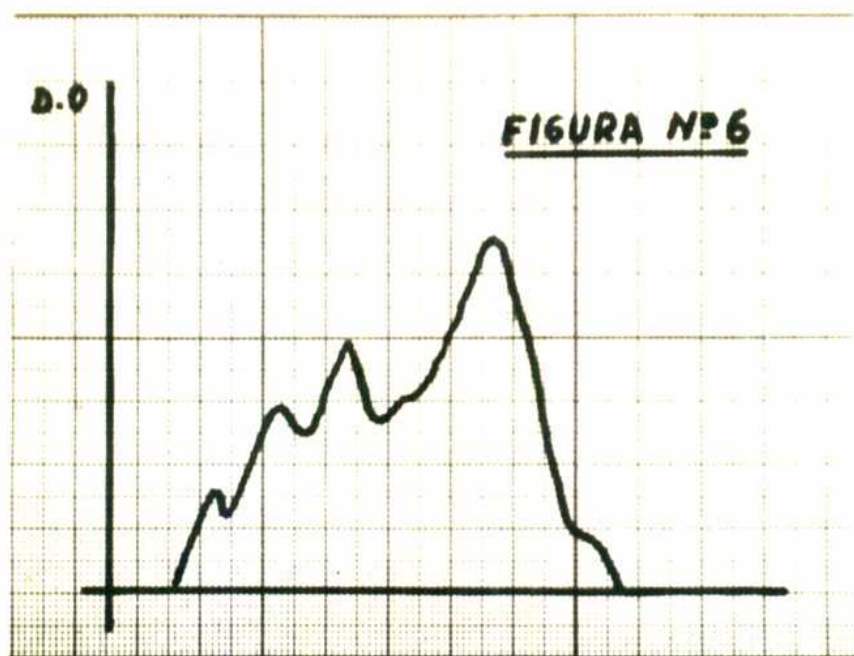
Como puede verse en la figura n° 8 se obtuvieron cuatro fracciones de las cuales el eluido de la fracción 4 inoculada

al ratón blanco por vía venosa mostró efecto letal en la cantidad máxima de 560 gamas en peso de glándula.

En síntesis, la electroforesis en papel del veneno de araña *Latrodectus*, en las condiciones experimentales descritas, ha permitido separar cuatro fracciones con diferente movilidad entre el ánodo y el cátodo.

Cuando la corrida electroforética se realiza en cámara fría a 4°C en buffer de veronal-veronal sódico a pH 8,6 fuerza iónica 0.1 con un voltaje de 250 y 2.2 mA entonces solo el eluido de la fracción 4 puso en evidencia un efecto tóxico, cuando es inoculada en la cantidad de 560 gamas en peso de glándula al ratón blanco por vía venosa.

No tenemos en cuenta la pérdida del factor tóxico producida durante la corrida electroforética, por tratarse de un ensayo puramente cualitativo.



+

1

2

3

4

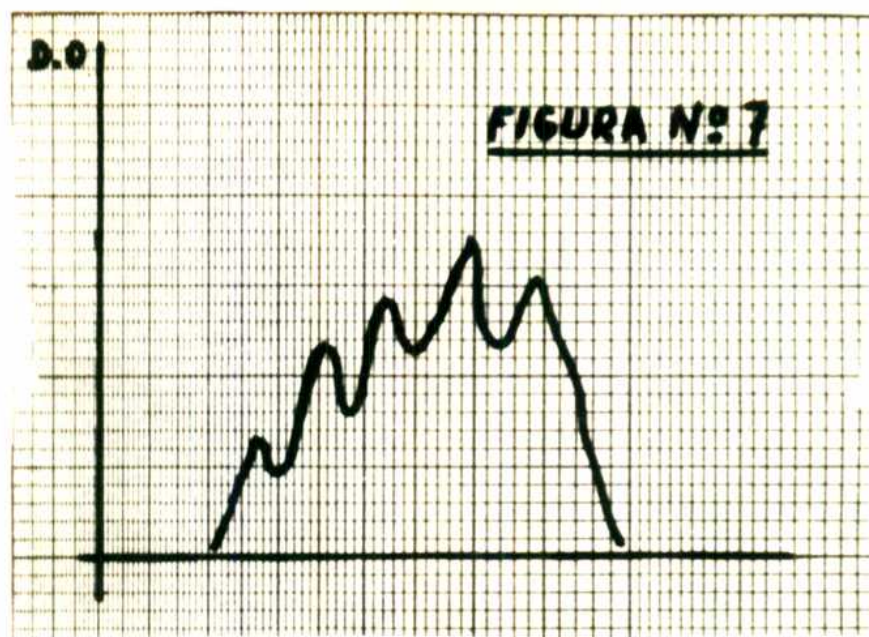
-



FIGURA Nº 6

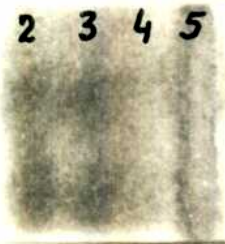
ELECTROFORESIS EN PAPEL DEL EXTRACTO GLANDULAR DEL VENENO DE
 ARAÑA LATRODECTUS MACTANS Nº1 EN BUFER DE FOSFATO MONO Y DISOLUCION pH 7.6
 M=0.1 DURANTE 12 HORAS Y COLORFADO LUEGO CON AMIDOSCHWARTZ.

LA CONCENTRACION DEL VENENO ES DE 30 mg /ml Y LA CANTIDAD SEMBRADA
 FUE DE 0.040 ml.



1 2 3 4 5

+



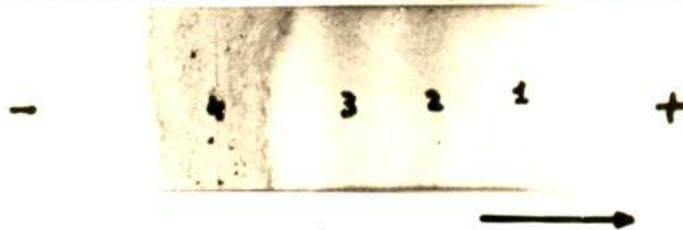
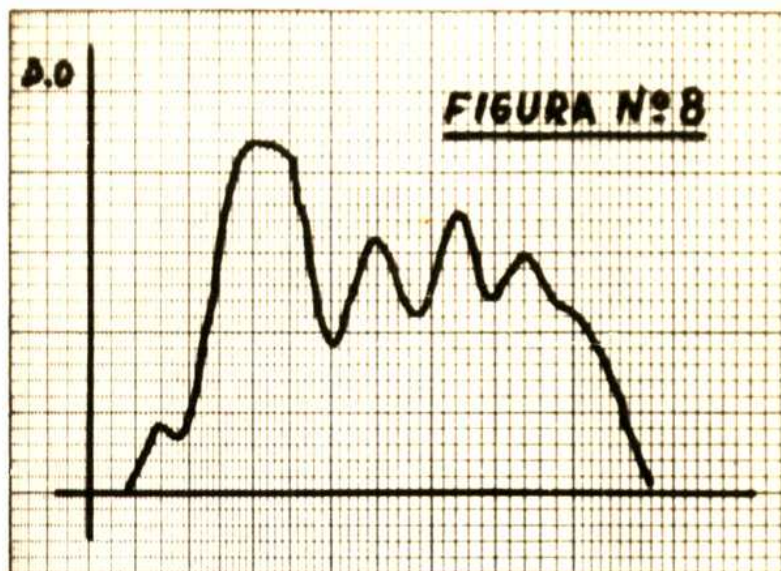
-



FIGURA N° 7

ELECTROFORESIS EN PAPEL DEL EXTRACTO GLANDULAR DEL VENENO DE ARAÑA
 LATRODECTUS MACTANS N° 2 EN BUFFER DE VERONAL VERONAL SODICO pH 8.6
 M O.I DURANTE 8 HORAS Y COLOREADO LUEGO CON AMIDOSCHWARTZ.

LA CONCENTRACION DEL VENENO ES DE 40mg/ ml Y LA CANTIDAD
 SEMBRADA FUE DE 0.030 ml.



ELECTROFORESIS EN PAPEL DEL EXTRACTO GLANDULAR DEL VENENO DE ARANA
 LATRODECTUS MACTANS EN BUFFER DE VERONAL- VERONAL SOLICO pH 8.6 M 0.1
 REALIZADA EN CAMARA FRIA Y CON APARATO MARCA SPINCO DURANTE 16 HORAS.

LA COLORACION SE EFECTUO CON AZUL DE BROMOFENOL Y UN PAPEL
 CORRIDO COMO TESTIGO SE HUYO PARA MEDIR ACTIVIDAD TOXICA DE
 CADA FRACCION. LA CONCENTRACION DEL VENENO FUE DE 50 mg/ml.

CAPITULO 6FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE LA
TOXINA DEL VENENO DE LA ARAÑA LATRODECTUS

MIRANDA y col. (1960) demostraron que la toxina de los venenos de dos especies de escorpiones norafricanos, BUTHUS y ANDROCTOMUS tienen el mismo comportamiento cromatográfico sobre Amberlite 2050. Por este método obtuvieron las preparaciones más puras comprobando que esta toxina se comporta como una proteína básica. Determinaron su punto isoeléctrico, peso molecular y composición en amino ácidos.

BURK y HUMAN (1959) estudian el fraccionamiento del veneno de cobra de Sud Africa, Ringhals cobra. Utilizando una columna con resina DEAE celulosa obtienen una separación completa de fosfodiesterasa, acetil-colinesterasa y lecitinasa A.

Con estos antecedentes y dada la naturaleza proteica de la toxina del veneno de la araña Latrodectus estudiamos el fraccionamiento de esta toxina por el método de las resinas de absorción.

Modus operandi:

En nuestras experiencias utilizamos la resina DEAE celulosa (intercambiadora de tipo aniónico) de malla 320, con 0.96

miliequivalente por gramo de resina, siendo las dimensiones de la columna empleada de 0.9 por treinta centímetros.

Preparación de la columna.

Se purifica la resina por lavado con solución de hidróxido de sodio 0.5 N a fin de eliminar sustancias colorantes, se lava con agua destilada para eliminar el exceso de alcalí, se trata por etanol para extraer lípidos, nuevo lavado con agua destilada, hidróxido de sodio 0.5N y agua, hasta eliminación del alcalí. Se procede al secado a temperatura ambiente, bajo vacío y se completa el secado en estufa a 80°C. Se pesan 4 gramos de dicha resina y se suspende en buffer de fosfato mono y diácido 0.005M y pH 6.0; en estas condiciones se deja estabilizar durante 48 horas con agitación magnética y el sedimento es lavado reiteradamente con solución buffer hasta eliminar las partículas que por su reducido tamaño no alcanzan a sedimentar.

La resina así obtenida es añadida con agitación constante lo más rápidamente posible a la columna y como en nuestro caso era de malla inferior a 325 la dejamos sedimentar por gravedad hasta ocupar los 2/3 de la altura de la columna, aplicándosele entonces una presión de aire de 10 pulgadas/cm. Este empaquetamiento de la columna se hizo a temperatura de laboratorio. El diámetro de la columna utilizada demostró ser de mayor eficiencia en el proceso de la contracorriente y ofrecer una menor resistencia al flujo del buffer.

A continuación se hace pasar el buffer de la claridad y pH deseado en cada caso, hasta conseguir un goteo regular con

un pH constante.

Obtención de la solución de veneno.

La solución de veneno se obtuvo por trituración en mortero de un determinado peso de glándulas con buffer de acetato de pH 6.5. La solución de veneno así obtenida era equilibrada por diálisis frente al buffer de la molaridad utilizada para el lavado de la columna; dicho equilibrio se hizo por agitación magnética en cámara fría a 4°C durante 48 horas, renovándose el buffer de la diálisis tres veces por día.

Carga de la solución de veneno a la columna.

Se deposita lo más cerca posible de la superficie de la columna de resina un mililitro de la solución de veneno. Una vez que la superficie de la columna queda al descubierto por el pasaje de la muestra a la resina, se inicia el goteo sobre la superficie de la columna de la solución buffer contenida en un frasco dispuesto adecuadamente para dicho goteo. Se trabajó en cámara fría a 4°C. Las muestras fueron recogidas periódicamente determinándose la concentración en proteína por lectura espectrofotométrica a $\Delta 280$ y la toxicidad por inyección al ratón blanco por vía venosa.

Resultados experimentales.

Ensayo N° 1:

Se depositó sobre la superficie de la columna 1 mililitro de una solución de veneno con una concentración de 10 miligramos de glándula por mililitro siendo la D.L. 50 de 65 gams con un total de 154 D.L. f.

Para el goteo se utilizó buffer de fosfato mono y diésico 0.005 M y pH 8.0 ; se reguló el flujo de la columna a 7 gotas por minuto, obteniéndose una muestra cada 3 mililitros, con un total de 39 muestras. Se determinó el contenido en proteínas en el total de las muestras y la toxicidad cada 3 muestras. Los resultados se hallan consignados en la figura n° 11 y en la Tabla n° 22.

La cromatografía en columna con resina DEAE celulosa de una solución de veneno de araña *Latrodectus* en las condiciones experimentales descritas puso en evidencia cuatro fracciones tóxicas correspondientes a las muestras n° 9, 23, 32 y 38 (ver figura 11, superficies rayadas). En la misma figura la línea continua expresa el valor de la concentración en proteínas de cada una de las muestras obtenidas.

En la Tabla n° 22 se hallan consignados los valores correspondientes a intervalos de cada tres muestras del total de la serie. En la columna ΔE_{280} se indican las concentraciones en proteínas leídas en el espectrofotómetro, las D.L.M. por mililitro, la correlación entre los dos valores anteriores como expresión de un índice de pureza, el total de D.L.M. y finalmente el rendimiento en D.L.M. en cada muestra.

La muestra n° 9 fué obtenida después de haber eluido la columna con 26 mililitros, la muestra n° 23 con 72 mililitros, la n° 32 con 99 mililitros y la n° 38 con 117 mililitros de buffer con un rendimiento en D.L.M. del 30, 10, 8 y 0,3 por ciento respectivamente.

en la columna fué de 240.

Como puede verse en la figura nº 12 la elución realizada a pH 6 con una molaridad de 0.05 pone en evidencia que el factor tóxico es eluido en los primeros 30 mililitros, recuperándose un 75 por ciento de las D.L.M. sembradas en la columna. Ver Tablas nº 23.

Estos ensayos de fraccionamiento del veneno de araña Latrodectus por cromatografía en columna con resina DEAE señalan la influencia de la variación de pH y de la molaridad del eluyente en la marcha de la separación de la toxina.

Ensayo N° 2 :

La Columna de resina era de las mismas características descriptas en el ensayo anterior. Con igual técnica se depositó sobre la superficie de la columna un mililitro de la solución de veneno con una concentración de 12 miligramas de glándula por mililitro. En cambio la elución fué realizada con buffer de fosfato mono y disódico de pH 7.0 y 0.005 M con una velocidad de 8 gotas por minuto, recogiéndose muestras cada cinco mililitros. La D.L.M. de la solución de veneno analizada era de 60 gamas, habiéndose inculado en la columna un total de 166 dosis letales mínimas.

Como puede verse en la figura n° 13, se obtuvieron tres fracciones tóxicas, la primera a los 20, la segunda a los 70 y la tercera fracción a los 125 mililitros sobre un total eluido de 140 mililitros. Se recuperó el 21, el 18 y el 24 por ciento respectivamente del total de las D.L.M. sembradas en la columna Ver Tabla N° 24.

Ensayo N° 3 :

En este ensayo se sembró sobre la superficie de la columna 1 mililitro de la solución de veneno con una concentración de 12 miligramas por mililitro y se eluye con una solución de buffer de fosfato mono - disódico de pH 6 y 0.005 molar, recojiéndose una muestra cada 6 mililitros. Las otras condiciones fueron similares al ensayo anterior. La D.L.M. de la solución de veneno analizada fué de 50 gamas y el total de D.L.M. sembradas

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL VENENO LATRODECTUS MACTANS

TUBO	EXTRACTO ELUIDO (ml)	ΔE_{280}	D.L.M (mg)	D.L.M x ΔE_{280}	D.L.M totales	η
0	25.00	1.450	0.06	0.118	154	100
3	25.00	0.240	0.55	1.320	10	6.5
6	25.00	0.080	0.50	0.400	24	15
9	25.00	0.060	0.30	0.180	50	30
12	25.00	0.080	0.50	0.400	30	20
15	25.00	0.090	—	—	—	—
18	25.00	0.075	—	—	—	—
21	25.00	0.090	—	—	—	—
24	25.00	0.140	1.40	1.960	15	10
27	25.00	0.030	1.50	1.050	10	6.5
30	25.00	0.065	—	—	—	—
33	25.00	0.060	1.30	0.780	12	8
36	25.00	0.050	—	—	—	—
39	25.00	0.040	2.00	1.600	3.7	3

ΔE = MEDIDA DE CONCENTRACION DE PROTEINAS A 280 m μ

DLM = MENOR CANTIDAD DE VENENO EXPRESADO EN (%) CAPAZ DE PRODUCIR LA MUERTE DEL 50% DE LAS LAICHAS ANTES DEL 4º DIA

η = MENOR CANTIDAD DE UNIDADES A 280 m μ QUI PATA EL 50% DE LAS LAICHAS

Tabla N° 22:

Fraccionamiento de la solución de veneno de la araña Latrodectus por cromatografía en columna con resina DNAB celulosa con buffer fosfato mono y diadico a pH 8 y 0.205 molar.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL VENENO LATRODECTUS MACTANS

EXTRACTO ELUIDO (ml)	ΔE_{280}	D.L.M (MC)	D.L.M = ΔE_{280}	D.L.M TOTALES	η
INICIAL	2 500	5	125	240	100
0 - 12	0 520	10	52	120	50
12 - 24	0 146	20	29	60	25
24 - 36	0 152	-	-	-	-
36 - 48	0 135	-	-	-	-
48 - 60	0 130	-	-	-	-
60 - 72	0 135	-	-	-	-
72 - 84	0 110	-	-	-	-
84 - 96	0 109	-	-	-	-
96 - 108	0 112	-	-	-	-
108 - 120	0 103	-	-	-	-
120 - 132	0 100	-	-	-	-
132 - 140	0 120	-	-	-	-
140 - 152	0 115	-	-	-	-
152 - 170	0 118	-	-	-	-
170 - 182	0 106	-	-	-	-
182 - 194	0 100	-	-	-	-

ΔE_{280} : MEDIDA DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS A 280 m μ

DLM : MENOR CANTIDAD DE VENENO EXPRESADO EN (MC) CAPAZ DE PRODUCIR LA MUERTE DEL 50% DE LAS LAUCHAS ANTES DEL 4º DIA

DLM . ΔE : MENOR CANTIDAD DE UNIDADES A 280 m μ QUE MATA EL 50% DE LAS LAUCHAS

η : RENDIMIENTO

Tabla N° 25:

Fracionamiento de la solución de veneno de la araña *Latrodectus* por cromatografía en columna con resina DEAE celulosa con buffer fosfato mono y diácido a pH 6 y 0.05 molar.

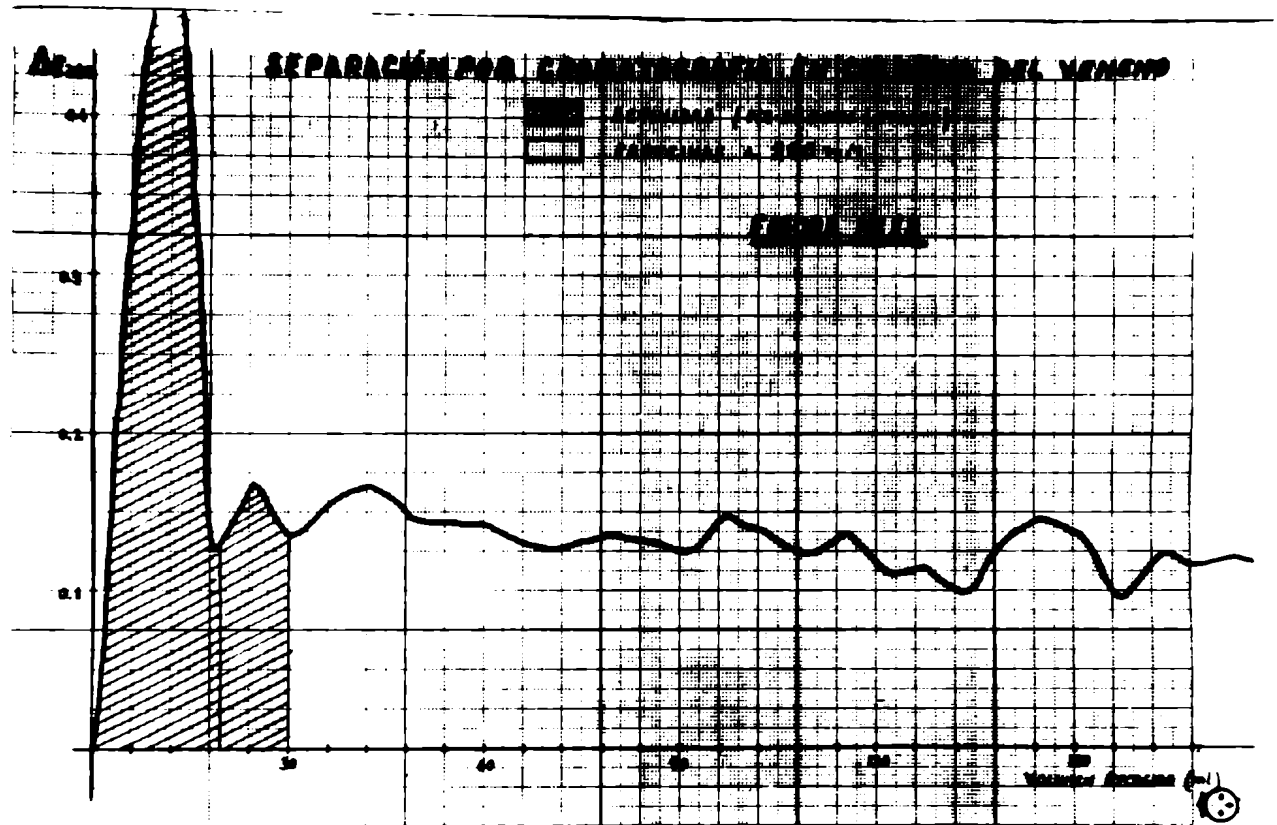


FIGURA Nº 12

CROMATOGRAFIA DE IONES POR RESINA DE CELULOSA (dióxi: amino etil celulosa) e intercambiador aniónico) DEL EXTRACTO
 DE VENENO DE LA VESPA (Vespa maculipes) MACTAR Nº 1.
 LA CANTIDAD DE MUESTRA SEMBRADA FUE DE 12 mg/ml. DE CONCENTRACION, SIENDO EL VOLUMEN SEMBRADO DE 1 ml. DISUELTOS
 EN BUFFER DE FOSFATO DE SODIO 0.05 M. Y pH=6.0 CON UNA VELOCIDAD DE FLUJO DE 8 gotas/ minuto, RECOGIENDOSE VOLUMENES DE 6 ml.

TODA LA EXPERIENCIA SE REALIZO EN CAMARA FRIA A 4°C, SIENDO LAS DIMENSIONES DE LA COLUMNA DE 30 x 0.6 cm.
 A UNO CINCUENTA MCM. DE DIAMETRO DE 50%, SIENDO EL RUMPO DE DOS MCM. MINIMAS NOTALES SEMBRADAS DE 240, CORRESPONDIENTE A
 5 VOLUMENES DE 6 ml.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL VENENO LATRODECTUS MACTANS

EXTRACTO FLUIDO (ml)	ΔE_{280}	D.L.M (ml)	D.L.M x ΔE_{280}	D.L.M totales	η
INICIAL	2 050	0 006	0 123	166	100
0-10	0 280	0 30	0 840	30	18
10-20	0 250	—	—	—	—
20-30	0 125	0 50	0 625	35	21
30-40	0 130	—	—	—	—
40-50	0 110	—	—	—	—
50-60	0 115	—	—	—	—
60-70	0 110	2 50	2 750	20	12
70-80	0 169	1 60	2 720	30	18
80-90	0 052	—	—	—	—
90-100	0 060	—	—	—	—
100-110	0 170	—	—	—	—
110-120	0 070	—	—	—	—
120-130	0 175	2 50	4 50	40	24
130-140	0 058	1 10	0 720	3	2
140-150	0 066	—	—	—	—
150-160	0 040	—	—	—	—

ΔE_{280} MEDIDA DE CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS A 280 m μ

DLM - MEJOR CANTIDAD DE VENENO EXPRESADO EN (ML) CAPAZ DE PRODUCIR LA MUERTE DEL 50% DE LAS LAICHAS ANTES DEL 4^{ta} DIA

DLM . ΔE MENOR CANTIDAD DE UNIDADES A 280 m μ QUE MATA EL 50% DE LAS LAICHAS

η RENDIMIENTO

Tabla N° 21:

Fraccionamiento de la solución de veneno de la araña *Latrodectus* por cromatografía en columna con resina DEAE celulosa con buffer fosfato mono y diácidos a pH 7 y 0.005 molar.

CAPITULO 7

DISCUSION DE RESULTADOS

Se dispuso de 20.000 (veinte mil) glándulas-separadas de sus quelíceres-de la araña del género Latrodectus procedentes de la provincia de Santiago del Estero, República Argentina, (para el estudio de la purificación química del veneno contenido en dichas glandulas).

La extracción del veneno se realizó con buffer de ácido acético acetado de sodio pH 6.5 y 0.01 molar. La concentración de la solución de veneno utilizada en las distintas experiencias, salvo indicación expresa, fué de 10 miligramos en peso de glándulas por mililitro con una dosis letal mínima (D.L.M.) de 3,5 a 5 microlitros correspondiendo a un peso en glándula variable entre 35 y 50 gamas. Estas cifras se refieren a glándulas conservadas en desecador sobre cloruro de calcio al vacío en cámara fría a 4°C. con peso promedio por glándula de 100 (cien) gamas.

De los diferentes procesos seguidos para la purificación química del veneno de araña del género Latrodectus podemos extraer los siguientes resultados.-

La D.L.M. de la solución de veneno no varió significativamente por acción de temperatura con rendidas entre -14 y 35°C.- Entre 45 y 55°C. la toxina se atenúa de 40 a 70 gamas en peso de glándula por D.L.M. y a 60°C. la toxina prácticamente se destruye. a -76°C. y liofilización subsiguiente se pierde un 15 por ciento de la toxicidad.-

El tratamiento de la solución de veneno por sulfato de amonio sólido, por sulfato de amonio en solución saturada, por etanol en frío y por columna de resina intercambiadora de tipo aniónica DEAE celulosa determina en cada caso un diverso tipo de fraccionamiento con variable grado de pureza y rendimiento.-

Si consideramos como índice de pureza el menor producto de la correlación de los valores de la D.L.M. ΔE_{280} , para una solución patrón de veneno con D.L.M. de 5 microlitros y un ΔE_{280} de 0.690 se obtiene con sulfato de amonio sólido entre 0 y 30 por ciento de saturación una fracción con un 5 por ciento de rendimiento en toxicidad y un índice de pureza de 2.2 y para sulfato de amonio en solución saturada con valores para la solución patrón de D.L.M. de 5 microlitros y ΔE_{280} de 0.750, se obtiene entre 60 y 70 por ciento de saturación de la sal una fracción del veneno con un rendimiento del 12 por ciento de la toxicidad para un índice de pureza de 1.5.

El tratamiento de una solución patrón de veneno con valores para D.L.M. de 5 microlitros y ΔE_{280} de 0.850, con etanol entre 0 y 10 por ciento permite obtener una fracción con un rendimiento del 25 por ciento de la toxicidad y un índice de pureza de 1.3.-

Las fracciones antes citadas son las de mayor rendimiento y mejor índice de pureza de toda la serie obtenida a distintas saturaciones, sin que ninguna de las restantes carezca de un cierto valor.-

El tratamiento de la solución de veneno por cromatografía en columna de resina DEAE celulosa a pH 8 y buffer de fosfato 0.005 molar permite obtener tres fracciones tóxicas que aparecen

63...

a los 26,72 y 99 mililitros sobre un total de 39 muestras de 3 mililitros cada una, con un rendimiento del 30, 10 y 8 por ciento del total de D.L.M. sembradas en la columna.

Operando en las mismas condiciones pero a pH 7.0 se obtienen también tres fracciones a los 20, 70 y 125 mililitros sobre un total de 140 mililitros de eluido con 28 muestras de 5 mililitros cada una con un rendimiento del 21, 18 y 24 por ciento del total de D.L.M. sembradas en la columna.

El cambio operando a pH 6 con un buffer de fosfato de 0.05 molar se recupera el 75 por ciento del total de las D.L.M. sembradas en la columna en los primeros 30 mililitros, sobre un total de 194 mililitros de eluido con 32 muestras. Ninguna de las muestras obtenidas después de los primeros 30 mililitros puso en evidencia efectos tóxicos.-

El fraccionamiento de la solución del veneno de la araña del género Latrodectus por electroforesis en papel puso en evidencia 4 fracciones de las cuales la fracción nº 4 cuando se trabajó en cámara fría a 4° C. en buffer de veronal a pH 8.6 fué tóxica para el ratón blanco.-

-----oOo-----

64...

C O N C L U S I O N E S

Del estudio de purificación química del veneno de araña del género *Latrodectus* que presentamos y que son los primeros aportes que sobre el tema figuran en la literatura científica mundial, podemos extractar las siguientes conclusiones:

1º) La toxina del veneno de araña del género *Latrodectus*, es termolábil pues se destruye a 60º C.

2º) Es posible la precipitación de los diferentes componentes tóxicos del veneno por acción de sales; en nuestro caso con sulfato de amonio.

3º) Por precipitación con etanol a 0º C de temperatura, solamente a bajas concentraciones, se logró obtener buen rendimiento; con valores superiores al 20% de saturación de etanol, hay pérdida de la toxicidad.

4º) Utilizando la electroforesis en papel en cámara fría, es posible separar una de las toxinas del veneno; las demás perdían su efecto tóxico al ser inoculadas a lauchas.

5º) Por cromatografía en columna con resina DEAE celulosa -- (Intercambiadora aniónica), se logró separar en un caso 3 componentes tóxicos y en otro 4, según sea variando la molaridad y el pH.

Consideramos de todos los métodos empleados el de cromatografía en columna de la solución de veneno de araña del género *Latrodectus*, los más promisoros a los fines del aislamiento de fracciones puras.-

CAPITULO 8BIBLIOGRAFIA

- BJORK, W.BOMAN, H.G (1959) Fractionation of venoms from the Ringhals Cobra.- Biochem. et Biophys. acta 34, 503.-
- BLAIR, A.W. (1934) Spider poisoning. Experimental study of the bite of the female Latrodectus mactans in man.- Arch. Internat. Med. 54, 831.-
- BOGEN E. (1926) Arachnidism.- J. A m. Med. Ass. 16, 19.-
- BOIE (1960) J. Med. Sc. Biol, 13, 199.-
- BUCKLER, E. PORGES, N. (1956) Venoms.- 44, 153.-
- CAREY, J.E. y WRIGHT, E.A. (1960) Isolation of the neurotoxic component of the venom of the Sea Snake.- Nature (London) 185, 203.-
- COHN, E.J. GURD, F.R., Surgener O.M. (1950) A System for the separation of the components of the Human blood: Quantitative procedures for the separation of the proteins components of Human plasma.- J. Am. Chem. Soc. 72, 465.-
- D'AMOUR, E.F. (1936) A comparative assay of Black Widow antisera. Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 35, 262.-
- DETRAIT, J., ISARD, Y., BOQUET, P. (1959) Separation by electrophoresis of the constituent of the venoms of Naja naja and Naja nigricollis.- C.R. Soc. Biol. 153, 1722.-
- FINLAYSON, M.H. (1937) Specific antivenom in treatment of "Kne-
pie Spider" bite. - South. Afr. Med. J. - 11, 163.-
- GONCALVEZ, J.M., POLSON, A.- (1947) Electrophoretic analysis of Snake Venoms.- Arch. Biochem. 13, 253.-

- GONCALVES, J.M., VIEIRA, L.G. - (1950) Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras.- An. Acad. Brasil. Cienc. 22, 141.-
- GRASSET, E., SCHWARTZ, E. (1955) - Fractionnement par électrophorèse sur papier du venin de *Vipera Russellii* - Ann. Inst. Pasteur - 88, 271.-
- GREEN, A.A., HUGHES, W.L. (1957) *Methods in Enzymology*.- 1, 67.-
- HENRIQUEZ, O.B., FICHMAN M., HENRIQUEZ, S.B. (1959) Fractionation of the venom of *Bothrops jararaca* by ammonium sulphate. Purification of some of the fractions obtained.- Mem. Inst. Butantan.- 29, 181.-
- HOUSEMAN, B.A., NEGRETE, J. (1919) Nuevos estudios experimentales sobre la acción fisiológica de las ponzoñas de las arañas.- Rev. Inst. Bact. Buenos Aires.- 2, 189.-
- KLOBUSITZKY, D. und KONIG (1939) Biochemische Studien über die Gifte der Schlangengattung *Bothrops* - Arch. Experim. Pathol. Pharmacol.- 192, 271.-
- KOBERT, R. (1901) Beiträge zur Kenntnis der Giftspinnen - Stuttgart.-
- KOCHWA, S., ISARD, Y., BOQUET, P., GITTER, S. (1959) Sur la préparation d'un immunosérum équin anti venimeux au moyen des fractions neurotoxiques isolées du venin de *Vipera Xanthina Palestinae* - Ann. Inst. Pasteur.- 97, 370.-
- KOENIG, P. (1937) Aplicação da Electrophorese nos trabalhos Chimicos com quantidades pequenas - Actas Trab. 3er. Congr. Sul. Amer. Chim. Rio de Janeiro.- 2, 334.-
- KONSTANSOFF, S.V. (1906) La araña venenosa "Kara - Kurt" y el suero anti Kara Kurt - Vesnik Wracher.- 18, 516.-
- MASTER, J., RAO (1961) Identification of enzymes and toxins in venoms of India Cobra and Russell's viper after starch gel electrophoresis. J. Biol. Chem.- 236, 1986.-
- MAXIMOVICH, M. (1939) Le venin du kara - kurt Latrodectus 13-guttatus, agissant comme antigène; efficacité de l'antitoxine dans les expériences sur les animaux.- Med. Parasitol.- 8, 51.-

MIRANDA, F., ROCHAT, H., LISSITSKY, S. (1960) Sur la neuretisine du venin des scorpions - Bull. Soc. Chim. Biol.- 4, 379.-

NEUMANND, W. und HABERMANN (1955) - Zur Papierelektrophoretischen fraktionierung - Naturwissenschaften.- 41, 322.-

NEURATH (1954) The Proteins. Academic Press. -

PAULIK (1959) Immuno-electrophoresis on starch gel.- J. Immunol.- 82, 502.-

PIROSKY, Ig., SAMPAYO, R., FRANCESCOHI C. (1942) Obtención y purificación de suero anti- Latrodectus. Rev. Soc. Arg. Biol.- 18 179 y Rev. Inst. Bact.- 11, 83.-

PIROSKY, Ig., ABALOS, J. W. (1961) Spiders of the Genus Latrodectus in Argentina - Latrodectism and Latrodectus antivenin - Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Area - International Congress - Pergamon Press.-

RIBEIRO, L. (1955) Paper electrophoretic and enzymatic studies on blood serum, venoms and liver of B. jararaca - Mem. Inst. Oswaldo Cruz.- 53, 487.-

SCHERBINA, A. (1903) Serum als Heilmittel bei den Bissen der Karakurt (Latrodectus malmignathus) - Arb. d. entomol. Bureau, Saint Petersburg, 4, N° 4 (citado por Sampayo) Tesis.-

SAMPAYO, R. (1942) Latrodectus mactans y Latrodectismo - Estudio Experimental y clinica - Tesis de Doctorado en Medicina.-

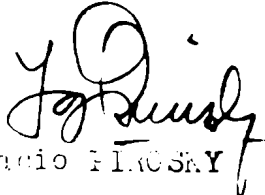
TROISE, E. (1928) Preparación de un suero Inmunizante contra Latrodectus mactans - Rev. Soc. Arg. Biol.- 4, 467; C.R. Soc. Biol.- Paris 99, 1431.-


TROISE, E. (1929) Spécificité du sérum anti-Latrodectus mactans - C.R. Soc. Biol. Paris- 102, 1098.-

67...

TROISE, E. (1928) Estudio Farmacológico sobre la Ponzofia del "La-
trodictus mactans".- Rev. Soc. Arg. Biol. 4, 447; C.R. Soc. Biol.
Paris.- 99, 1431.-

TROISE, E. (1929) Estudio Farmacológico sobre la ponzofia del "La-
trodictus mactans" Rev. Soc. Arg. Biol.- 5, 605.-


Ignacio FROSKY


Luis Mario SCAVINI