

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y Posgrado
Colegio de Ciencias y Humanidades



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA TOXINA DEL VENENO DEL Heloderma horridum horridum

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A
JAVIER MOCHCA MORALES
MEXICO, D. F. 1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIACIONES UTILIZADAS EN EL TEXTO

- BAEE	Benzoil Arginil Etil Ester
- TAME	Tosil Arginil Metil Ester
- DFP	Diisopropil Fluoruro fosfato
- VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
- PSF	Factor Secretorio Pancreático
- PHI	Péptido Histidin Isoleucina
- CCK 8	Colecisto cinina 8
- FITC	Fenil Isotiocianato
- PTH	Fenil Tiohidantoina

NOMENCLATURA DE LOS AMINOACIDOS COMUNES

A	Alanina	Ala
C	Cistefna	Cis
D	Acido aspártico	Asp
E	Acido glutámico	Glu
F	Fenilalanina	Fen
G	Glicina	Gli
H	Histidina	His
I	Isoleucina	Ile
K	Lisina	Lis
L	Leucina	Leu
M	Metionina	Met
N	Aspargina	Asn
P	Prolina	Pro
Q	Glutamina	Gln
R	Arginina	Arg
S	Serina	Ser
T	Treonina	Tre
V	Valina	Val
W	Triptofano	Trp
Y	Tirosina	Tir
X	Desconocido	

R E S U M E N

El estudio del veneno del Heloderma horridum horridum muestra que esta compuesto principalmente de proteínas, de las cuales la mayoría presentan actividades enzimáticas. Las actividades enzimáticas detectadas son de tipo L-amino-oxidasa, fosfolipasa, hialuronidasa y proteinasas. Las enzimas en conjunto ocasionan los efectos del veneno del saurio.

En esta tesis se demuestra la presencia de un componente tóxico "per se" en el veneno del Heloderma horridum horridum que ocasiona la disminución de la temperatura en ratones de experimentación.

Por medio de cromatografía en Sephadex G-75, seguida por intercambiadores iónicos de celulosa, se encontró un componente polipeptídico de aproximadamente 25,500 de peso molecular; la toxina se comporta homogénea por electroforesis en geles de poliacrilamida y por inmunodifusión. La toxina presenta un punto isoelectrico de 6.8 ± 0.2 por electroenfoque.

El análisis de aminoácidos mostró que la toxina contiene 221 residuos de aminoácidos. La secuencia N-terminal de la misma es: N-Glu-Ala-Ser-Pro-Lis-Leu-Pro-Gli-

Leu-Met-Tre-Ser-Asn-Pro-X-Gln-Gln-Tre-Gli-Pen... La comparación de esta secuencia de aminoácidos con las demás conocidas (diccionario Dayhoff) no presentó semejanza significativa.

Con respecto a la actividad biológica se encontró que los ratones de experimentación al morir muestran disminución paulatina y constante de su temperatura corporal, por lo que se propone que se trata de una toxina hipotérmica

Para determinar el mecanismo de acción se probaron varios sistemas electrofisiológicos, en donde se encontró que la toxina ocasionaba disminución de la tensión activa en el músculo papilar del ventrículo izquierdo de corazón de rata.

Para verificar la posible acción de la toxina en la permeabilidad iónica a través de canales de Na^+ , K^+ y Ca^{++} de membranas excitables se probó su efecto en sistemas de voltaje sostenido ó pinzas de voltaje, en donde los resultados fueron negativos.

La toxina es diferente a todas las toxinas conocidas a la fecha, incluyendo a la gilatoxina reportada por A.Tu (1981).

I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
1. Generalidades	1
2. El heloderma	4
3. Caracterización del veneno.....	5
Toxicología.....	5
Bioquímica.....	6
Fisiología.....	8
4. Caracterización de los componentes.....	9
Esterasa.....	10
Hialuronidasa.....	11
Fosfolipasa A ₂	12
Glatoxina	13
Componentes peptídicos	14
5. Proposito de esta tesis	16
II. MATERIAL Y METODOS	17
1. Extracción del veneno	17
2. Reactivos y resinas	17
3. Pruebas de toxicidad	18
4. Purificación de la toxina	18
5. Purificación por H.P.L.C.	20
6. Electroforesis	20
7. Análisis de aminoácidos	21
8. Reducción y vinilpiridilación	22
9. Secuencia de aminoácidos	23
10. Inmunodifusión	24
11. Ensayos enzimáticos	25
12. Determinación del efecto hipotérmico en ratones	26
13. Efectos en la tensión activa de musculo papilar cardiaco de rata.....	27

	Pág
III. RESULTADOS	28
1. Caracterización general del veneno	28
2. Purificación de la toxina hipotérmica ...	29
3. Purificación por H.P.L.C.	34
4. Análisis electroforético	34
5. Composición de aminoácidos	41
6. Secuencia de aminoácidos	43
7. Determinación del punto isoeléctrico	46
8. Inmunodifusión de la toxina	48
9. Efecto hipotérmico de la toxina	50
10. Efecto sobre el músculo papilar de corazón de rata	53
 IV. DISCUSION	 55
El veneno del <u>Heloderma horridum horridum</u>	55
Purificación de la toxina del <u>Heloderma horridum horridum</u>	57
Análisis electroforético	59
Caracterización de la toxina	61
Análisis de aminoácidos	61
Secuencia de aminoácidos de la toxina	62
Propiedades inmunológicas	63
Propiedades hipotérmicas	64
Efectos sobre músculo papilar cardiaco de rata	65
Otros ensayos electrofisiológicos	65
 V. CONCLUSIONES	 67
 VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	 69

	Pág.
VII. AGRADECIMIENTOS	70
VIII. BIBLIOGRAFIA	71

I. INTRODUCCION

1. Generalidades

El estudio de venenos animales muestra que éstos son una mezcla de diversos tipos de sustancias, principalmente proteínas, las cuales tienen diferentes funciones biológicas, y - que actúan sinérgicamente sobre la víctima.

Los venenos de los animales tienen como función de - obtención de alimento y son a la vez un mecanismo de defensa. Esto ha sido el producto de un largo proceso de convergencia - evolutiva que se ha llevado en la naturaleza, como una respuesta adaptativa de varias especies biológicas a los retos del -- medio ambiente.

El estudio de los venenos animales, fue en un principio enfocado al aspecto médico y éste fue el principal motivo de su caracterización sin embargo también, se fueron descubriendo paulatinamente los componentes de los venenos, y de su -- función biológica. Esto despertó el interés de la comunidad - científica, hacia la utilización de tales componentes como -- herramientas en el avance del conocimiento de mecanismos biológicos normales (Zlotkin, 1973).

Los venenos animales se han estudiado con diferentes enfoques, desde un punto de vista bioquímico, fisiológico, inmunológico y farmacológico. Esto ha hecho que el número de publicaciones anuales relacionadas a este campo se incremente en forma considerable, por lo que se hace difícil la revisión detallada de toda la información.

Para describir en forma general a los venenos se puede afirmar, por ejemplo que en el caso de los venenos de alacrán y de los venenos de serpiente de la familia Elapidae -- (cobras, mambas, coralillos) e Hidrofidae (serpientes marinas), su letalidad se debe a toxinas polipeptídicas, puesto que estos venenos no poseen actividades enzimáticas proteolíticas -- predominantes (Tu, 1977).

Por otra parte, los venenos de las familias Crotalida (serpientes de cascabel) y Viperidae, tienen una acción -- principalmente debida a enzimas, muchas de las cuales participan activamente en la coagulación sanguínea, en fenómenos de -- anticoagulación, en procesos hemorrágicos y hemolíticos, otras acciones farmacológicas y fenómenos líticos de membranas celulares y mitocondriales (Tu, 1977).

Existen otras especies animales productoras de veneno como peces, anfibios, y anémonas de mar.

Los trabajos realizados con las toxinas encontradas - en estas especies, como la tetrodotoxina, batracotoxina, y los péptidos tóxicos de anémona de mar, han permitido utilizarlas - como herramientas en estudios que han facilitado la caracteri-- zación funcional del canal de sodio (Narashi 1974, Caterall, -- W.A., 1977).

Por otra parte, con respecto a los saurios, sólo se - conoce un género venenoso, el del heloderma, cuyo veneno se re- porta como principalmente enzimático (Tu, 1977).

La complejidad de los venenos limita sus estudios, a enfocarse en un solo aspecto.

En la actualidad todavía no es posible dar una expli cación satisfactoria, del efecto integral de los venenos en -- los tejidos de los organismos afectados, por lo que las inter- pretaciones del mecanismo de acción se limitan a las condicio- nes experimentales usadas.

El estudio de los venenos muestra:

- a) Poseen componentes polipéptidicos tóxicos de natura- leza muy variada que son capaces de interferir y al terar diversos procesos biológicos dentro del orga- nismo.

- b) Constituyen una de las fuentes más ricas de enzimas - que existen en la naturaleza, (fosfolipasas, protea--sas, hialuronidasas, nucleasas, etc.).
- c) La estabilidad de la mayoría de los diversos componen--tes del veneno suele ser elevada, lo cual facilita su estudio.

2. El Heloderma

Los saurios venenosos conocidos en el mundo pertenecen al género Heloderma, el cual se encuentra en el orden -- Squamata, el mismo orden al cual pertenecen las serpientes venenosas. Los saurios venenosos comprenden sólo dos especies, el Heloderma suspectum, el cual es conocido comúnmente con el nombre de "monstruo de gila". El Heloderma suspectum tiene -- dos subespecies el Heloderma suspectum suspectum y el Heloderma suspectum cinctum. El monstruo de gila es la especie más estudiada y se encuentra localizada principalmente en los Estados - Unidos, en las regiones del suroeste de Utah, sureste de Utah, sureste de Nevada, en Arizona, y el desierto de Sonora en México.

Por otra parte la otra especie conocida, es el -- Heloderma horridum. El Heloderma horridum tiene tres subespecies el Heloderma horridum horridum, el Heloderma horridum - alvarezii, y el Heloderma horridum exasperatum.

El Heloderma horridum se encuentra distribuido en -- toda la costa del Pacífico en México y se le conoce con el nombre común de monstruo de cuentas y de escorpión en algunas -- zonas. Las especies estudiadas en esta tesis pertenecen a la especie Heloderma horridum horridum, y fueron colectadas de la región de Chamela, Jalisco, en la República Mexicana.

3. Caracterización del Veneno del Heloderma

A) TOXICOLOGIA

a) Heloderma suspectum

La LD₅₀ del Heloderma suspectum ha sido determinada por varios investigadores, con los siguientes resultados:

Animal usado	Vía de ensayo	L.D. (ug/g)	Referencias
Ratón	Intravenoso	2.0	Tu y Murdock (1967)
Ratón	--	0.8	Mebis y Raudonat (1967)
Ratón	Intraperitoneal	3.0	Patterson (1967)
Ratón	Subcutánea	4.0	Styblova y Kornalik (1967)
Ratón	Intravenoso	0.4	Styblova y Kornalik (1967)
Rata	Subcutánea	14.0	Stanhenke et al. (1970)
Rata	Intracardial	1.0	Paterson (1967)

b) Heloderma horridum

Para la especie Heloderma horridum horridum se reportan las siguientes LD₅₀.

Animal	Vía de ensayo	L.D. (ug/g)	Referencia
Ratones	--	0.8	Mebis y Raudonat (1967)
Ratones	Intraperitoneal	2.0	Alagón et al. (1982)

B) CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL VENENO

a) El Heloderma suspectum

El veneno del "monstruo de gila" consiste principalmente de proteínas y de principios tóxicos que están en las -- fracciones no dializables. El veneno del Heloderma suspectum contiene actividades de hialuronidasa, fosfolipasa A₂, actividades liberadoras de cininas y actividades proteolíticas a -- pH 8.5 (Mebis y Raudonat 1967, Mebis, 1968), también contiene -- sodio, potasio, calcio, magnesio, trazas de aluminio, zinc y cobre (Mebis y Raudonat 1967).

No se detectó actividad hemolítica contra eritrocitos en este veneno. El Heloderma suspectum suspectum muestra actividades del tipo arginina esterases, así como peptidasas -- (Tu y Murdock, 1967); el veneno hidrolizó Ala-Gli, Ala-Fen, --

Ala-Ala, Gli-Gli, Gli-Leu, Gli-Tir, Gli-Val, Leu-Gli, Leu-Fen, Fen-Gli, Gli-Gli-Ala, Gli-Fen-Fen y Leu-Gli-Fen, los péptidos no hidrolizados fueron Gli-Asp, Gli-Glu, Leu-Val.

b) El veneno del Heloderma horridum horridum

El veneno del monstruo de cuentas se compone principalmente de proteínas; éstas se encuentran a una concentración de 80 mg/ml y con un pH de 6.7 a 7.0 (Alagón et al., 1982). El veneno contiene las siguientes actividades enzimáticas: -- fosfolipasas A₂, hialuronidasas, y benzoil-arginil-etil-éster (BAEE) hidrolasas, así como benzoil tirosil éster hidrolasas.

Las enzimas encontradas en este veneno son semejantes a las reportadas por Mebs (1972), Tu y Murdock (1967) y -- Styblova y Kornalik (1967) para el Heloderma suspectum. El veneno del Heloderma horridum horridum presenta una propiedad -- muy interesante, puesto que conserva su actividad tóxica aún -- después de ser llevada a 120°C durante varios minutos (Alagón et al., 1982).

C) ACTIVIDAD FISIOLÓGICA

a) Heloderma suspectum

Los primeros estudios fisiológicos datan desde 1897, Cuando Santenson (referido por A. Tu, 1977) inyectó el veneno

en ranas, ratones y conejos. En ranas observó una acción cura remimética en el centro respiratorio. En los ratones ocurrió disnea e insuficiencia respiratoria. Loeb et al. (1913), también reportó que la principal causa de muerte era insuficiencia respiratoria. Además mostró que el veneno causaba hemorragia en el tracto gastrointestinal, congestión y edema pulmonar.

Los perros y las ratas inoculadas con el veneno de Heloderma suspectum desarrollaron hipotensión, taquicardia y - dificultad respiratoria. También se observó una reducción en el flujo carotídeo, que era seguido de hipotensión y cambios - en las presiones intratorácicas postcavales (Patterson, 1967).

Se determinó que el veneno contiene un factor estimu-
lante del músculo liso no histamínico, y relativamente termo-
estable (Patterson, 1967). Por otra parte el veneno no tuvo -
efecto sobre el sistema de coagulación en gato y conejo --
(Patterson y Leen, 1969). La fracción con actividad hemorrági-
ca presentó actividad de arginina éster hidrolasa (Mebs, 1972),
la hemorragia ocurría en los intestinos, riñones y pulmones; -
la necrosis tubular observada parecía afectar a los túbulos --
contorneados distales y proximales. También se encontró en el
lumen de los túbulos y de las cápsulas de Bowman, un llenado -
de substancia hialina o granular.

b) El veneno del Heloderma horridum produce los siguientes -- síntomas de envenenamiento:

Disnea, convulsiones esporádicas, hemorragias en los ojos, el tracto digestivo, los pulmones, y finalmente produce falla respiratoria. Esta sintomatología fue descrita inicialmente por Loeb (1913).

4. Caracterización de los Componentes del Veneno del Heloderma

Recientemente se ha incrementado el interés en la -- purificación de los componentes de los venenos de los Heloderma. Algunos grupos de trabajo se han enfocado en la caracteriza-- ción de las enzimas, otros en los componentes del veneno y fi-- nalmente otros grupos, como el nuestro, en la búsqueda de toxi-- nas.

El primer trabajo de la purificación de una enzima -- del veneno fue hecha por Mebs (1969), en donde describe el ais-- lamiento de una Kalikreina, la cual libera cininas de plasmaglo-- bulinas e hidroliza ésteres de arginina. La esterasa y la ac-- tividad liberadora de cininas es bloqueada por Di-isopropil-- fluoro-fosfato (DFP), además de que la liberación de cininas -- es bloqueada por Benzofíl-arginil-etil-éster (BAEE) y Tosil-Ar-- ginil-Metiléster (TAME). El peso molecular reportado para esta enzima fue de 76,000 (d) (Mebs, 1969).

a) Actividad Esterasa:

En el veneno del Heloderma horridum se encuentran -- actividades de esterases detectadas con substratos sintéticos del tipo de Benzofl-Arginil-Etil-Ester (BAEE) y Benzofl-Tirosil-Etil-Ester (BTEE); de estas actividades se ha purificado una de ellas (Alagón y col. 1982).

La enzima purificada tiene un peso molecular de -- 65,000d. La purificación se ha llevado a cabo por procedimientos cromatográficos e donde se fracciona el veneno de acuerdo al peso molecular y finalmente en una columna de fenilsefaroza. La enzima pertenece al grupo de las proteasas inhibidas por -- los inhibidores de la Tripsina, de la familia Kunitz, también produce la liberación de cininas. La enzima ha sido denominada recientemente como Helodermatina (Alagón y col. , 1987).

b) La Hialuronidasa:

La hialuronidasa es una enzima presente en la mayo-- ría de los venenos de serpientes y de escorpiones. La función biológica de la enzima se ha planteado como un factor para permitir la difusión (spreading factor) de los demás componentes tóxicos y enzimáticos de los venenos. Esta teoría fue propuesta, por el grupo de Duran Reynals (1913).

La hialuronidasa, a pesar de ser un componente común en venenos de serpientes, solo cuenta con un reporte de purificación hasta el presente (Xu et al., 1980).

La hialuronidasa del veneno del Heloderma horridum horridum está constituida por una cadena polipeptídica de peso molecular de 63,000 y con un punto isoeléctrico de 5.0 y se reporta como termosensible (Tu, 1983). Adicionalmente se ha probado que la enzima promueve el efecto hemorrágico de algunas proteasas cuando se aplican conjuntamente por vía intradérmica en ratones de experimentación.

c) La Fosfolipasa A₂:

Los intentos de purificación de la actividad de fosfolipasa reportan que la enzima posee características que la hacen diferente de las enzimas reportadas a la fecha, y que hacen difícil su aislamiento (Sosa et al., 1986).

La enzima presenta un peso molecular mayor que las fosfolipasas conocidas, la comparación de la estructura primaria con más de 30 fosfolipasas muestra un alto grado de similitud. La región N-terminal tiene un 56% de homología con las fosfolipasas de los venenos de abejas. Pero es diferente en su punto isoeléctrico ácido (4.25), en comparación con el de las abejas, que es básico en general. Sin embargo, a pesar de

que la enzima es estructuralmente diferente, parece compartir secuencias peptídicas relacionadas al sitio de enlace para el Ca^{++} involucrado en la función.

Debido a la naturaleza de fósil viviente del saurio, la fosfolipasa revela una singularidad que puede ser un punto clave para entender las características de estas enzimas, durante la evolución del reino animal (Sosa et al., 1986).

d) La Gilatoxina:

La gilatoxina fue una toxina descubierta en el veno del Heloderma horridum, y Heloderma suspectum (Tu, 1981). El reporte de la toxina se hizo poco tiempo después de que -- nuestro grupo propusiera la existencia de un componente tóxico "per se" (Mochca y Possani, 1980). La gilatoxina es un nuevo tipo de toxina comparada con otras toxinas bien caracterizadas como de serpientes, escorpiones y abejas.

La gilatoxina es una proteína de 35,000 de peso molecular y con un punto isoelectrico de 4.25, el procedimiento de purificación involucra cromatografía de filtración molecular e intercambio iónico. Finalmente la purificación a homogeneidad es llevada a cabo por isotacosforesis (Tu, 1981).

La gilatoxina se describe como similar a la toxina hemorrágica G de Crotalus atrox, (Bjarnosony Tu, 1978) y a la

crototoxina de Crotalus durissus terrificus (Hendon, Frankel-Courat, 1971) en que son de peso molecular mayor de 20,000 y tienen un punto isoeléctrico ácido.

5. Componentes peptídicos del Veneno del Heloderma:

En 1982 (Raufman, 1982) se observó que el veneno del monstruo de gila producía un efecto secretorio en acinis pancreáticos dispersos del cuido y que además, causaba un incremento hasta de 50 veces de AMPc, e inhibía en forma dependiente de la dosis y competitivamente el enlace del péptido intestinal vasoactivo (VIP).

Los autores de tales trabajos postularon que el veneno no contiene factores que interactúan con receptores a VIP y que activan la enzima adenil ciclasa, por lo tanto se estimulaba la secreción enzimática de células acinares pancreáticas, sin embargo se han encontrado cuatro componentes bien caracterizados, a los cuales se les ha denominado:

- a) Helodermina, con un peso molecular de 5,900 d, un potente activador de la actividad adenilciclasa (como el VIP y la secretina) en membranas plasmáticas de ratas, incrementa los niveles de AMPc e inhibe la unión de ^{125}I -VIP en forma competitiva. La helodermina es un péptido de la familia de la secretina, VIP, péptido histidín-isoleucina (PHI) (Hoshino, 1984).

- b) El PSF o factor secretorio pancreático con peso molecular de 17,500 d. La función del PSF es la de estimular la secreción de la amilasa de acinis pancreáticos de rata en una forma más eficiente que CCK-8, bombesina, el carbacol y la secretina, pero sin incrementar la salida de $^{45}\text{Ca}^{++}$ y los niveles de AMPc (Dehaye, 1984).

La acción secretoria fue dependiente de la presencia de calcio extracelular y aleatoria a la secreción inducida por agentes como AMPc o por salida de Ca^{++} -- (Vandermeers, 1984).

- c) Las helospectinas I y II son péptidos que tienen 38 - y 37 residuos de aminoácidos, y cuya función es similar a la del VIP y a otros miembros de la familia del glucagón. La comparación de las helospectinas con el VIP muestra una homología del residuo 1 al 28, pero debido a que los miembros de la familia del glucagón tienen estructuras similares pero diferentes funciones biológicas, es posible que las helospectinas estén más cercanamente relacionadas a un péptido de mamíferos (Parker, 1984).

5. Propósito de esta tesis

Como todos los trabajos bioquímicos realizados anteriormente con el veneno del Heloderma horridum horridum reportaban la peresencia de enzimas hidrolíticas. (Tu y Murdock, - 1967; Mebs y Raudonat, 1968; Tu, 1977; Alagón et al., 1981)- nosotros propusimos buscar en este veneno otros componentes - proteínicos que pudieran actuar como tóxicos "per se" y que - por reconocer ciertos receptores específicos fueran capaces - de ser utilizados como herramientas para estudios de relación estructura función (toxinas y receptores).

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, dos nuevos tipos de sustancias fueron reportadas en el veneno de Heloderma, por otros autores trabajando en el mismo campo: polipéptidos de bajo peso molecular, con efecto sobre páncreas (Dehaye J., 1984) y la gilatoxina una proteína con un peso - molecular de 35 000 con efecto tóxico "per se" (Tu, 1981). Esto reforzó nuestro interés por la caracterización de la toxina hipotérmica que habíamos descrito con anterioridad al - trabajo de A. Tu, 1981.

De esta forma, el propósito del trabajo experimental, objeto de esta tesis fué:

- a) Aislamiento a homogeneidad del componente tóxico del veneno del Heloderma horridum horridum.
- b) Caracterización química de la toxina en cuanto a peso molecular, propiedades electrocinéticas, composición de aminoácidos y secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la molécula.
- c) Comparación de la estructura primaria con otras posibles proteínas conocidas.
- d) Estudio o descripción de algún tipo específico de efecto farmacológico tóxico (en este caso hipotermia).

II. MATERIAL Y METODOS

1. Extracción del Veneno

El veneno fue extraído de animales en cautiverio de la especie Heloderma horridum horridum, los cuales fueron capturados en la región de Chamela (Jalisco). Se realizaron varias extracciones cada dos meses, durante un año, a los animales considerados como adultos.

El procedimiento de extracción fue de acuerdo al método descrito por Leob (1913), el cual consiste en sujetar al animal por la cabeza y hacerlo morder un tubo de goma. El saurio saliva en forma abundante, entonces el veneno es colectado con una pipeta Pasteur directamente de la boca del animal.

El veneno obtenido se centrifuga a 18,000 Xg durante 10 min. en una centrifuga Sorval, con un rotor SS-34 max = 10.8 cm., en este paso el propósito es el de eliminar células de descamación presentes en el veneno y materiales no solubles. El sobrenadante se liofiliza directamente.

2. Reactivos y Resinas

Todos los reactivos fueron de grado analítico.

Las resinas cromatográficas provinieron de Pharmacia Fine Chemical, Upssala, Suecia (Sephadex G-75) y de Whatman Inc. Clifton, New Jersey (Carboximetil-Celulosa, CM-32, Dietil-amino-etil celulosa DEAE-32). Los tubos de diálisis Spectrapor Type 3 M (límite de exclusión de 3,500) fueron de Spectrum Medical Industries (Los Angeles, CA., U.S.A.).

3. Pruebas de Toxicidad

La determinación de toxicidad de las diversas fracciones a lo largo del proceso de purificación se hizo por inyección intraperitoneal de diferentes cantidades de proteína - en 0.1 a 0.4 ml de agua o de solución amortiguadora de acetato de amonio (0.05 M pH 7.00) .

4. Purificación de la Toxina

El veneno se solubilizó en 5 ml de amortiguador acetato de amonio 0.05 M pH 7.00 (en cada preparación se utilizaron 0.5 g de veneno). El veneno diluido se aplicó a una columna de Sephadex G-75 (medio) (0.9 x 200 cm) equilibrada previamente con 1500 ml del mismo amortiguador. Las condiciones de la cromatografía fueron a temperatura ambiente, presión hidrostática, flujo de 40 ml por hora, y se colectaron fracciones de 6 ml.

La fracción número dos (Fracción II) se aplicó a una columna de DEAE-32 (0.5 x 10 cm). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura ambiente, presión peristáltica de aproximadamente 40 psi y flujo de 40 ml por hora. La columna se equilibró previamente con 500 ml de amortiguador acetato de amonio 0.05 M pH 7.00. En este paso se obtuvieron dos fracciones: la primera fracción no se adsorbe a la columna en estas condiciones, la segunda fracción es eluida de la columna con un cambio en la molaridad del amortiguador de 0.05 M a 0.50 M de acetato de amonio pH 7.00. La fracción tóxica se dializó en membranas Spectrapor 3 M, contra amortiguador acetato de amonio pH 4.7 con cuatro cambios de 30 min de intervalo cada uno.

La fracción tóxica una vez dializada se ajustó a pH 4.7 y se aplicó a otra columna de CMC-32 1.0 x 20 cm de amortiguador acetato de amonio pH 4.7. La elución de la columna se llevó a cabo con un gradiente de 0 a 0.3 M de NaCl, con 250 ml para cada recipiente del sistema. Las recuperaciones cromatográficas se midieron espectrofotométricamente con base a la absorbencia a 280 nm. Para fines prácticos se asume que 1 unidad de absorbencia a 280 nm es equivalente a una concentración de proteínas de 1 mg/ml;

$$\begin{array}{l} 1 \text{ cm} \\ E_{280 \text{ nm}} = 1.0 \text{ mg/ml} \end{array}$$

5. Purificación de la Toxina, por Cromatografía Líquida de -- Alta Presión (HPLC).

Un método distinto también fue utilizado para la purificación final de la toxina. Este se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alta presión Hewlett Packard, utilizándose una columna Waters I-125 en amortiguador trietililamina-fosfato pH 2.25 en presencia de acetonitrilo al 10%, la columna se eluyó con un flujo de 1 ml y se monitorizó a 280 nM, las fracciones se colectaron de acuerdo a su orden de elución.

6. Electroforesis

El peso molecular y el punto isoeléctrico de la toxina, se determinó por medio de electroenfoque. El peso molecular se determinó en geles de poliacrilamida al 12.5%, 15% y en gradiente de 10% a 20% en presencia de SDS. (Laemmli, 1970). Los geles se tiñeron durante 6 hrs. con azul brillante de -- Coomassie al 0.2%, isopropanol al 25% y ácido acético al 10%.

También se analizaron las distintas fracciones cromatográficas por electroforesis en condiciones ácidas y en presencia de urea 8M, utilizando la técnica descrita por Reisfeld (1962). En esta técnica cada gel consta de una porción concentradora y una porción separadora, la primera está constituida por un gel con una concentración de 3% de acrilamida y un pH de 5.55, mientras que la otra, la más larga tiene una concen--

tración de 6% de acrilamida y de un pH de 4.8. Ambos geles -- contienen urea en concentración de 8M.

Las proteínas migran hacia el cátodo en un amortiguador de β -alanina-acético pH 4.42 (9 mA/gel 100 V). Las bandas de proteína se tiñen con azul de Coomassie G-250 (0.04%) en -- una solución de ácido perclórico al 3.8% durante 40 min., con un cambio, para después desteñir el gel con ácido acético al 10% y finalmente es fotografiado. Asimismo tanto el veneno, -- como la toxina fueron separados en geles a pH básico según -- Jovin et al. (1968).

El punto isoeléctrico se determinó bajo las condiciones descritas por Wriley (1971). Efectuando el procedimiento a corriente constante de 2 mA incrementando el voltaje hasta - 350 V, durante 3 hrs, a 20°C. Se utilizó mioglobina (pI = 6.8) como referencia, (rango de anfolinas 3 a 9).

7. Análisis de Aminoácidos

Las muestras destinadas para análisis de aminoácidos se procesan de la siguiente manera; después de ser evaporadas y concentradas en un aparato Savant, se hidrolizaron con 200 μ l de HCl por 24, 48 y 94 hrs. (Moore et al., 1963). El hidrolizado seco se redisolvió en amortiguador citrato de sodio 0.1 N, pH 2.2 (amortiguador de cargado) en 60 μ l y se transfirió a -- los cilindros de aplicación de la muestra. Los análisis se --

llevaron a cabo en un analizador de aminoácidos automático -- Durrum D-500, en la Unidad de Análisis de Aminoácidos y Estructura de Proteínas del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. La resolución de los aminoácidos (ácidos neutros y básicos) se realizó en una columna de intercambio iónico con una resina sulfonada. Los aminoácidos se detectaron colorimétricamente a 570 nm después de reaccionar con ninhidrina a -- 100°C (la prolina se detectó a 440 nm). La graficación e integración de los picos cromatográficos fue realizada por una computadora PDP-8.

Los valores de treonina y serina se extrapolaron al tiempo cero, debido a su labilidad para 20 hs. de hidrólisis dividiendo entre un factor de 0.95 y 0.9 respectivamente. Los resultados se expresan como relaciones molares.

8. Reducción y Vinilpiridilación

La reducción de la toxina se llevó a cabo con ditioneitol (DDT) (8.33 x sobre n moles de Cis presentes) en amortiguador Tris HCl pH 8.6 y clorhidrato de guanidina 6 M y con una concentración de EDTA de 1 mg/ml. Se añadió a la mezcla de reacción una gota de octanol como agente antiespumante para evitar la pérdida de la toxina durante el burbujeo con nitrógeno por 10 min. La muestra se incubó 2 hs. a 40°C. Después se añadió el agente alquilante (4-vinil-piridilo) en un exceso

de 1 a 10, se dejó por 30 min a temperatura ambiente.

La toxina ya reducida y vinilpiridilada se cromatografió en una columna de Sephadex G-50, usando ácido acético al 20% como eluyente.

9. Secuencia de Aminoácidos

La secuencia de aminoácidos se realizó en un secuenciador automático Beckman 890 M según el sistema de Edman y -- Begg (1967). El aparato realiza en la copa giratoria la reacción de Edman, la cual incluye tres etapas:

1a. Acoplamiento, la proteína o péptido previamente secado se disuelve en amortiguador quadrol (pH 9.0-9.5) y es -- acoplado por su extremo amino terminal con fenilisotiocinato -- para formar un derivado fenil tiocarbamilo del péptido. La -- reacción tiene lugar a 54°C. El benceno precipita la proteína y lava el exceso de fenilisotiocinato (F.I.T.C.) mientras que con acetato de etilo se arrastra el quadrol y los productos de degradación del F.I.T.C.

2a. Ruptura, por la acción del ácido heptafluorobutírico anhidro se separa el aminoácido N-terminal en forma de derivado anilino-tiazolinona.

3a. Conversión, las tiazolinonas de aminoácidos se convierte en sus respectivas feniltiohidantoinas (PTH) por -- reacción con HCl 1 N bajo atmósfera de N durante 10 min a -- 80°C.

Finalmente se procedió a identificar a los PTH: -- aminoácidos por cromatografía líquida de alta presión.

10. Inmunodifusión

Para inmunodifusión se utilizó un gel de agarosa al 1%. La agarosa se fundió a 60°C en amortiguador de fosfato - salino (PBS) (0.05 M pH 7.00) y se aplicó en una placa de 7 x 11 cm, posteriormente se dejó gelar la solución, para luego - continuar con las correspondientes perforaciones en el gel.

La aplicación de la toxina II.1.4 (1.3 µg y 10 µg) se hizo en los pocillos centrales y los sueros de las ovejas denominados 0, 145, 265 en los pocillos circundantes (las ovejas fueron previamente inmunizadas contra el veneno total de Heloderma horridum horridum de acuerdo al reporte de Alagón - et al. (1982)).

Al finalizar la inmunodifusión se lava la placa en una solución de PBS durante 10 min, y se seca por presión con papel filtro Whatman No. 1. El proceso se efectúa tres veces,

y luego se deja secar completamente. La placa se tiñó en una solución de negro amido 10B (amido black) al 0.5% durante 6 min. Para fijar y desteñir se utiliza una solución de ácido acético al 10%. Finalmente, se deja secar la placa durante varias horas, al cabo de las cuales se observaron las bandas de precipitado con un contraste adecuado.

11. Ensayos Enzimáticos

a) La actividad de esterasa fue medida espectrofotométricamente con Benzoil-arginil-etil-éster-hidrolasa. Estos ensayos fueron llevados a cabo a 25°C por la adición de la -- fracción a analizar (Enzima) a una celdilla que contiene 50 mM CaCl_2 , 1 mM $\text{B}_2\text{-Arg-OEt}$, (BAEE) y 0.5 mM de amortiguador Tris-HCl pH 7.8 y registrando el cambio de absorbencia a 255 nm a -- intervalos de 10 segundo, por un período de 2 minutos en un vó -- lumen total de 1.5 ml, en donde una unidad de actividad enzimá -- tica es definida como la cantidad necesaria para hidrolizar -- 1 μmol de sustrato en 1 min. en tales condiciones (Alagón, -- 1982).

b) La actividad de hialuronidasa fue medida por el método turbidimétrico descrito por Tolksdorf et al. (1949) a 25°C. Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μg de ácido hialurónico por minuto a 25°C en 200 μl de una solución de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido

hialurónico en amortiguador de fosfato de sodio pH 5.3.

c) La actividad de fosfolipasa A₂ fue determinada por el procedimiento que usa yema de huevo como sustrato (Shuloah, et al., 1973). Una unidad de actividad de fosfolipasa es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 umol de ácido graso por minuto a pH 8.00 y 25°C en 3.0 ml de una solución de yema de huevo al 10% en 0.1 M de NaCl.

12. Determinación del Efecto Hipotérmico en Ratonés

La fracción II.1.4 (toxina) fue ensayada en una serie de ratones. Se tomaron 10 ratones albinos y se les inyectó 50 µg de toxina por vía intraperitoneal. La temperatura de los ratones fue medida como control antes de ser inyectados. Y se encontró que la temperatura media normal era de aproximadamente 39.5°C. (Vía rectal). La temperatura después de inyectar la toxina, fue medida con intervalos de 10 min.

13. Los Efectos en la Tensión Activa de Músculo Papilar Cardíaco de rata

Los experimentos se llevaron a cabo en músculo papilar del ventrículo izquierdo de rata, el cual se obtuvo con una disección rápida, colocándolo en un baño a 29°C que contenía 1 ml de solución modificada de Krebs-Henselet con burbujeo

continuo de O₂ al 95% y CO₂ al 5%.

El músculo es puesto en forma vertical en el baño, un extremo es unido a la base de la celda de ensayo y la otra a un transductor ("strain-gauge"). La preparación es estimulada eléctricamente con un pulso cuadrado de 0.16 Hz y 2 ms de duración. El músculo es continuamente estimulado hasta obtener un período de estabilización antes de aplicar la muestra -- por cerca de una hora (la técnica usada es de acuerdo a los -- procedimientos desarrollados por el Ing. Cruz Martínez del Baylor College of Medicine, Houston, Tx).

El voltaje estimulatorio se ajusta ligeramente más -- alto que el umbral, y se permite otro período de estabilización para obtener una meseta de tensión activa (respuesta al estímulo). Esta tensión activa desarrollada es la referencia ó el -- control designado en la curva de dosis-respuesta de la gráfica.

Asimismo para el caso de músculo liso de aorta de ra ta, se utilizó soluciones de potasio en diferentes concentraciones para despolarizar la preparación (colaboración del Dr. Tom Poder, del Baylor College of Medicine, Houston, Tx).

III. RESULTADOS

1. Caracterización General del Veneno

El veneno del Heloderma horridum horridum produce - síntomas de disnea, convulsiones esporádicas, hemorragias en el tracto intestinal, congestión, edema pulmonar, finalmente paro respiratorio, estos síntomas fueron ya descritos por -- Leob (1913).

El veneno fue estudiado por electroforesis en diferentes condiciones, el veneno presenta un patron electroforético en presencia de SDS de una complejidad de por lo menos 21 componentes, que se muestra en la figura (6). Por otra - parte el veneno analizado por la técnica descrita por Reis--feld et al. (1962), en geles cilindricos de poliacrilamida - al 7.5% en condiciones de pH ácido (4.7) y en presencia de - urea mostró un contenido de 15 componentes (fig.8), finalmen- te se analizó el veneno en condiciones de pH básico(8.2) (Jo- vin et al. 1964). En este ultimo sistema se puede apreciar una complejidad de por lo menos 18 componentes, estos datos confirman los descritos por Alagón y col. (1982). Sin embar- go, en este último sistema, la toxina hipotérmica no es bien resuelta debido a su punto isoelectrico de 6.8, por lo que - solo se tomará como referencia.

El veneno tuvo las siguientes actividades enzimati- cas, Benzoil-Arginil-Etil-Ester-hidrolasa, fosfolipasa, hialu

ronidasa, sin embargo las fracciones correspondientes a la toxina hipotérmica no mostraron las actividades antes mencionadas (Tabla 1).

Tabla 1
ACTIVIDADES ENZIMATICAS Y TOXICAS DEL VENENO DEL
Heloderma horridum horridum

Componente	Veneno total	II	II.1	II.2	II.1.4	II.1.5
Toxicidad	+	+	+	+	+	-
Fosfolipasa	+	+	-	+	-	-
Bz-Arg-OE hidrolasa	+	+	-	+	-	-
Hialuronidasa	+	-	-	-	-	-

2. Purificación de la Toxina Hipotérmica

El primer paso en la purificación de la toxina fue la separación de los componentes del veneno total por filtración en gel, utilizando una columna de Sephadex G-75, en donde se resolvieron 5 componentes (Fig. 1) la fracción número I contiene las actividades enzimáticas de Benzoil-arginil-etil-éster-hidrolasa. La fracción II es la que contiene la mayor actividad esterasa y un poco de las demás actividades. La fracción II es la que contiene la toxina hipotérmica.

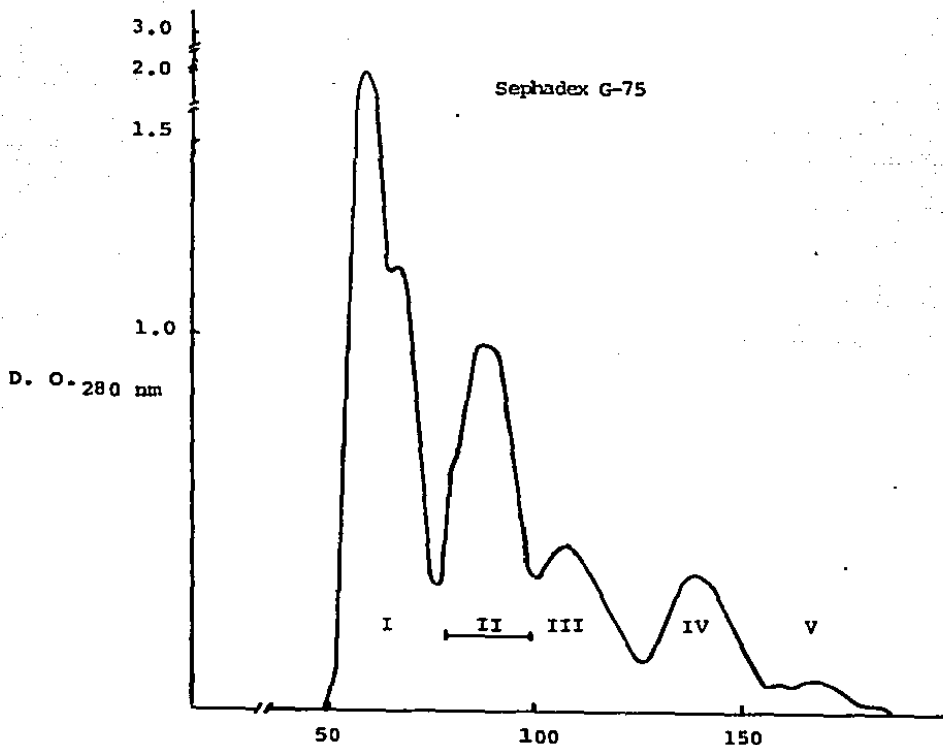


Fig. 1. Cromatografía en Sephadex G-75 del veneno soluble de Heloderma horridum horridum.

500 mg de veneno total se solubilizaron en amortiguador de acetato de amonio 0.05 M pH 7.00 y se aplicaron a -- una columna de Sephadex G-75 medio de 0.9 X 160 cm a -- temperatura ambiente, la columna se eluyó con el amortiguador antes mencionado, con un flujo de 40 ml por hora, la fracción II se junto de acuerdo a la barra horizontal.

El volumen de las fracciones fue de 6 ml y la densidad optica a 280 nanometros.

La fracción II se procesó posteriormente en una columna de DEAE 32 (fig. 2) equilibrada a pH 7.00. En esta figura se muestra la separación de las fracciones; F.II.1 -- que contiene la toxina hipotermica y F. II.2, la cual contiene las enzimas proteolíticas.

La fracción II.1 se dializó y ajustó a pH 4.7 en presencia de amortiguador de acetato de amonio y se aplicó a una columna de CMC 32 (fig. 3), en este paso se obtuvo -- un perfil cromatografico en el que el componente II.1.4 corresponde a la actividad tóxica hipotérmica. El componente más básico (II.1.5) no mostró ninguna actividad biológica positiva (toxicidad) en los sistemas que hemos estudiado. - Las fracciones procesadas en las columnas, muestran la recuperación cercana al 100% en Sephadex y de 93% de la columna de DEAE 32, sin embargo la recuperación bajó para el caso de la columna de CMC 32, a 84% como se muestra en la tabla II.

Fig. 2

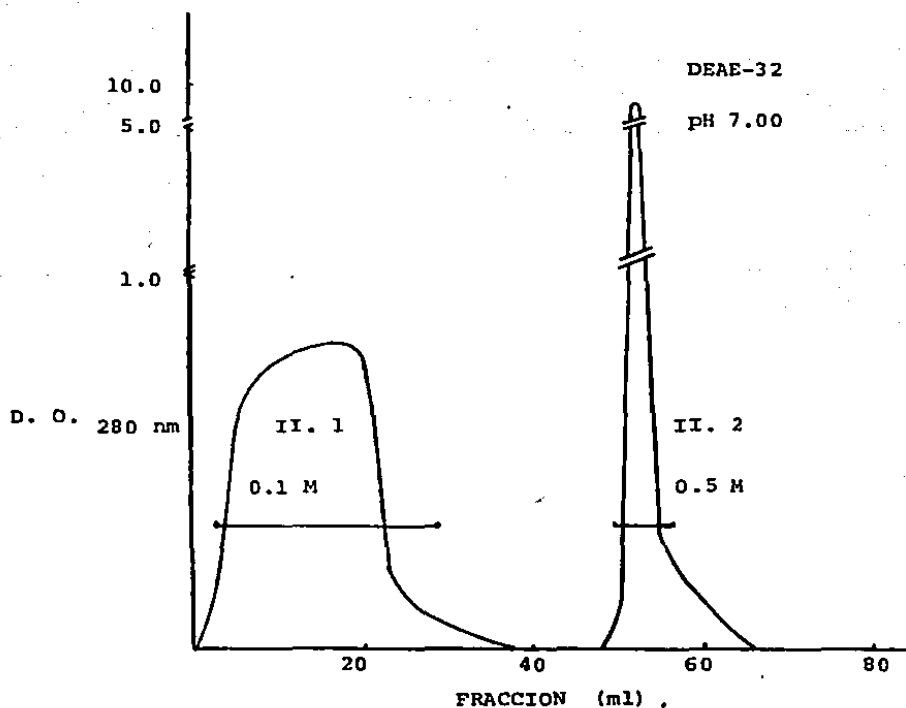


Fig. 2. La fracción de Sephadex G-75 se aplicó a una columna de DEAE-32 (0,5 x 10 cm) a temperatura ambiente con un flujo de 40 ml/hora. Se colectaron 6 ml por tubo y se juntaron de acuerdo a las barras horizontales, obteniendo las fracciones II.1 y II.2.

La columna fue tratada de acuerdo a las condiciones descritas en el texto.

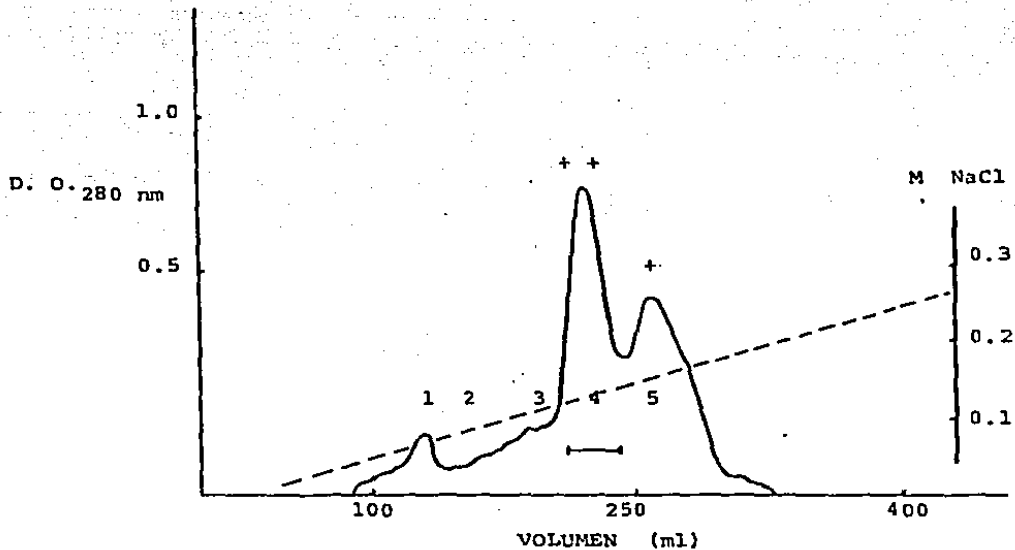


Fig. 3. La fracción II.1 se aplicó a una columna de CMC 32 (0.5 X 10 cm) a temperatura ambiente y con un flujo de 40 ml/hr. Se eluyó la columna con un gradiente salino de 0 a 0.3 M en amortiguador de acetato de amonio 0.05 M pH 4.7, la grafica muestra el componente 4 y 5 como principales, la fracción II.I.4 muestra toxicidad hipotérmica (++) (4).

3. Purificación por Cromatografía Líquida de alta Presión

La fracción II.1.4 de la columna de CMC-32 es procesada a través de una columna de cromatografía líquida de alta presión de tipo filtración en gel, en las condiciones que se describen en material y métodos, con el objetivo de quitar los pequeños contaminantes que aun se observan en la fracción por criterios electroforéticos. En estas condiciones, la toxina se comporta como una proteína de peso molecular entre el citocromo C y la albumina bovina, con un tiempo de retención de 7.45 min. (Fig. 5).

4. Análisis Electroforético

El análisis electroforético en presencia de S.D.S. (Fig. 6) mostró una sola banda en el componente II.1.4 de CMC-32, la toxina migra entre los marcadores de peso molecular : anhidrasa carbonica de 31000 y el inhibidor basico de tripsina 21500 por lo que aparenta un peso molecular aproximado de 26000.

De acuerdo a la técnica de Reisfeld (1965) se analizó la pureza del componente II.1.4, en estas condiciones se observo una sola banda que migra como un componente basico (Fig. 7).

TABLA II

RECUPERACION Y TOXICIDAD DE LOS COMPONENTES CROMATOGRAFICOS

Columna	Fracción	% Recuperación	Toxicidad
Sephadex G-75	I	41.4	Tóxico
	II	39.2	Letal
	III	9.8	Negativo
	IV	2.6	Negativo
	V	1.3	Negativo
	Tubos laterales	5.7	Negativo
	Total	98.0	
DEAE - 32	II.1	21.0	Letal
	II.2	69.0	Letal
	Tubos laterales	3.9	Negativo
	Total	93.9	
CMC - 32	II.1.1	4.2	Negativo
	II.1.2	2.8	Negativo
	II.1.3	4.3	Negativo
	II.1.4	36.0	Letal
	II.1.5	38.7	Negativo
	Total	84.0	

Tóxico = Produce manifestaciones clínicas de envenenamiento.

Letal = Produce la muerte en un periodo de 2 hrs.

Todos los calculos se hicieron por absorbencia a 280_{nm}.

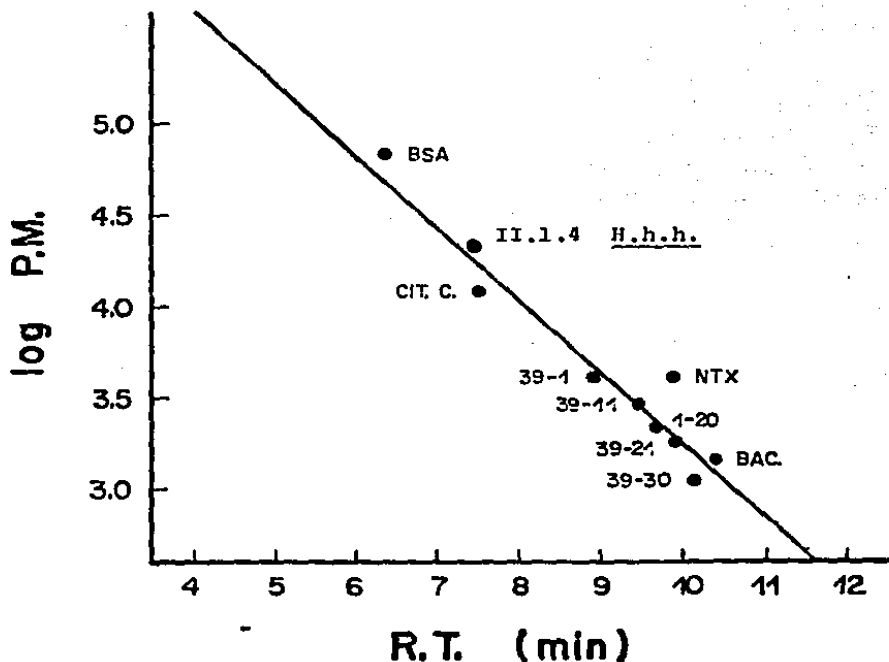


Fig. 4. Curva de calibración (en HPLC) de una columna de exclusión molecular, usada para purificar finalmente la toxina de Heloderma.

La columna es de tipo Waters I-125. Los marcadores usados son BSA, (Albúmina) (Cit C (Citocromo) - NTX (Noxiustoxina). Bac (Bacitracina) y (los números indican los fragmentos peptídicos de la Noxiustoxina).

Las condiciones de corrida se describen en la siguiente figura.

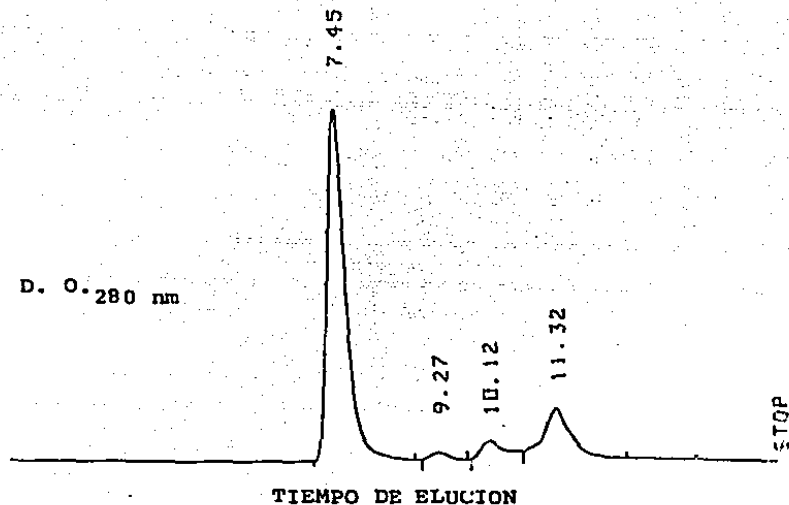


Fig. 5. Cromatografía líquida de alta presión de la toxina - II.1.4.

Se aplicó : 50 μ l. de una solución con $A_{280} = 1.0$ en una columna Waters I.125 usando amortiguador de -- trietilamina-fosfato pH 2.25 con acetonitrilo en una relación 2:1 V/V. Se usó un aparato Hewlett Packard con un flujo de 1 ml/min. La toxina eluyó a 7.45.

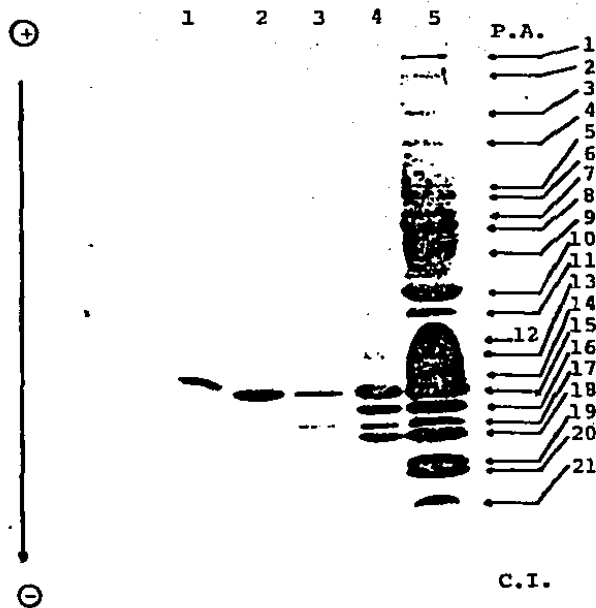


Fig. 6. Electroforesis de las fracciones del veneno de Heloderma horridum horridum. En el carril 5 se encuentra el veneno total (50 μg), el carril 4 es la fracción II de Sephadex G-75 (20 μg) y el carril 3 la fracción II.1 de DEAE-32 (10 μg) y en el carril 2 la fracción II.1. Toxina (10 μg) de CMC-32, y en el carril 1 la fracción II.1.4 (10 μg) de la misma columna. (P.A. significa punto de aplicación C.I. indica el colorante indicador).

El gel contiene acrilamida al 15% y SDS.

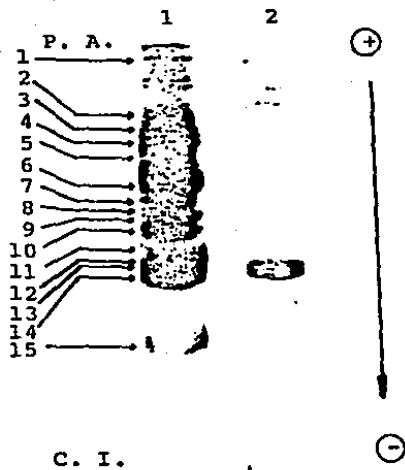


Fig. 7. Electroforesis del veneno total de Heloderma horridum horridum, y la toxina II.1.4 en con diciones ácidas segun Reisfeld (1962).
Se aplicaron 100 ug de veneno total y 10 ug de toxina II.1.4 de acuerdo a las condiciones descritas en el texto.
(P.A. punto de aplicación, C.I. colorante in dicador).

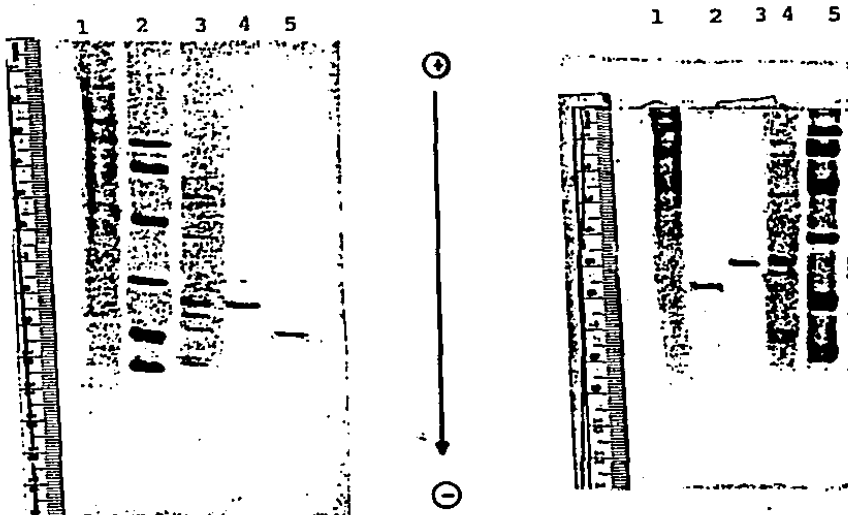


Fig. 8. Electroforesis de las fracciones cromatograficas del veneno del Heloderma horridum horridum en presencia de S.D.S.

La figura de izquierda corresponde a un gradiente de acrilamida de 10% a 20%, en el caso de la derecha es de 15% de acrilamida.

Para los carriles 2 y 5 de izquierda y derecha respectivamente contienen marcadores de peso molecular que son; Fosforilasa B 92500, B.S.A. 66200, Ovoalbumina 45000, Anhidrasa carbonica 31000, Inhibidor de tripsina de soya 21500, Lisozima 14400. En los carriles 3 y 4 (de izquierda y derecha) estan 20 μ g de veneno total, asimismo en 4 y 3 corresponden a 5 μ g de la toxina II.1.4, para los carriles 5 y 2 se coloco fracción II.1.5.

(En el carril 1 de ambos geles se tomo como referencia con marcadores de peso molecular alto).

5. Composición de Aminoácidos

Con este objeto se dializaron las fracciones homogéneas contra agua y finalmente se liofilizaron, procediéndose a caracterizarlas químicamente por análisis de aminoácidos. Los resultados del análisis de aminoácidos de este componente tóxico se muestra en la tabla - III, el análisis indica que se trata de un polipeptido de características ácidas que posee aproximadamente 221 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 25,600 d. La composición de aminoácidos indica un contenido de más del 25% de ácidos aspártico y glutámico (en la molécula) asimismo un alto contenido de prolina 25, por otro lado se cuenta con 20 cisteínas y 5 metioninas.

TABLA III Composición de aminoácidos de la toxina II.1.4 del veneno de Heloderma horridum horridum.

Aminoácido	Hidrólisis a 48 hr.	Residuos
Asp	29.82	30
Tre	20.03	20
Ser	12.36	12
Glu	26.26	27
Pro	24.96	25
Gli	13.58	13
Ala	11.16	11
Val	6.80	7
Met	5.52	5
Ile	7.93	8
Leu	4.03	4
Tir	6.98	7
Fen	2.35	2
His	4.22	4
Lis	16.40	16
Arg	10.35	10
Cis	20.00	20
Trp	N.D.	--
	Total	221

Peso molecular aproximado * 25 415

a) N.D.=no determinado

b) * = Peso molecular calculado sin triptofano.

6. Determinación de la Secuencia N-Terminal de la Toxina

Para la determinación de la secuencia N-terminal de la toxina, se utilizó un aparato Beckman 890 M, como se mencionó en la sección de material y métodos. La fracción II.1.4 de la columna de CMC 32 pura se procedió a reducirla y vinilpiridilarla, la separación de los productos colaterales de la reacción se muestra en la figura 9, posteriormente se tomaron aproximadamente 2 nmolas y se aplicaron al microsecuenciador Beckman 890M, el aparato realizó 20 ciclos los cuales se identificarón como se muestra en la figura 10.

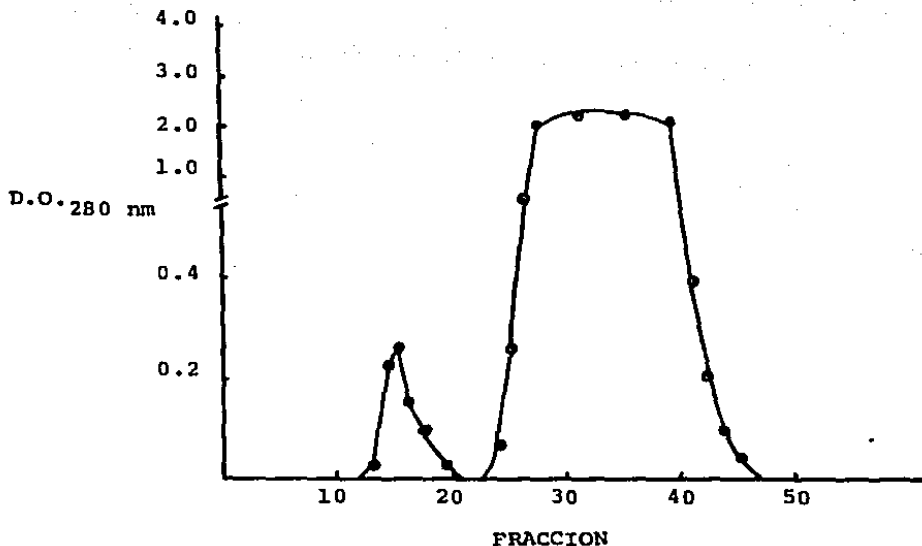


Fig. 9. Filtración en Gel de la toxina II.I. de Heloderma horridum horridum reducida y vinilpiridilada.

En una columna de Sephadex G-50 de 0.9 x 60 cm se aplicó 1.0 mg de toxina (39 nmoles) reducida y vinilpiridilada, en un volumen de 1.0 ml de mezcla de reacción. Se eluyó con AcOH al 10% con un flujo de 20 ml/hora, colectándose fracciones de 2.0 ml. Se eluyó en primer término la toxina y en segundo los reactivos excedentes.

7. Determinación del Punto Isoeléctrico

Para encontrar el punto isoeléctrico de la toxina, se utilizó electroenfoque analítico en geles cilíndricos, de acuerdo a la técnica descrita por Wringley, (1975). En donde se aplicaron 20 µg de toxina II.1.4 a un gel de poliacrilamida al 7.5% y una mezcla de anfolinas de un rango de pH de 3 a 9, como referencia se utilizó a Mioglobina (P.I. 6.8), los resultados mostraron que la toxina tuvo un enfoque en el gel similar a la Mioglobina, es decir aparentó un punto isoeléctrico de 6.8.

Para lograr el enfoque en el gel, se aplicó corriente constante de 2 mA, y se incremento el Voltaje hasta 350 V, durante 3hr a 20 °C. (Fig. 11).

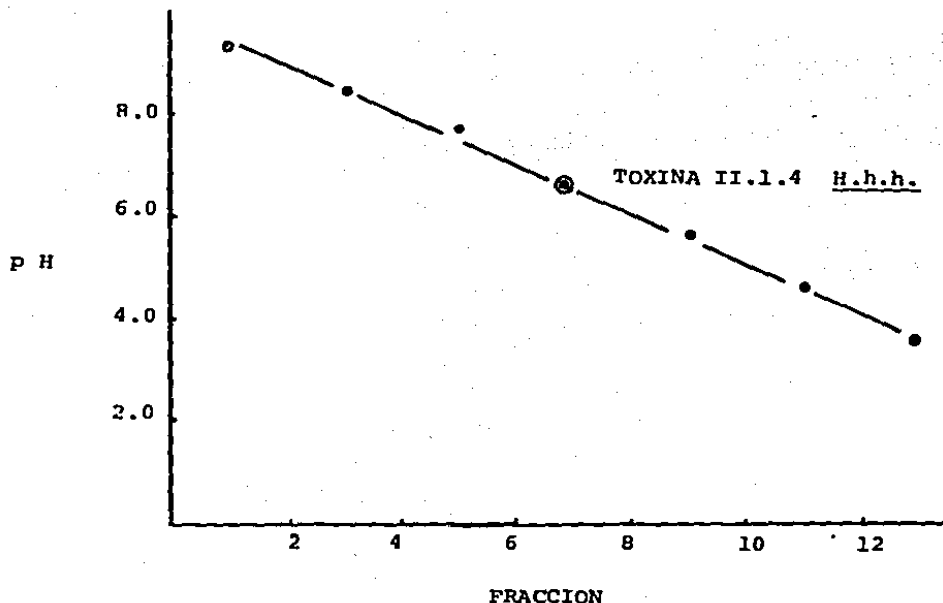


Fig. 11. Electroenfoque analítico de la toxina II.1.4 de Heloderma horridum horridum.

Se utilizaron geles cilíndricos, en un gel se aplicaron 20 μg de toxina y en otro 10 μg de Mioglobina como referencia, para los dos geles se utilizó un gradiente de anfolinas de 3 a 9 y una concentración de acrilamida de 7.5 %

Para establecer el gradiente de pH se estableció el procedimiento a corriente constante de 2 mA, incrementando el Voltaje hasta 350 V, durante 3 hr., a 20 °C.

En la grafica se observa el pH de las fracciones del gel que se toma como referencia.

8. Inmunodifusión de la Toxina

Para obtener un criterio inmunológico de pureza de la toxina se utilizó inmunodifusión. Mediante el uso de sueros inmunes provenientes de tres ovejas (numeradas 0, 145 y 264). Estas ovejas fueron inmunizadas previamente en el laboratorio, en contra de veneno soluble total de Heloderma horridum horridum (Alagón y col. 1982). En el centro se colocó la toxina de Heloderma horridum horridum y en los pocillos circundantes los sueros, según se describe en la figura.

Una vez llevada a cabo la inmunodifusión, (12 horas) se observó una sola banda de precipitado en los pocillos 1, 2, y 3, el pocillo numero 1 correspondiente a el suero de la oveja 0 mostro la banda mas intensa de precipitado.

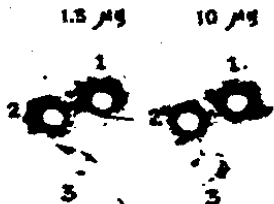


Fig. 12. Inmunodifusión con suero anti-veneno de Heloderma horridum horridum.

En los pocillos centrales se aplicaron 10 μ l de toxina, correspondientes a 1.3 y 10 μ g.

En los pocillos circundantes se aplicaron las siguientes muestras de izquierda a derecha, 1 suero de oveja 0, 2 oveja 145, 3 oveja 254, en todos se utilizó 10 μ l y un control de PBS.

Se dejó la inmunodifusión durante 12 horas a temperatura ambiente. Se tiñó con Negro Amido al 0.5%.

9.- Efecto hipotérmico de la Toxina

El efecto hipotérmico de la toxina se verificó por medida directa de la temperatura en ratones de experimentación, mediante la introducción de un termómetro clínico en el recto de los animales. El tiempo de respuesta del termómetro utilizado fue del orden de 60 segundos.

Inicialmente se tomaron 10 ratones albinos adultos de la cepa Balb/C, que en promedio, mostraron un valor de -- 39.5 °C, este valor se tomo como control de temperatura corporal para el ensayo.

Antes de medir el efecto causado por la toxina se inyectaron ratones con varias dosis de toxina pura (de 30 a 100 µg por ratón). Se verificó que la dosis de 50 µg de toxina por 20 gramos de peso corporal de ratón, corresponde aproximadamente a la dosis letal media (L.D.₅₀). Por esta razón, a un nuevo grupo de 10 ratones se les inyectaron 50µg de toxina y se midió el abatimiento de la temperatura corporal con intervalos de 10 min, para cada ratón, hasta 40 min. A partir de este tiempo los ratones empiezan a morir por efecto de la toxina. De esta forma en la Fig. 13 se graficó el valor de disminución de la temperatura en función del tiempo para los ratones inyectados con toxina. Se indica también en la grafica un promedio de la medida. La variación de temperatura es bastante homogénea en la población inyectada y el aba

timiento de la temperatura corporal fue reproducible para la misma población estudiada.

Cuando la temperatura alcanzó valores alrededor de 35 °C se observó la muerte algunos ratones, pero hubo animales que resistieron hasta temperaturas inferiores a 34°C en donde la precisión del termómetro utilizado no permitió continuar midiendo la temperatura.

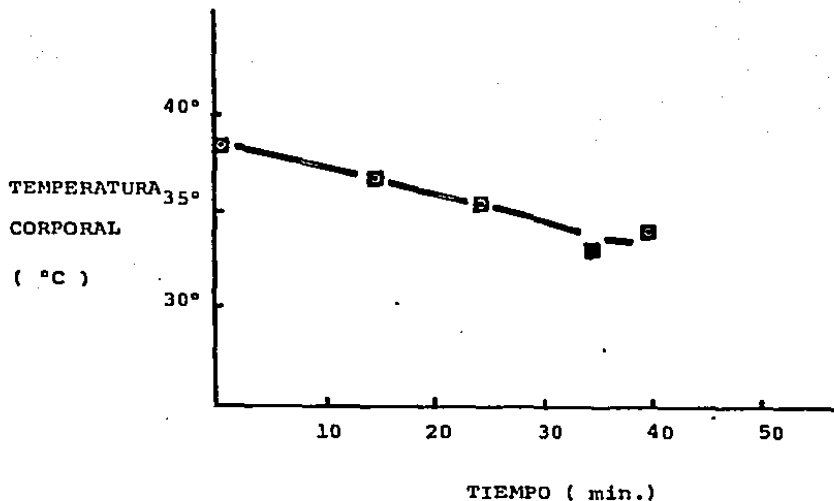


Fig. 13. Curva de disminución de la temperatura en ratones causada por la toxina II.1.4.

Se utilizaron 50 µg de toxina de Heloderma horridum horridum en cada raton albino (cepa Balb C.). Se midió la temperatura por vía rectal, estableciendo primero el promedio de temperatura basal, y posteriormente se les tomó la temperatura, a intervalos de 10 a 20 min.

10. Efectos Sobre Músculo Papilar de Corazón de Rata

La toxina fue probada en músculo cardíaco de -- rata, mediante la aplicación de fracción II.1.4, a una celdilla que contenía un músculo papilar de ventrículo izquierdo de rata disecado y en una solución Ringer, - como se describe en la sección anterior, el ensayo se hizo con dos concentraciones diferentes de toxina de 136 y 408 nM.

Una vez aplicada la toxina se observó el efecto sobre la tensión activa del músculo durante 40 minutos , el cambio que se observó en estas condiciones, fue - la disminución de la tensión activa del músculo en un 21% con respecto al control, (Fig. 13).

El efecto que produce la nimodipina en este tipo de preparaciones es la disminución de la tensión activa en un 100%; La nimodipina es un derivado de la - nifedipina y ambos son inhibidores del canal de Ca^{++} .

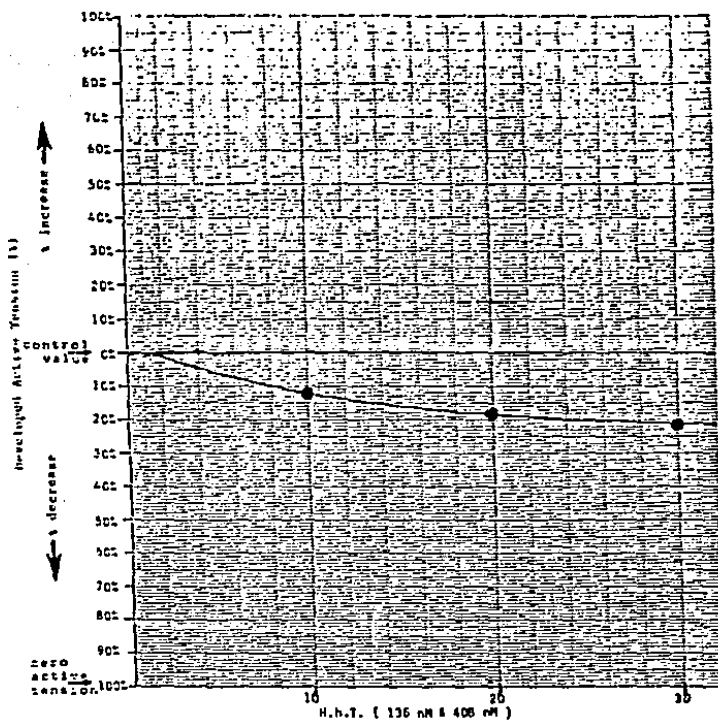


Fig. 13. Esta grafica muestra el resultado de dos preparaciones musculares, de músculo papilar de ventrículo izquierdo de rata.

Las lecturas fueron tomadas 10, 20, 30 minutos - despues de la aplicación de la muestra, las lecturas de ambas preparaciones fueron un promedio en los puntos 10, 20 y 30 minutos y graficadas.

Ambas preparaciones presentaron una meseta de 21% de bajo del control.

(Para este experimento conté con la ayuda del Dr. Tom poder del Departamento de Fisiología del del Baylor College of Medicine de Houston Texas E.U.)

IV. DISCUSION

La mayoría de los estudios en venenos de animales se han concentrado en las serpientes venenosas, especialmente aquellas que poseen neurotoxinas poderosas, así como citotoxinas, miotoxinas, y toxinas hemorrágicas (Tu, 1977, 1981). -- Debido a la enorme cantidad de trabajos relacionados con los venenos de serpientes y alacranes, la información con respecto al veneno del Heloderma horridum horridum es relativamente escasa. Una de las razones por las que el veneno de este saurio no ha sido bien estudiado es la dificultad para conseguir cantidades suficientes de veneno (Tu, 1987, 1981, 1983), y -- por estar su distribución geográfica limitada a América del Norte. Probablemente el hecho de que este animal es lento y causa pocos accidentes por modedura también ha ayudado a que su veneno sea poco estudiado.

El Veneno del Heloderma horridum horridum

El estudio del veneno del Heloderma horridum horridum se ha incrementado en los últimos años, los trabajos que se han publicado se enfocan en su mayoría, a la caracterización de los componentes peptídicos del veneno. Debido a la naturaleza fósil del saurio es posible hacer correlaciones filogenéticas de los péptidos con actividades secretadoras y de activación de AMPc que se encuentran en el veneno (Vandermeers, 1987).

Sin embargo, también en el curso de los últimos años, se ha incrementado el interés en la purificación de las principales actividades enzimáticas detectadas en el veneno, como son: Una esterasa, fosfolipasa A₂ y, hialuronidasa.

Nuestro grupo de trabajo se interesa por las toxinas en los venenos de animales, debido a su posible utilidad como herramientas en estudios de las neurociencias. De los venenos estudiados, el del Heloderma mostraba posibilidades de contener toxinas, por lo que se desarrolló una estrategia de purificación para toxinas, que consiste en fraccionar el veneno inicialmente por peso molecular, y posteriormente remover las enzimas presentes en las fracciones por cromatografía de intercambio iónico, (DEAE-32). En estas condiciones, la mayoría de las enzimas proteolíticas por tener puntos isoeléctricos ácidos quedan adsorbidas a la resina y las toxinas son eluidas en el volumen de cargado debido principalmente a su naturaleza en general básica, como discutiremos adelante.

En esta tesis se muestra la existencia de una nueva toxina presente en el veneno del Heloderma horridum horridum. Esta produce hipotermia al ser inyectada en ratones albinos, -- tiene un peso molecular de 26,000 daltones, y un punto isoeléctrico de 6.8 ± 0.2 .

Purificación de la toxina de Heloderma horridum horridum

La estrategia básica que se utiliza para la obtención de la toxina en este trabajo, consta de cromatografía de filtración en gel, seguida de intercambio aniónico e intercambio catiónico.

El fraccionamiento del veneno muestra patrones cromatográficos constantes, que solo varían en proporción de acuerdo al estado de preservación del veneno.

La toxina se encuentra en la fracción II de la columna de Sephadex G-75 (Fig. 1), la cual eluye en un peso molecular similar a la albúmina bovina cuando esta última se utiliza como marcador de la columna.

Con objeto de remover las proteasas de la fracción II se utiliza DEAE-32 (Fig. 2), las proteasas de esta fracción son los componentes de mayor proporción (70%) de la proteína presente.

Una vez libre de proteasas, la fracción II se fracciona en CMC-32, en donde el componente II,1,4 contiene la actividad tóxica hipotérmica (Fig. 3), asimismo el componente II,1,5 se muestra tóxico, sin embargo esto es aparentemente a contaminación con la fracción anterior.

Finalmente para remover los pequeños contaminantes de la fracción tóxica, se utilizó cromatografía líquida de alta presión. La recuperación de la toxina al final de la purificación es aproximadamente de 1% con respecto al veneno total.

La fracción I corresponde aproximadamente al 40% del veneno total; esta proporción es variable dependiendo de la preservación del veneno. Esta fracción contiene principalmente enzimas del tipo de fosfolipasas, hialuronidasa y esterasa. Esto es importante puesto que debido a la presencia de enzimas proteolíticas en el veneno se esperarían cambios del patrón, cromatográfico, dependiendo del estado de preservación del veneno.

Esta fracción es tóxica en ratones solo en cantidades elevadas (200 µg de protefina). De esta fracción se ha llevado a cabo la purificación de la esterasa, la cual se ha denominado como helodermatina, por el grupo de Alagón y col. (1986). Esta enzima pertenece a la familia de las serinproteasas, y es una enzima semejante a kalikrefina ("Kallikrein like").

Por otro lado la actividad de fosfolipasa A₂, que se encuentra en esta fracción, se ha logrado purificar (B. Sosa (1986). La fosfolipasa tiene un peso molecular de --

19,600 d y posee cierta homología (56%) de la región N-terminal con la fosfolipasa de abejas. Sin embargo, difiere en -- que tiene un punto isoeléctrico que es ácido, en vez de básico como en las fosfolipasas de las abejas. Además, la fosfolipasa de Heloderma tiene un peso molecular mayor. La fosfolipasa del Heloderma horridum horridum es del tipo A₂ con -- dependencia de Ca⁺⁺.

Por otro lado, también se estudió la fracción II.2, se procesó en una columna de DEAE-32 de donde se obtuvieron -- dos fracciones principales, de las cuales la más ácida mostró las actividades esterásicas detectadas de la fracción II. -- Este pico cromatográfico ocasiona la muerte a ratones albinos, con la característica de producirles hemorragia en el tracto -- digestivo, y exoftalmia. De acuerdo a los datos reportados en -- la literatura, esta fracción correspondería a la que A. Tu -- (1981) emplea para obtener la gilatoxina.

Análisis Electroforéticos

El análisis electroforético de los componentes llevado a cabo en diferentes condiciones, muestra un patrón consistente. Los primeros estudios al respecto fueron hechos por A. Alagón (1982). En este trabajo se concluye, una complejidad del veneno de 18 componentes; este estudio fue hecho en -- condiciones básicas con geles TRIS-glicina a pH 8.3. El vene

no muestra cambios en su patrón electroforético, bajo estas condiciones, en diferentes etapas del año y se compara con -- extracciones de veneno de animales recién capturados. Esto -- es importante porque se había planteado la posibilidad que -- algunos componentes tóxicos disminuyeron su producción de -- acuerdo al medio ambiente del animal (A. Tu (1977) referido -- por Alagón (1982)).

En este trabajo se analizaron también las fraccio-- nes del veneno por técnicas electroforéticas que incluyen -- condiciones de pH ácidos y básicos, no desnaturalizantes. El análisis del veneno en condiciones nativas básicas muestra -- similitud al descrito por A. Alagón (1982). Por otra parte en condiciones de pH ácidas, el patrón presenta una complejidad de por lo menos 15 componentes (Fig. 7). Una vez purificada, la toxina hipotérmica se define bien en el sistema ácido en donde se comporta como una sola banda. No se encontra-- ron diferencias importantes cuando el gel contuvo 8M de urea.

En el caso de la electroforesis en condiciones de -- SDS se utilizaron geles de 12.5% y en gradiente de 10 a 20% -- (concentración de acrilamida). En estos geles el veneno total se separa mejor, mostrando una mayor complejidad, con aproxima-- damente 21 componentes. La toxina hipotérmica se comporta como una sola banda que migra entre la anhídrida carbónica de peso molecular de 31,000 y el inhibidor básico de tripsina de

soya de 21,500 por lo que la toxina presenta un peso molecular aparente de 26,000 d.

Análisis de Aminoácidos

La composición de aminoácidos de la toxina muestra - un contenido de 221 residuos de aminoácidos, de los cuales los más abundantes son aspártico y glutámico, los de menor proporción son la leucina, fenilalanina, histidina, además contiene 5 metioninas y 20 cisteínas (Tabla III). El contenido de residuos ácidos es claramente mayor con respecto a los básicos, -- sin embargo la toxina se comporta como un componente básico en los cromatogramas (CMC-32). La causa de esta aparente contradicción puede ser explicada por la presencia de grupos amidados en los carboxilos de los grupos R de los aspárticos y glutámicos, lo cual evitaría su contribución a la carga global de la proteína.

En comparación con la mayoría de las toxinas conocidas (en general) el peso molecular es muy diferente por ejemplo, las toxinas de alacranes, algunas serpientes y anemonas - de mar contienen de 60-74 residuos de aminoácidos (L. Possani, 1984) (A. Tu, 1977) (H. Okamoto, 1977). En el caso de toxinas de arácnidos y algunas bacterias, el número de residuos es muy variable de 1 300 a 1 500 residuos, inclusive con subunidades en su estructura. (B. Howard y C. Gundesen 1980).

Por otra parte, la principal diferencia de la toxina hipotérmica, con la gilatoxina (toxina reportada por A. Tu (1981)).

Se observa diferencias marcadas en la proporción de los residuos en ambas toxinas, lo que hace poco probable el caso de que la toxina hipotérmica sea producto de degradación de la gilatoxina.

Secuencia de Aminoácidos de la Toxina

Con objeto de determinar la secuencia de la toxina hipotérmica del Heloderma horridum horridum, se tuvo que abrir la cadena polipeptídica rompiendo los puentes disulfuro; para lo cual se redujeron éstos con ditiotreitól y se vinilpiridilaron las cisteínas para evitar la reoxidación, y tener derivadas las cisteínas haciéndose más fácil su identificación. -- Luego se determinó la secuencia N-terminal mediante un procedimiento automático. Con la secuencia N-terminal se hicieron comparaciones con otras proteínas con el objeto de encontrar alguna homología que ayude en la interpretación de su función biológica.

A continuación se muestran algunas comparaciones:

1 5 10 15 20

E A S P K L P G L M T S N P -X- Q Q T G F

A S P

K L P G

M T S

Toxina de Heloderma
horridum horridum

Proteína ribosomal
de E. coli

Antitrombina III
(factor heparínico)

Lipotropina

La comparación de la secuencia N-terminal no muestra una clara semejanza con otras proteínas. Las similitudes encontradas no fueron estadísticamente significativas.

Propiedades Inmunológicas

Con el objeto de obtener un criterio adicional de pureza y caracterizar las propiedades inmunológicas de la toxina, se realizó un experimento de inmunodifusión con sueros de ovejas, las cuales se habían inmunizado previamente contra el veneno total del Heloderma horridum horridum (Alagón y col. 1982).

La inmunodifusión se llevó a cabo con tres sueros de ovejas que se denominaron 0, 145, y 264. En los tres se observaron bandas de precipitado, lo cual indica que la toxina es reconocida por los sueros, a pesar de ser un componente minoritario del veneno (~ 1%). Sin embargo, de los tres sueros en-

sayados, uno dió una respuesta mayor al presentar una banda muy intensa (oveja, O) esto fue al parecer debido a un exceso de antígeno en el ensayo.

Propiedades Hipotérmicas

En el curso de los ensayos biológicos para encontrar la actividad tóxica de las fracciones cromatográficas en proceso, se verificó que los ratones inyectados con la fracción tóxica mostraran un comportamiento característico, el cual consiste en: parálisis flácida, convulsiones esporádicas y muerte por falla respiratoria. Sin embargo, durante el curso de estas manifestaciones el animal mostraba un descenso evidente de la temperatura corporal. Por ello se decidió caracterizar este efecto con un lote de 10 ratones, a los cuales se les tomó la temperatura basal corporal, antes de inyectarles una dosis única de toxina de 50 μg . Posteriormente se fue tomando su temperatura a intervalos de tiempo subsecuentes.

La temperatura basal de los ratones fue en promedio de 39.5°C, la cual fue descendiendo hasta menos de 35°C en un periodo de aproximadamente de 40 minutos. Si bien el efecto de disminución de temperatura corporal es evidente, se torna extremadamente complejo y al mismo tiempo difícil proponer el mecanismo molecular de acción de la toxina. No se puede afirmar a que nivel está actuando la misma. No sería sorprendente

si el efecto, cuando sea más profundamente estudiado, revele que el efecto hipotérmico, sea secundario al de la toxina sobre ciertos órganos blancos. Actualmente esto constituye un objeto de estudio muy importante en nuestro laboratorio, en este momento.

Efectos sobre el Músculo Papilar de Rata

El músculo papilar de rata se utiliza como bioensayo, para curvas de dosis-respuesta, cuando se ensayan compuestos que alteran los factores que mantienen la tensión activa del huso muscular (como se describe en texto). Las drogas que afectan la permeabilidad membranal, como los inhibidores del canal de Ca^{++} , cambian el estado de tensión y producen relajamiento.

La fracción II.1.4 ocasionó una disminución de la -- tensión activa en un 21%, efecto parecido al de la Nimodipina (la cual produce 100% de relajamiento). Sin embargo, como la tensión activa está influenciada por varios factores, es necesario realizar otros ensayos más precisos para determinar si el efecto es debido a la inhibición de algún canal iónico.

Otros ensayos electrofisiológicos

Finalmente, se buscó determinar su efecto en los siguientes sistemas:

- a: Axón gigante de calamar mantenido en voltaje sostenido. Ningún efecto en ambos canales (Na^+) y (K^+). Experimentos realizados por Carbone y Possani, con toxina purificada por nosotros .
- b: Células de la raíz ganglionar dorsal de embrión de pollo en un sistema de "patch-clamp". Ningún efecto visible en los canales de Na^+ , K^+ ó Ca^{++} . (Yatani y Brown). (En el Baylor College of Medicine, Houston, Texas, E.U.A.).
- d: También se tuvo un efecto negativo al ensayar el sistema de transporte de electrones de la mitocondria. (Dr. E. Chávez, de el Instituto Nacional de Cardiología).

El efecto hipotérmico se ha buscado en varios sistemas fisiológicos sin determinar hasta la fecha el mecanismo de acción, por lo que no se puede afirmar si el efecto es sobre algún sitio específico, o a través de algún efecto indirecto, ésta es una de las preguntas que se intentarán resolver en un futuro trabajo.

V. CONCLUSIONES

El estudio del veneno del Heloderma horridum horridum mostró:

1. Una composición principalmente de protefnas.
2. Comportamiento cromatográfico y electroforético con un patrón constante, por lo que se puede decir que este veneno no tiene variaciones significativas en sus componentes de acuerdo a diferentes épocas del año, y que tampoco depende del medio ambiente.
3. La caracterización de una toxina del veneno del Heloderma horridum horridum, la cual muestra que se trata de una protefna de 25 500 de peso molecular con un contenido de por lo menos 221 residuos de aminoácidos
4. La toxina muestra en su porción aminoterminal la secuencia; N-Glu-Ala-Ser-Pro-Lis-Leu-Pro-Gli-Leu-Met-Tre-Ser-Asn-Pro-X-Gln-Gln-Tre-Gli-Pen...
5. La toxina presenta homología (no significativa) en porción N-terminal, con una protefna ribosomal de E. coli, β -lipotropina y, el factor antitrombínico II.
6. La toxina produce un patrón característico de disminución de la actividad motora, convulsiones esporádicas

cas (de tipo espástico), disnea y muerte, además de producir un efecto constante de disminuir la temperatura corporal de los ratones inyectados, tal efecto se desarrolla en un promedio de 30 minutos.

7. El análisis de la toxina en diferentes sistemas fisiológicos mostró:

- a) La toxina produce relajamiento del músculo papilar de ventrículo izquierdo (corazón) de rata.
- b) Efecto negativo en canales de Na^+ y K^+ de axón de calamar (en técnicas de voltaje sostenido en membranas excitables) y en células de la raíz ganglionar dorsal del embrión de pollo ("patch. -- clamp").
- c) Efecto negativo en canales de Ca^{++} de células de miocardio de rata ("Whole cell patch").

VI. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas que se abren con respecto a este trabajo, algunas de las cuales son motivo de proyecto continuo en este grupo, tenemos:

- a) Determinar la estructura primaria completa de la toxina hipotérmica.
- b) Buscar posibles correlaciones filogenéticas de la toxina con algunas proteínas similares en otros organismos.
- c) Generar anticuerpos contra la toxina para estudios inmunológicos.
- d) Estudios fisiológicos de la toxina para encontrar el mecanismo de acción, a nivel molecular.
- e) Utilizar la toxina como herramienta en estudios del fenómeno de hipotermia.
- f) Clonación de la toxina, con el objeto de iniciar estudios ligados de ingeniería genética y química de proteínas.
- g) En caso de encontrar algún receptor, en el sistema afectado por la toxina, proceder al aislamiento y la caracterización del receptor específico.

VII. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a el Q.F.B. Fernando Zamudio por su colaboración en la realización de los análisis de aminoácidos.

Agradezco al Dr. Brian M. Martín del National Institute of Health, Bethesda, Md., U.S.A., por su colaboración en la determinación de la secuencia de la región N-terminal de la toxina.

Finalmente agradezco de manera especial al Dr. Lourival D. Possani por el apoyo y estímulo prestado para la realización de esta tesis.

Parte de esta tesis, concretamente, la referente al análisis de aminoácidos se realizó en la Unidad de Análisis de Aminoácidos y Estructura de Proteínas, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

La elaboración final de esta tesis se realizó gracias a la beca otorgada por el Comité Técnico de Becas del Programa de Superación del Personal Académico (D.G.A.P.A.), U.N.A.M.

BIBLIOGRAFIA

Alagón A. C., Maldonado M. A., Julia J. Z., Sánchez C. R., Possani L. D. (1982). Venom from two sub-species of Heloderma horridum horridum. (Mexican beaded lizard): General characterization and purification of N-Benzoyl-L-arginine ethyl-ester hidrolase. *Toxicon* 20: 2 pp. 464-475.

Alagón A. C., Possani L. D., Sumart J., Schuleuning W. D., (1986) Helodermatine, a Kallikrein-like, Hipotensive enzyme from the venom of Heloderma horridum horridum (Mexican beaded lizard). *J. Exp. Med.* 164 (6) pp. 1835-45.

Amezcuca J., y Alagón A.C. (1984) Proceedings of the XV Congress of the National Society of Biochemistry, Mexico pp. 192, Aps. Sociedad Mexicana de Bioquímica, México.

Amirano F. F., Vaudin-Jaques N., Boise N., Rouer-Fessard, (1983) Interaction of Gila Monster Venom with VIP receptors in intestinal epithelium of human. A comparison with rat. *FEES Lett.* 164: 2 pp. 299-30.

Balozet L. (1971) Scorpionism in the old world. In *Venomous Animals and Their Venoms*, Vol. III, W. Bucherl y E. E. Buckley. (Eds). Academic Press. New York pp 349-371.

Banks E. C., Pearce F. L., Springer C. J., Vernon C. A.
(1985) On the immunology of nerve growth factor. *Neurosci. Lett.* Vol. 61 No. 1-2 pp. 127-30.

Barbanin J., Giglio J. R., Leopold R., Schmid A. Sampaio S.V. y Lazdunski M. (1982). Tityus serrulatus venom contain 2 classes of toxins tityus gama-toxin is a new tool with a very high-affinity for studing the Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 257: 2553-2558.

Berg Meyer H. V. Editor. *Methods of Enzimatic Analysis* (1965). Verlag Chemie Weinheim and Academic Press.

Carbone E., Wankee E., Prestipino G., Possani L. D., Maelike A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296: 190-91.

Ceccarelli B. y Clementi F. (Eds) (1979). *Neurotoxins: tools in Neurobiology Adv. Cytopharmacol.* Vol. III. Raven Press, New York.

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

Dehaye J. P., Winand J., Michel P., Roberecht P., Walbroek M., Vandermeers A., Vandermeers. P., Christophe J., (1984).

Pancreatic. secretory factor (PSF), protein from gila monster venom stimulating enzyme secretion from rat pancreatic acini.

FEB Lett. 166: pp. 283-7.

Dehaye J. P., Winand J., Damien C., Poloczek P., Scroboda M., Christophe J., (1984) Stimulatory effects of Gila monster venom on rat pancreatic acini Peptides (Fayentteville, N.Y.).

Vol. 5 No. 2 pp. 333-7.

Dent M. A. R. (1982) Aislamiento y caracterización química de diversas toxinas del veneno del alacrán Centruroides noxius (hoffmann). Tesis para Maestría en Ciencias presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México. Fac. de Ciencias Químicas, México.

Edman P. y Begg G. (1967) A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1: 80-91.

Erickson B. W. (1978) Sequence homology of snakes, scorpion and bee toxin In: Toxin, Animal, plant and Microbial (Procced V Inter. Sym.) Ed. P. Rosenberg. Pergamon Press. Oxford, New York, pp. 1071-1086.

Erickson B. W., Sekulski J. M., y Sellers P. H., (1982) Recognition of patterns in protein sequences by metric analysis. In Methods in Sequence Analysis, M. Elzinga (Ed). Human Press, Clifton N. J. pp. 553-554.

Funk C., Gmur J., Herold R., Straub P. W., (1971) Reptilase R: A new reagent un blood coagulation Brith. Journal of Haematol. 21: 43-52.

Gillet L., Roberecht P., Waelbroeck M., Camus J. C. Deneef P., Koenig W., Christophe J., (1984) Interaction of gila monster venom with secretin receptors in rat pancreatic membranes. Peptides (Fayetteville N.Y.) Vol. 5 No. 2 pp 407-9.

Gitter S., y de Uries A., (1986) Symptomatology, pathology and treatment of bites by Near Eastern. European and North African Snakes. In Bucherl, W., Buclkey E.E. y Deulofeau U. (Eds). Venomous animal and their venoms, Vol. 1 pp. 359-401. New York. Academic Press.

Habersetzaer - Rochat, C. y Sampieri F. (1976) Structure Function relationships of scorpion neurotoxins. Biochem 15: 2254-2261.

Heinrikson R. L. (1982) In Protein in Biology and Medicine (Bradshaw R.A., Hill R.L., Tang J., Liang C., Tsao T. C., Tsou C. L. Eds) pp. 132-152, Academic New York.

Heintschel S., (1986) Near death from a Gila monster bite. Jen 12 (5) pp. 259-62.

Hoshino, M., Yandihavd, Ch., Hong, Y. M., Kishida S., Katsumdrv Y., Vaundermeers A., Vandermeers-Piret M.C., Robbrecht P., Christophe J., Yandihard N. (1984) Primary structure of helodermin, a VIP secretin-like Peptide isolated from Gila monster venom. FEBS Lett. Vol. 178 No. 2 p. 233-9.

Jaques R. (1956) the hyaluronidase Content of animal venoms. In: Venoms, Amer. Ass. Adv. Sci: 291.

Jensen R.T., Charlton C. G., Adach H., Jones S. W., Odonohue T. L., Garner J. P. (1983) Use of ^{125}I -Secretin to identify and characterize high-affinity secretin receptors on pancreatic acini. Am. J. Physiol. Vol. 245 No. 2 pp. G-186-G-195.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Mebis D. and Raudonat H. W. (1966) Biochemical investigations of Heloderma venom. Membs. Inst. Butantan 33, 907.

Mohamed A. H. Ramel, A., Ayobe M. H. (1969) a studies of phospholipase A and B activities of egyptian snake venom and scorpion toxin. *Toxicon* : 293-298.

Moore, S. y Stein W. H., (1963) the chromatographic determination of amino acids by use of auto matic recording equipment in *Methods in Enzymol.* Vol. VI, Colomick, S. P., y Kaplan, N.O., (Editores) pp. 819-831. Academic Press, New York.

Moore S. (1963) on the determination of cysteine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.* 238: 235-237.

Moore S. and Stein W.H. (1963) in *Methods in Enzymology* (Colomick, S. P. and Kaplan, N.O. eds) Vol. 6 Academic Press, New York pp. 819-831.

Parker D.S., Raufman J.P., O'Donohue T.L., Bledsoe M., Yoshida H., Pissano J. J., (1984) Amino acid sequences of helospectins, new members of the glucagon superfamily, found in Gila monster venom. *J. Biol. Chem.* Vol. 259. 19, 1175-5.

Possani L. D., Alagón A. C., Fletcher Jr. P. L. y Erickson B. W. (1977). Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 394-403.

Possani L. D., Martín B. M., Mochca-Morales J. y Suendsen I. (1981). Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian Scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Carlsberg Res. Commun. 46: 195-205.

Raufman J. P., Jensen R. T., Sutliff V. E., Pissano J. J., Gardner J. D., (1982). Actions of gila monster venom of dispersed acini from guinea pig pancreas. Am. J. Physiol. Vol. 242 No. 5 pp. 6470-6470.

Reisfeld R. A., Lewis V. J. y Williams D. E. (1962). Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195: 281-283.

Robberecht P., Waelbroeck M., Dehaye J. P., Winand J., Vandermeers A., Vandermeers - Piret M. C., Christophe J. (1984). Evidence that helodermin, a newly extracted peptide from Gila monster venom, is a member of the secretin/VIP/PHI family of peptides with an original pattern of biological properties FEBS Lett. Vol. 166 No. 2 pp. 277-82.

Rochat H., Kopeyan C. Garcia L.G., Martinez G., Rosso J.P., Pakaris A., Martín M. F., Garcia A., Martín-Mootot N., Gregoire J., Miranda F. (1976) Recent results of the structure of scorpions and Snake Toxins. In: Animal, Plants and Microbial

toxins. Vol. 2 Eds. A. Osaka, R. Hayashi and Sawai, Plenum Press, New York. pp. 79-97.

Russell F. E., Bogert C. M., (1981) Gila Monster: its biology, venom and bite - a review, *Toxicon* 19 (3) p. 341-59.

Sosa B. P., Alagón A. C., Martín B. M., Possani L. D. (1986) Biochemical characterization of the phospholipase A₂ purified from the venom of the Mexican beaded Lizard (Heloderma horridum horridum Wiegmann) *Biochemistry* Vol. 25 No. 10 pp. 2927-33.

Streiffer R. H. (1986) Bite of venomous lizard, the Gila monster. *Postgrad Med.* 79 (2) pp. 279-9.

Styblova Z. and Kornalik F. (1967) Enzymatic properties of Heloderma suspectum venom *Toxicon* 5, 139.

Tolksdorf S., McReady M. H., McGullach D.R. and Schwenk E. (1949) the turbidimetric assay of hyaluronidase. *J. Lab. Clin. Med.* 34, 74.

Tu, A. T. (Ed.) (1977) *Venoms: Chemistry and Molecular biology.* New York: John Wiley.

Tu A. T. and Murdok D. S. (1967). Protein nature and some enzymatic properties of the lizard. Heloderma suspectum suspectum (Gila Monster) venom. Comp. Biochem. Physiol. 22. 389.

Tu A. T. (1977). Venoms: Chemistry and Molecular Biology. John Willey and Sons, New York pp. 459-483.

Tu A. T., Hendon R. R. (1983). Characterization of Lizard Venom Hyaluronidase and evidence for its, Action as a spreading factor, Com. Biochem. Physiol. Vol. 7 No. 2 pp. 377-388.

Tu A. T., Hendon A. R., (1981). Biochemical Characterization of the lizard Gilatoxin, Biochemistry Vol. 20 pp. 3517-3522.

Tu A. T., Murdock D. S., (1967). Protein nature and some enzymatic properties of the lizard Heloderma suspectum suspectum (Gila monster) venom. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 22. 389.

Vandermeers A., Gourlet P., Vandermeers-Piret M. C., Cauvin A., De Neef P., Rathe J., Suoboda M., Robberecht P., Chistopher J. (1987). Chemical immunological an biological properties of peptides like vaso active - in testinal - intestinal - peptide and peptide - histidine isoleucimide extracted from the venom

of Heloderma horridu and Heloderma suspectum). Eur. J. Biochem. 164 (2) p. 321-7.

Vandermeers A., Vandermeers-Piret Marie C., Robberecht P., Waelbroeck M., Dehave J. P., Winand J., Christophe J. (1984). Purification of a novel pancreatic secretory factor (P.S.F.) and a novel peptide with VIP - and secretin-like properties (helodermin) from Gila monster venom. FEBS Letts. Vol. 166 No. 2 pp. 273-6.

Vesley D. L. (1982). Gila monster and Mexican beadedlizard venoms enhance guanylate cyclase activity. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. Vol. 36: No. 1 pp. 119-27.

Watters J. J., Possani L. D., Mochca-Morales J., Hess B. (1981). Determination of alfa-helix and beta sheet structure in toxins purified from the venoms of Latin American Scorpions. 4th. Sur. Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Marseille, Francia. Toxicon 20 (7): 81.

Zlotkin E. (1973). Chemistry of animal venoms. Experientia 29: 1453-1466.