



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO.**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA  
FOSFOLIPASA DEL VENENO DEL ALACRAN  
HADRURUS CONCOLOURUS.**

**T E S I S**  
**Que para obtener el Titulo de**  
**LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**  
**p r e s e n t a**  
**RAQUEL COSSIO BAYUGAR**

**Cuernavaca, Mor.**

**1993**

**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.

# AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA FOSFOLIPASA DEL VENENO DEL ALACRAN HADRURUS CONCOLOURUS

## RESUMEN

En este trabajo de tesis se caracterizó bioquímicamente el veneno del alacrán *Hadrurus concolourus*. Como primer paso se determinó la toxicidad de este veneno en distintas especies de animales: mamíferos (ratones), insectos (grillos), crustáceos (acociles) e isópodos (cochinilla de jardín). El veneno demostró ser no tóxico a mamíferos pero sí a insectos en las condiciones probadas (grillos con una toxicidad superior a los 100µg/gr), y fué letal a crustáceos (acociles a partir de 133 µg/gr) e isópodos (cochinillas con una LD<sub>50</sub> de 174µg/gr).

Después se mostró que el veneno total presenta actividad de fosfolipasa y se purificó este componente. El veneno se separó en siete fracciones en una columna de exclusión molecular, presentando la actividad en la segunda fracción. Esta fosfolipasa se purificó a homogeneidad con un paso en una columna de afinidad y dos pasos en cromatografía líquida de alta presión. Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proción aminoterminal, siendo esta la primera secuencia de fosfolipasa en venenos de alacrán.

El efecto tóxico de esta fosfolipasa parece estar relacionado al canal de Ca<sup>2+</sup> sensible a ryanodina.

  
No.Bo.  
Dr. Lourival D. Possani  
Tutor

## INDICE

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO.....	vii
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	viii
NOMENCLATURA DE LOS AMINOACIDOS COMUNES.....	ix
RESUMEN.....	x

### I- INTRODUCCION

1. Veneno de alacranes: Generalidades.....	1
2. Fosfolipasas.....	4
2.1. Clasificación.....	4
2.2. Localización.....	8
2.3. Efectos farmacológicos de las FLA2.....	8

### II- OBJETIVOS..... 11

### III- MATERIALES Y METODOS

1. Obtención y conservación del veneno.....	12
2. Separaciones cromatográficas.....	12
2.1. Exclusión molecular.....	12
2.2. Columna de afinidad.....	12
2.3. Cromatografía líquida de alta presión (CLAP)....	13
2.4. Intercambio iónico.....	13
3. Bioensayos.....	13
3.1. Pruebas de toxicidad.....	13
3.2. Determinación de la dosis letal media.....	14
4. Determinación de la actividad de fosfolipasa.....	14
4.1. Preparación del sustrato de yema de huevo.....	14
4.2. Preparación de los geles agarosa-rodamina-yema de huevo.....	15
4.3. Procedimientos electroforéticos.....	15
5. Desalado de proteínas.....	15
5.1. Diálisis.....	15
5.2. Columna de Sephadex G-10.....	16
6. Determinación de la secuencia de aminoácidos.....	16

### IV- RESULTADOS

1. Determinación de la toxicidad del veneno total.....	17
2. Separación por peso molecular.....	17

3.	Purificación por columna de afinidad.....	22
4.	Desalado de las fracciones II-4 y II-5 por una columna Sephadex G-10.....	25
5.	Purificación de la fosfolipasa por cromatografía líquida de alta presión (CLAP).....	25
6.	Electroforesis del veneno y fracciones purificadas..	27
7.	Secuenciación.....	33
V-	DISCUSION.....	34
VI-	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	48
VII-	REFERENCIAS.....	49

## ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
CLAP	Cromatografía líquida de alta presión
TFA	Acido trifluoroacético
SDS	Dodecilsulfato de sodio
CMC	Carboxi-metil-celulosa
AGL	Acidos grasos libres
FL	Fosfolipasa
FLA1	Fosfolipasa tipo A1
FLA2	Fosfolipasa tipo A2
FLB	Fosfolipasa tipo B
FLC	Fosfolipasa tipo C
FLD	Fosfolipasa tipo D
LFL	Lisofosfolipasa
RS	Reticulo sarcoplásmico

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

1. Sitios de acción de las fosfolipasas de acuerdo al ester que hidrolizan.....	5
2. Determinación de la dosis letal media del veneno total de <i>Hadrurus concolourus</i> en cochinillas.....	19
3. Filtración en Sephadex G-50 del veneno total de <i>Hadrurus concolourus</i> del veneno total por sephadex G-50 .....	20
4. Cromatografía de afinidad de la fracción II.....	23
5. Cromatografía líquida de alta presión.....	26
6. Separación electroforética del veneno en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.....	29
7. Actividad del veneno en gel de agarosa-yema de huevo-rodamina.....	30
8. Separación electroforética en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y detección de actividad de fosfolipásica en gel de agarosa-yema de huevo-rodamina.....	31
9. Purificación de la Fracción II en una columna de carboxi-metil-celulosa.....	35
10. Curva de inhibición por las fracciones II-4 y II-5 del receptor ( <sup>3</sup> H)-ryanodina.....	45

### TABLAS

1. Fuentes de enzimas de fosfolipasa.....	9
2. Tabla de toxicidad del veneno total.....	18
3. Recuperación de los componentes cromatográficos obtenidos en la columna de Sephadex G-50.....	21
4. Recuperación de la columna de afinidad.....	24
5. Recuperación de la columna de CM-celulosa.....	36
6. Secuencias de aminoácidos de FLA2 de venenos de serpientes y homólogos no enzimáticos y comparación con FLA2 pancreática y de abeja .....	37

## NOMENCLATURA DE LOS AMINOACIDOS COMUNES

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

## RESUMEN

En este trabajo de tesis se caracterizó bioquímicamente el veneno del alacrán *Hadrurus concolourus*. Entre los hallazgos más relevantes están:

1.- El veneno total no fué tóxico a mamíferos pero sí a insectos en las condiciones probadas (grillos con una toxicidad superior a los  $100\mu\text{g/g}$ ), y fué letal a crustáceos (acociles a partir de  $133\mu\text{g/g}$ ) e isópodos (cochinillas con una  $\text{LD}_{50}$  de  $174\mu\text{g/g}$ ).

2.- El veneno total mostró actividad de fosfolipasa.

3.- El veneno total se separó en siete Fracciones cuando se aplicaron en una columna de exclusión molecular, presentando la actividad de fosfolipasa en la Fracción II. Esta fosfolipasa se purificó a homogeneidad con un paso en una columna de afinidad y dos pasos de CLAP.

5.- Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la porción aminoterminal; no encontrándose homología al utilizar algoritmos de computadora *ad hoc*, con ninguna fosfolipasa conocida.

6.- El efecto tóxico de esta fosfolipasa parece estar relacionado al canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , sensible a ryanodina.

## I - INTRODUCCION

### 1. VENENO DE ALACRANES: GENERALIDADES

“Cuando a Lupita le picó el alacrán, era ya tarde por la noche, se levantó de la cama y lo pisó, esa noche llovía, era agosto, los alacranes suelen salir por esas fechas de todos lados. Nos dimos cuenta por sus gritos y su llanto, sólo tenía seis años y decía que le dolía mucho el pie, no tardamos en encontrarlo; estaba debajo de la cama.

Como a la hora se le empezó a entumecer la pierna, comenzó a sudar y salivar. Cuando la llevamos al médico, tenía espasmos en el abdomen, pulso rápido y fiebre; después de dos horas respiraba rápidamente y con dificultad, la lengua se le entumeció y se le dificultaba hablar. El doctor empezó el tratamiento, la tuvo bajo observación toda la noche, dijo que la llevamos apenas a tiempo y afortunadamente se salvó.”

Este es un relato que se oye con frecuencia en la mayoría de las familias que viven en un área rural o suburbana de México; sin embargo los alacranes son un problema de salud pública no solo en nuestro país, sino también en Sudamérica, Centroamérica, Caribe, Norteamérica, Africa del Norte y Medio Oriente.

A pesar de que existen más de 700 especies de alacranes distribuidos en todo el mundo, pocas de ellas son peligrosas para el ser humano. Los alacranes de importancia médica en el Nuevo Mundo se dividen en varios géneros y especies importantes: el *Centruroides*, que se localiza en el Sudeste de los Estados Unidos, México y Venezuela, y el género *Tityius*, cuya distribución geográfica es Argentina, Brasil, Guyanas, Venezuela y Trinidad-Tobago. Las especies venenosas del viejo mundo se agrupan en los

géneros: *Androctonus* en Argelia, Egipto, Irak, Israel, Marruecos y Turquía; *Buthus* en Argelia, Jordania, Marruecos y Sudán; *Parabuthus* en Sudafrica, *Hemoscorpion lepturus* en Irak, *Leiurus quinquestriatus* en Sudán, Egipto, Israel y Turquía y *Mesobuthus gibbosus* en Turquía ( Beaver C. P, y col. ,1990).

En México los alacranes se encuentran en la totalidad del territorio, con mayor abundancia en el litoral del Pacífico, meseta central y zonas semidesérticas del norte del país. Los Estados que comparten la cuenca del Río Balsas, que son Guerrero, Morelos, Edo. de México, Puebla y Michoacán, cuentan con la mayor incidencia de accidentes mortales ocasionados por el alacrán del género *Centruroides*, (Mazzotti L. y Bravo-Becherelle M. A.,1961), siendo los niños de edad preescolar los que se exponen con mayor frecuencia y los que son afectados más gravemente.

La toxicidad de los venenos de alacrán es muy variable. Aún entre especies del mismo género hay diferencias en cuanto a si la picadura es dolorosa o no, si el efecto es tan sólo localizado o peligrosamente sistémico, y si hay inflamación o no. La mortalidad es especialmente alta en niños. En Brasil, las picaduras de *Tityus serrulatus*, altamente venenoso, causan una mortalidad del 0.8 al 1.4 por ciento en adultos, del 3 al 5 por ciento en niños de edad escolar y del 15 al 20 por cientos en niños pequeños, mientras que en Africa del Norte las picaduras de alacranes causan mayor número de muertes que las mordeduras de serpientes. La región más extensa de morbilidad y mortalidad comprende las regiones áridas de Africa del Norte, extendiéndose por Paquistán y la India (Harwood R. F. y James M. T., 1987). Se estima que en México por lo menos 200,000 personas son picadas anualmente por estos arácnidos, ocasionando cerca de 700 a 800 muertes (Possani L. D. y col.,1992).

La sintomatología tan aparatosa que provoca la picadura de estos escorpiones, comparada con su tamaño, habla de una potencia de los componentes de estos venenos, los cuales pueden ser tan efectivos en mamíferos como en insectos, aves y aún en crustáceos. Esta ubicuidad de acción motivó el estudio de la composición de ellos, así como el interés en el desarrollo de antidotos.

Existen varios sistemas modelo como ratones, pollos, grillos, larvas y crustáceos que se pueden utilizar en bioensayos durante el aislamiento de una serie de polipéptidos de bajo peso molecular llamados toxinas (Zlotkin y col., 1978). Utilizando este tipo de bioensayos se han purificado toxinas en contra de mamíferos insectos y crustáceos.

El veneno de los alacranes está compuesto por aminoácidos libres, sales inorgánicas, nucleótidos, lípidos, mucopolisacáridos, proteínas y péptidos de diferentes pesos moleculares, que son neurotóxicos a invertebrados y/o vertebrados. El contenido enzimático es pobre (proteinasas, fosfolipasas, etc.) pero la hialuronidasa parece ser un componente constante en todos ellos (Cevallos M. A. y col., 1992). Poseen, además, moléculas de bajo peso molecular, tales como serotonina (Master R.W.S y col.,1963) o histamina (Ismail M. y col.,1973) inhibidores de proteasas y liberadores de histamina (Chhatwal G.S.y col.,1981).

Jover, Couraud y Rochat (1980) propusieron el nombre de toxinas alfa a las toxinas de alacranes llamados del viejo mundo, representadas por toxinas del veneno de alacranes tales como *Androctonus australis* y *Leiurus quinquestriatus*, que actúan afectando el mecanismo de inactivación de los canales de sodio (Catterall W.y col.,1976); y el nombre de toxinas beta a las toxinas de los alacranes del nuevo mundo, específicamente las del genero *Centruroides*, que afectan los procesos de apertura de este canal (Cahalan M.D.,1975). Existen otro grupo de toxinas que son las que afectan los canales de K<sup>+</sup> ( Koppenhöfer E. y col.,1968, Cahalan M.D. 1975, Carbone E. y col.,1982 y la revisión de Strong P. N 1990).

En años recientes, el papel de los componentes polipeptídicos como compuestos activos en el veneno de los alacranes ha despertado un interés científico por el uso potencial de las toxinas de alacranes como herramientas en estudios neurobiológicos (Ceccarelli B. y Clementi F., 1979). Por ejemplo, el uso de las toxinas como bloqueadores selectivos permite a los electrofisiólogos analizar y/o bloquear corrientes iónicas específicas en experimentos de pinza de voltaje. La alta afinidad de estas toxinas ha permitido utilizarlas en el aislamiento de canales

iónicos (Catteral, W.,1980).y en estudios moleculares de la activación de los canales (Albuquerque E.X. y col.,1988); en el estudio de subtipos de canales de  $\text{Na}^+$  (Corbett A.M. y col.,1990), y de  $\text{K}^+$  (Vazquez-J y col., 1990); en la localización de canales de sodio (Massacrier-A y col.,1990)(Le-Treut-T y col.,1990).

Entre las enzimas citolíticas de los venenos se encuentran las fosfolipasas tipo A, que también son constituyentes importantes de muchas membranas celulares. De tal forma que existe la posibilidad de fosfolipasas exógenas y endógenas actuando sobre las membranas (Rosenberg P.,1990).

## 2. FOSFOLIPASAS

Las fosfolipasas son una clase de enzimas que catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos de las membranas para liberar ácidos grasos. La existencia de estas enzimas se conoce desde hace aproximadamente 100 años, pero desde hace 25 años que su importancia en los procesos biológicos se está apreciando (Chang J. y col.,1987).

### 2.1. CLASIFICACION

Las fosfolipasas más comunes se dividen en A1, A2, B, C y D, de acuerdo con la posición del éster que hidrolizan preferentemente (figura 1)(Lehninger A. L. (1985), Herrera E. (1986), Mead F.J. y col. (1986) y Rosenberg.P.(1990)).

La figura 1 muestra la estructura química del fosfolípido y el sitio de acción de las distintas fosfolipasas. En los fosfoglicéridos o fosfolípido, los tres grupos hidroxilo primarios del glicerol estan esterificados: El primero por el ácido fosfórico y los demás por ácidos grasos. La cadena hidrocarbonada (R) en la posición 1 es saturada mientras que la de la posición 2 es insaturada. Los fosfoglicéridos contienen una cabeza polar, o sea un alcohol representado por X-OH cuyo grupo hidroxilo está esterificado por el ácido fosfórico. (Lehninger A. L., 1985).



#### a) Fosfolipasas A1

Definidas como EC 3.1.1.32, son aquéllas que hidrolizan el éster en la posición 1, dejando un lisofosfoglicérido y un ácido graso libre (AGL)(Mead J. F.,1986, Rosenberg P.,1990, Lehninger A. L., 1985). Esta enzima se encuentra en células eucariontes y procariontes. La actividad hidrolítica de la FLA1 soluble (la que se encuentra en el citoplasma) no es afectada ni inhibida por  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras las enzimas unidas a membranas son estimuladas por  $\text{Ca}^{2+}$ . La enzima soluble que se encuentra en lisosomas y citoplasma tiene un pH óptimo en pH ácido, mientras que el pH óptimo de las fosfolipasas que están unidas a membranas es básico. En mamíferos la principal fuente de la FLA1 son el páncreas y cerebro (Rosenberg P., 1990, Herrera E., 1986, Mead J.F., 1986).

#### b) Fosfolipasas A2

Definidas como EC 3.1.1.4, son aquéllas que hidrolizan el enlace éster de la posición 2, dejando como productos un AGL y un 1 acilglicerofosfolípido (lisofosfoglicérido) (Radwan S.S., 1987, Rosenberg P.,1990, Lehninger, A.L.,1985). Estas enzimas son termoestables, especialmente a pH ácidos, son resistentes a agentes desnaturizantes y su actividad es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En general, estas enzimas son de bajo peso molecular, situándose en el intervalo de 12-15 kDa. La mayoría de las fosfolipasas tienen 7 puentes de disulfuro y algunas tienen 6; estos puentes contribuyen a su estabilidad y la formación adecuada de los enlaces disulfuros es necesaria para su actividad. La actividad hidrolítica es inhibida por ácidos grasos libres, y también por los iones de  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ . Las FLA2 del páncreas y del veneno de serpientes son proteínas homólogas y son muy distintas de las del veneno de abeja, teniendo homología alrededor del sitio activo. (Rosenberg P.,1990, Herrera E.,1986, Mead J.F., 1986, Chang J,1987).

c) Lisofosfolipasa y fosfolipasa B.

Definidas como EC 3.1.1.5 (La Comisión de Enzimas usa este término como sinónimo de lisofosfolipasa (LFL) y fosfolipasa tipo B (FLB)). Las LFL están ampliamente distribuidas en organismos procariontes y eucariontes, encontrándose en altos niveles en pulmón, intestino, hígado, bazo y páncreas de rata; no requieren de  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad y son inhibidas por detergentes (Rosenberg P.,1990). La LFL cataliza la hidrólisis del grupo acilo de los lisofosfoglicéridos, dando lugar a un ácido graso y un s.n glicerol 3-fosfato (Mead F.J (1986)). El término fosfolipasa de tipo B es usado algunas veces como sinónimo en la literatura de lisofosfolipasas y algunas ocasiones indican dos actividades distintas. En preparaciones crudas de veneno total, la hidrólisis de los dos ácidos grasos (el ácido graso de la posición 1 y el ácido graso de la posición 2) puede ser bien por la acción de la FLB, o por la acción secuencial de FLA1, FLA2 y LFL. En venenos no se han purificado las enzimas responsables de esta actividad (Rosenberg P. 1990).

d) Fosfolipasa C

Definida como EC 3.1.4.3., catalizan la hidrólisis de la unión entre el diacilglicerol y el ácido fosfórico, dando como productos diacilglicerol y derivados fosfatados de la base (Radwan S.S,1987, Lenhinger A.L.,1985). Las enzimas de FLC difieren en cuanto a la especificidad del sustrato, variando de enzimas que hidrolizan la mayoría de los fosfolípidos y otros que sólo actúan en fosfolípidos específicos; como por ejemplo la esfingomielinasa (EC 3.1.4.12), que es una FLC que actúa sólo en esfingomielina y la fosfatidil inositolinasa (3.1.4.10) que actúa sobre fosfatidil inositol (Rosenberg P., 1990).

e) Fosfolipasas D

La fosfolipasa de este grupo se clasifica como EC 3.1.4.4. Su acción es eliminar el grupo de la cabeza polar, dejando ácido

fosfatídico. (Lenhinger A.L.,1985, Rosenberg P.,1990). Esta fosfolipasa es la que se encuentra en mayor abundancia en tejidos vegetales. También se encuentra en bacterias y mamíferos, donde interviene alterando (por reemplazamiento) las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana.

## 2.2. LOCALIZACION

Las fosfolipasas están ampliamente distribuidas, y algunas de las fuentes más ricas se indican en la Tabla 1. La FLA1 puede estar en más de un sitio subcelular: en el hígado de rata se ha encontrado en membrana plasmática, microsomas, membranas de Golgi, lisosomas y en el citoplasma. La FLA2 se ha encontrado en casi todas las células, aunque las principales fuentes son en venenos de serpientes y secreciones pancreáticas. La lisofosfolipasa se encuentra en células eucariontes y procariontes. En mamíferos se encuentra en microsomas y citosol. La FLC, las enzimas fosfatidil inositolinasa y la esfingomielinasa, se encuentran en cantidades muy grandes en preparaciones microbianas. La localización *in situ* de la FLD en células de plantas es todavía incierta, mientras que en células de mamíferos se han encontrado en cantidades muy escasas.

## 2.3. EFECTOS FARMACOLOGICOS DE LA FLA2

La FLA2 puede mediar una gran variedad de reacciones fisiopatológicas, ya sea por una acción directa o a través de la subsiguiente transformación de sus productos ( lisofosfolípidos y ácido araquidónico) en potentes sustancias biológicas, como prostaglandinas y activador de plaquetas. Los lisofosfolípidos, coproductos de la acción de las FLA1 y FLA2, son sustancias citotóxicas, que causan lisis en eritrocitos. Esto sugiere que tienen habilidad para causar rompimiento de las membranas. Los lisofosfolípidos siguen siendo anfífilicos, pero al perder una de las cadenas hidrofóbicas, se vuelven más hidrofílicos, adquiriendo características de detergentes fuertes lo cual los hace muy citolíticos (Chang J.,1987, Rosenberg P.,1990, Mead J.F., 1986).

Las FLA2 incrementan la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos, que a su vez puede ser usado como precursor para la

TABLA 1  
Fuentes de fosfolipasas

FLA1	<u>Tejidos de mamíferos</u> microsomas, membrana plasmática, lisosomas Bacterias
FLA2	Tejidos de mamíferos microsomas, membrana plasmática, lisosomas y mitocondrias <u>Secreciones pancreáticas</u> <u>Venenos de serpientes</u> Venenos de abeja y avispa Bacterias
FLB-LFL	<u>Tejidos de mamíferos</u> Secreciones pancreáticas Venenos de serpientes <u>Venenos de abeja y avispa</u> Bacterias
FLC	Tejidos de mamíferos <u>Bacterias</u> Plantas
FLD	Tejido de mamíferos Bacterias <u>Plantas</u>

Las fuentes más ricas de cada fosfolipasa están subrayadas

síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que completan una familia de agentes inflamatorios y mediadores de alergias. La liberación de FLA2 en intersticios celulares origina procesos inflamatorios. Se cree que los esteroides antiinflamatorios inhiben la FLA2 a través de la inducción de una proteína inhibitoria de FLA2 llamada lipocortina. Por lo tanto, la industria farmacéutica desarrolla experimentos en roedores, con inhibidores de FLA2 como tratamientos de procesos inflamatorios (Chang F., 1987).

En células de mamíferos existe la interacción de FLA2 intracelular con membranas, y ésta está involucrada en el recambio de fosfolípidos en membranas. Se sabe que los lípidos de membrana pueden influenciar la función de las proteínas de membrana. Por ejemplo, la hidrólisis de fosfolípidos por FLA2 puede bajar la actividad de la ATP-asa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y la citocromo oxidasa y la  $\beta$ -hidroxibutarato deshidrogenasa requieren uno o más fosfolípidos para su funcionamiento óptimo (Rosenberg P., 1990).

Las FLA2 de venenos de serpientes tienen varios efectos farmacológicos entre los que se encuentran: neurotoxicidad presináptica, miotoxicidad, cardiotoxicidad, actividad anticoagulante, convulsionante, hipotensiva, hemolítica, hemorrágica y efecto inductor de edema. Las propiedades catalíticas comunes y el alto grado de homología estructural en las FLA2 hacen que la relación estructura-función sea difícil de estudiar, sugiriendo la presencia en la misma proteína de sitios separados, y probablemente superpuestos, en donde se lleva a cabo la acción farmacológica (Kini R. M. y Evans H.J., 1987).

## II- OBJETIVOS

Debido a que se conoce muy poco sobre las fosfolipasas del veneno de alacranes, el objetivo general de esta tesis fue la caracterización bioquímica de una fosfolipasa del veneno del alacrán Mexicano: *Hadrurus concolourus*.

Entre los objetivos específicos de la tesis están:

- 1.- Obtención del veneno.
- 2.- Determinación de la toxicidad del veneno por medio de bioensayos en crustáceos, mamíferos e insectos.
- 3.- Separaciones cromatográficas mediante exclusión molecular, intercambio iónico, afinidad y alta presión. Determinación de actividad de fosfolipasa en cada una de las fracciones.
- 4.- Determinación de la secuencia amino terminal de la fosfolipasa.
- 5.- Caracterización fisiológica de la acción de la fosfolipasa.

### III- MATERIAL Y METODO

#### 1. OBTENCION Y CONSERVACION DEL VENENO

Los alacranes *Hadrurus concolorurus* se capturaron en el estado de Baja California. El veneno crudo, obtenido por estimulación eléctrica de el telson, de los ejemplares previamente anestesiados con bióxido de carbono, se recogió en cajas de Petri, se recuperó con agua bidestilada y se centrifugó a 10,000 r.p.m. por 15 min. (centrifuga Beckman equipada con un rotor JA-20), liofilizándose inmediatamente el sobrenadante y guardando el veneno seco a -20 °C hasta su uso posterior.

El veneno liofilizado (36 mg) se resuspendió en 1.5 ml de amortiguador de acetato de amonio 20mM, pH 7.0 y se aplicó a una columna de Sephadex G-50 superfino (Pharmacia).

#### 2. SEPARACIONES CROMATOGRAFICAS.

##### 2.1. Exclusión Molecular.

Para este tipo de cromatografías se utilizó Sephadex G-50 superfino obtenido de Pharmacia Fine Chemicals (Suecia), hidratado y preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La columna utilizada fue de 0.90 cm de diametro por 200 cm de largo, empacada por gravedad y funcionando a presión constante. El amortiguador utilizado fué de acetato de amonio 20mM, pH 7.0 con NaCl 150 mM.

##### 2.2. Columna de afinidad.

Se utilizó una resina de Sepharosa-4B unida a inhibidor de Rosenthal (Vargas y col.,1991). Se aplicaron 9 mg de la fracción II en un volumen de 9 ml. Se hizo un seguimiento de las fracciones midiendo la absorbancia a 280 nm. Los componentes que no se unen a la columna se desplazan con el amortiguador de la columna y cuando la absorbancia llega a la basal, se aplican los siguientes amortiguadores: Tris-HCl 25mM pH 7.7 con 0.5 M de NaCl; Tris-HCl

pH 7.7 con EDTA 0.5 M; 0.1 M de ácido acético y 1 M de ácido acético. esperando entre cada uno que la absorbancia llegue a la basal nuevamente. Las fracciones que se obtuvieron con 0.1 M y 1.0 M de ácido acético se recibieron en 1 ml de amortiguador de Tris-HCl 1.0 M pH 7.7.

### 2.3. Cromatografía líquida de alta presión (CLAP)

La separación de la fracción II-5 se realizó en una columna de fase reversa C4 (4.6 x 150 mm), equilibrada previamente con una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.12% en agua. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0- 60% de una solución de TFA al 0.1% en acetonitrilo por 60 minutos, a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron recromatografiadas en un gradiente isocrático para corroborar su pureza.

### 2.4. Intercambio iónico.

La resina utilizada para estas cromatografías fue carboximetilcelulosa (CM-32), la cual se obtuvo de Whatman Inc. y se procesó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las columnas (0.9 x 30 cm) se empacaron con presión de nitrógeno, aproximadamente a una atmósfera de presión y operadas con una bomba peristáltica tipo Milton Roy de flujo controlado. El amortiguador fue acetato de amonio, 20 mM pH 4.7, con un gradiente de 0.0 a 0.5 M de NaCl.

## 3. BIOENSAYOS

### 3.1. Pruebas de Toxicidad.

La toxicidad del veneno total se ensayó en mamíferos (ratones), crustáceos (acociles), isópodos (cochinillas) e insectos (grillos) administrando concentraciones variables del veneno total por vías diferentes dependiendo del organismo en cuestión.

Los ratones albinos, cepa CD1, se inyectaron intraperitonealmente (50,100 y 200  $\mu\text{g}/20\text{ g}$ ); los acociles en la cavidad torácica y lumbar (10, 20, 30, 40, 60, 80 y 90  $\mu\text{g}/600\text{ mg}$ ); las cochinillas en la cavidad torácica (6-20  $\mu\text{g}/50\text{ mg}$ ) y los grillos (10, 20, 30, 40, 60, 80 y 90  $\mu\text{g}/800\text{ mg}$ ) por la región intraabdominal.

Las fracciones se consideraron letales si producían la muerte del animal de ensayo ; tóxicas si sólo inducían algún tipo de efecto (excitabilidad, convulsiones, aletargamiento, dificultad para moverse y parálisis) pero no la muerte; y no tóxicos cuando no produjeron efectos detectables, o cuando el comportamiento era semejante a la aplicación de un volumen igual del amortiguador utilizado. Los animales se mantenían en observación por un lapso de 24 hrs.

### 3.2. Determinación de la Dosis Letal Media.

Para la determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) se utilizaron 48 cochinillas, de aproximadamente 50 mg de peso corporal, que se dividieron en seis lotes de ocho cochinillas. A cada lote se les administró una dosis diferente del veneno total. El tiempo de observación fue de 24 hrs.

Las concentraciones de proteína se determinaron por densidad óptica, asumiendo que una unidad de absorbancia a 280 nm es igual a 1 mg/ml, medida en una celda de cuarzo de un cm de camino óptico.

## 4. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA

Para la detección de la actividad de fosfolipasa se utilizaron geles de agarosa-rodamina-yema de huevo (Alagón y col. comunicación personal) que se prepararon de la siguiente manera:

4.1. Preparación del sustrato de yema de huevo: Se separa una yema de huevo y se homogeniza vigorosamente a una concentración (P/V) de 10% en un amortiguador 0.1M de Tris-HCl pH 7.95 con 5 mM

de  $\text{CaCl}_2$  y 0.5 % de triton X-100. La suspensión se centrifuga a 500 X g por 5 minutos, se toma el sobrenadante para uso inmediato. Si es necesario se puede almacenar por una o dos semanas a  $-20^\circ\text{C}$ , siempre y cuando se congele inmediatamente después de prepararla.

4.2. preparación de los geles de agarosa-rodamina-yema de huevo.

- 1) 10 ml de agarosa al 1% (fundida en 20mM Tris-HCl pH 7.95).
- 2) 8 ml de rodamina 6G al 0.1%. (se filtra la solución al prepararla).
- 3) 2 ml de sustrato de yema de huevo,
- 4) 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  20 mM.
- 5) 0.1ml de tritón X-100.

Los reactivos se mezclan a una temperatura ligeramente mayor de  $40^\circ\text{C}$ , teniendo un volumen final de 20 ml, se vacía en una caja de Petri de 14 cm de diametro y se deja gelificar en un lugar nivelado.

4.3. Procedimientos electroforéticos.

Los geles de poliacrilamida al 12% se preparan según el método descrito por Laemmli,(1970).

Una vez realizada la separación electroforética se lava dos veces el gel, 1hr por cada vez, en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Triton X-100 5%; y se lava una vez por 30 minutos en Tris-HCl pH 8.0 50 mM , Triton X-100 0.5%. El gel e enjuaga con agua y se coloca sobre una caja que contiene un gel de agarosa-rodamina-yema de huevo que se describió anteriormente.

## 5. DESALADO DE PROTEINAS

### 5.1. Diálisis.

Para desalar las fracciones obtenidas de las cromatografías de exclusión molecular y de afinidad, se utilizaron bolsas de diálisis Spectrapor tipo 3, limite de exclusión de 3,500 Daltons (Spectrum

Medical Industries, Los Angeles, CA, U.S.A).

Las diálisis se llevaron a cabo a 4°C, contra agua bidestilada (100 veces el volúmen), con cuatro cambios de 30 minutos cada uno.

## 5.2. COLUMNA DE SEPHADEX G-10

Se preparó una columna con Sephadex G-10 (Sigma) para desalar. La resina se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna utilizada fue de 0.9 x 50 cm, empacada por gravedad y operada a presión constante con ayuda de un reservorio de Mariotte.

## 6. DETERMINACION DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS

La secuencia de aminoácidos amino terminal de la fosfolipasa pura fue obtenida en el laboratorio del Dr. Brian Martin, del National Institute for Mental Health (USA), utilizándose un microsecuenciador Millipore 6600 ProSequencer (Milligen).

Este aparato realiza la degradación de Edman de forma automática, convirtiendo el aminoácido tioazolinina a feniltiohidantoína (PTH-aminoácido) e inyectándolo en una cromatografía de alta presión para identificación de los tiempos de retención, como se ha descrito (Zamudio F. y col., 1992).

## IV- RESULTADOS

### 1. DETERMINACION DE TOXICIDAD DEL VENENO TOTAL

Se inyectaron tres ratones albinos, de la cepa CD1, de 20 g de peso corporal, con 50, 100 y 200  $\mu\text{g}$  de veneno total (de 2.5 a 20  $\mu\text{g}/\text{gr}$ ), respectivamente, y se mantuvieron en observación durante 24 horas. Los ratones no presentaron sintomatología en ninguna de las dosis administradas, por lo que se concluye que el veneno, del alacrán *Hadrurus concolourus* no es tóxico a mamíferos. Obsérvese que los alacranes peligrosos, como el *C. noxius* tiene una  $\text{LD}_{50}$  de alrededor de 5  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  (Dent y col., 1980).

Para explorar el efecto del veneno en artrópodos, se inyectaron acociles (crustáceos) y grillos (insectos) con pesos corporales de 600 y 800 mg, respectivamente, con varias concentraciones del veneno total (10, 20, 30, 40, 60, 80 y 90  $\mu\text{g}$ ) en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  y se mantuvieron en observación por 12 horas. Se encontró que el veneno es tóxico para los grillos a cantidades mayores a 80  $\mu\text{g}/\text{animal}$  (100  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). En los acociles su efecto es mayor, siendo letal a partir de 80  $\mu\text{g}/\text{animal}$  (133  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). Los grillos presentaron síntomas de parálisis, pero se recuperaron después de 1 hora. En la tabla 2 se muestra la toxicidad del veneno total en los animales inyectados: mamíferos (ratones), crustáceos (acociles), isópodos (cochinillas) e insectos (grillos).

También se observó que este veneno es tóxico para cochinillas y se determinó que la dosis letal media es de 8.7  $\mu\text{g}/50$  mg de peso corporal en estos animales (174  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). En la figura 2 se muestran los experimentos realizados en cochinillas para determinar la dosis letal media.

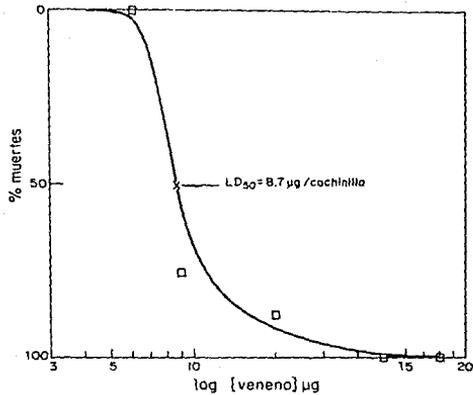
### 2. SEPARACION POR PESO MOLECULAR.

El veneno total disuelto en 1.5 ml de amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 7.0 se aplicó a una columna (0.9 x 200 cm) de Sephadex G-50 superfino equilibrada y operada con el mismo amortiguador.

TABLA 2

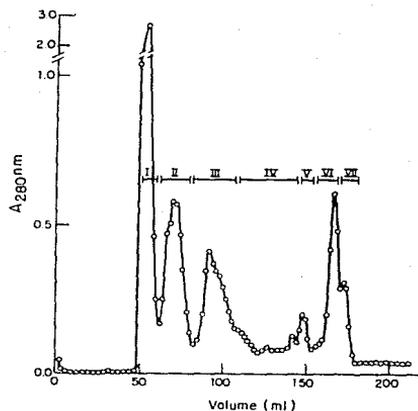
TABLA DE TOXICIDAD DE VENENO TOTAL

	$\mu\text{g}$ inyectados	$\mu\text{l}$ inyectado	TOXICIDAD
<b>MAMIFEROS</b>			
ratón	50.0	100	No tóxico
ratón	100.0	100	No tóxico
ratón	200.0	100	No Tóxico
<b>ISOPODOS</b>			
cochinilla	6.0	2	No Tóxico
cochinilla	9.0	2	Letal
cochinilla	12.0	2	Letal
cochinilla	15.0	2	Letal
cochinilla	18.0	2	Letal
<b>CRUSTACEOS</b>			
acocil	10.0	10	No Tóxico
acocil	20.0	10	No Tóxico
acocil	30.0	10	No Tóxico
acocil	40.0	10	No Tóxico
acocil	60.0	10	No Tóxico
acocil	70.0	10	No Tóxico
acocil	80.0	16	Letal
acocil	90.0	16	Letal
<b>INSECTOS</b>			
grillo	10.0	10	No Tóxico
grillo	30.0	10	No Tóxico
grillo	40.0	10	No Tóxico
grillo	60.0	10	No Tóxico
grillo	80.0	16	No Tóxico
grillo	90.0	16	Tóxico
grillo	100.0	16	Tóxico



**Figura No. 2: Determinación de la dosis letal media del veneno total de *Hadrurus concolourus* en cochinillas.**

ANIMALES CON EFECTO/ ANIMALES PROBADOS	DOSIS µg/50mg	µl INYECTADOS	% MUERTAS
0/8	6.0	2	0
6/8	9.0	2	75
7/8	12.0	2	87.5
8/8	15.0	2	100
8/8	18.0	2	100



**Fig. 3: FILTRACION EN SEPHADEX G-50 DEL VENENO TOTAL DE *Harurus concolourus*.**

En una columna (0.9 x 200 cm) de Sephadex G-50 superfino, equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 7.0 con NaCl 150 mM se aplicaron 36 mg de veneno en 1.5 ml del amortiguador. La velocidad de flujo fué de 18 ml/hr y las fracciones colectadas de 2 ml cada una. La absorbancia a 280 nm fue leída y los resultados graficados en función del número de tubos colectados. Los tubos correspondientes a las fracciones indicadas (I-VII) fueron mezclados como indican las barras horizontales.

**TABLA 3**  
**RECUPERACION DE LOS COMPONENTES CROMATOGRAFICOS**  
**OBTENIDOS EN LA COLUMNA DE SEPHADEX G-50**

Componente proteico	recuperación (mg)	recuperación % <sup>a</sup>	Fosfolipasa actividad <sup>b</sup>
Veneno soluble (36 mg)	36.00	100.00	++++
Fracción I	15.80	43.88	++
II	5.91	16.39	++++
III	2.83	7.86	+
IV	2.73	7.59	ND
V	0.93	2.58	ND
VI	1.95	5.41	ND
VII	4.71	13.08	ND
Recuperación Total	34.31	95.30	

<sup>a</sup> Los valores reportados son porcentajes calculados del número de unidades de absorbancia, a 280 nm, recuperadas.

<sup>b</sup> En cada una de las fracciones se probó actividad de fosfolipasa en geles de agarosa-rodamina-yema de huevo y se determinó la actividad de manera cualitativa, esto es: ++++ indica una actividad muy franca de fosfolipasa al que llamamos 100% de actividad, ++ indica un 50 % de actividad, + Indica un 25% de actividad, ND indica no detectado.

El veneno se separó en siete fracciones (I a la VII, Fig. 3) y a cada una de ellas se le determinó la actividad de fosfolipasa en geles de agarosa-rodamina-yema de huevo. La fracción II mostró ser positiva para actividad fosfolipásica. En la tabla 3 se muestran los resultados de la recuperación de la columna de Sephadex G-50.

### 3. PURIFICACION POR COLUMNA DE AFINIDAD

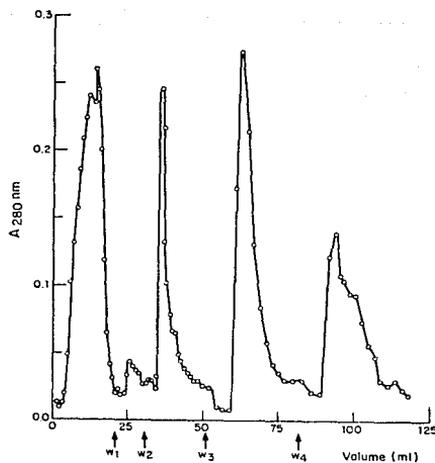
En vista de que en la fracción II se encontró la actividad de fosfolipasa, se decidió aplicar la muestra en una columna de Sepharosa 4-B unida a inhibidor de Rosenthal. El inhibidor de Rosenthal (IR) es un análogo no hidrolizable de la fosfatidilcolina (dimetil- dl- 2,3- diestearoilpropil- 2' - hidroxietil acetato de amonio) (Rosenthal A.F. y col., 1960). Vargas y col.(1991) mostraron que acoplado el IR a un soporte sólido, permitía el uso de este inhibidor de fosfolipasa para atrapar de forma selectiva a enzimas con esta actividad, a partir de una mezcla. Por esta razón utilizamos esta resina de afinidad para purificar la fosfolipasa del veneno de *Hadrurus concolourus*.

Inicialmente se resuspendió la fracción II en Tris-HCl 25 mM pH 7.7 y se dializó con tres cambios contra agua 30 minutos y un cambio contra el amortiguador de corrida Tris-HCl 25 mM, pH 7.7, con  $\text{CaCl}_2$  25 mM.

Se aplicaron 9 mg de la fracción II en un volumen de 9 ml a una columna de afinidad de tres ml de capacidad. La columna fue lavada como se describe en la sección de materiales y métodos.

Utilizando cajas de agarosa-rodamina-yema de huevo, se ensayaron todas las fracciones obtenidas en la columna de afinidad (Fig. 4). Los componentes liberados con 0.1 y 1.0 M de ácido acético resultaron ser fosfolipasa positivos. A estas fracciones las denominamos fracción II-4 y Fracción II-5, respectivamente.

La fig. 4 muestra el perfil cromatográfico de la columna mientras que la tabla 4 contiene los datos de recuperación de esta columna.



**Figura No. 4** Cromatografía de afinidad de la fracción II.

Se utilizó una resina de Sepharosa 4-B unida a inhibidor de Rosenthal (Vargas y col., 1991). Se aplicaron 9 mg de la fracción II de la cromatografía de exclusión en un volumen de 9 ml. Se hizo un seguimiento de la corrida midiendo la absorbancia a 280 nm. W1 indica lavado con un amortiguador de 25 mM de Tris-HCl, pH 7.7 en 0.5 M de NaCl. W2 corresponde a la elución con el mismo amortiguador conteniendo 0.5 M de EDTA en lugar de NaCl. W3 y W4 indican lavados con 0.1 y 1.0 M de ácido acético, respectivamente.

**TABLA 4**  
**RECUPERACION DE LA COLUMNA DE AFINIDAD**

Columna usada	Componente protéico	Recuperación (mg)	Recuperación % <sup>a</sup>	Fosfolipasa actividad <sup>b</sup>
Sefarosa 4-B unida a Inhibidor de Rosenthal	Fracción II	9.00	100.00	+
	Fracción II.1 (w1)	2.42	26.90	ND
	Fracción II.2 (w2)	0.38	4.24	ND
	Fracción II.3 (w3)	0.95	10.60	ND
	Fracción II.4 (w4)	1.82	20.29	+
	Fracción II.5 (w5)	1.27	14.18	+
	Tubos laterales	0.68	7.50	ND
	Proteína recuperada	7.40	82.00	

<sup>a</sup> Los valores reportados son porcentajes calculados del número de absorbancia a 280 nm recuperadas.

<sup>b</sup> A cada una de las fracciones se le probó actividad de fosfolipasa en geles de agarosa-rodamina-yema de huevo: + indica actividad de fosfolipasa, ND indica no detectado.

#### 4. DESALADO DE LAS FRACCIONES II-4 y II-5 POR UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-10.

Todas las fracciones presentaron un alto contenido de sales por lo que se dializaron con 3 cambios contra agua (30 min cada uno) y se liofilizaron. Se resuspendieron las fracciones II-4 y II-5 en 1 ml y se pasaron por una columna de Sephadex G-10 para desalar, como se describe en la sección de Materiales. Se colectaron fracciones de 1 ml. Debido a que el desalado no elimina los contaminantes protéicos la enzima, además de ser un proceso muy sencillo, no se muestran las gráficas correspondientes. Las fracciones se recuperaron y liofilizaron.

#### 5. PURIFICACION DE LA FOSFOLIPASA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (CLAP)

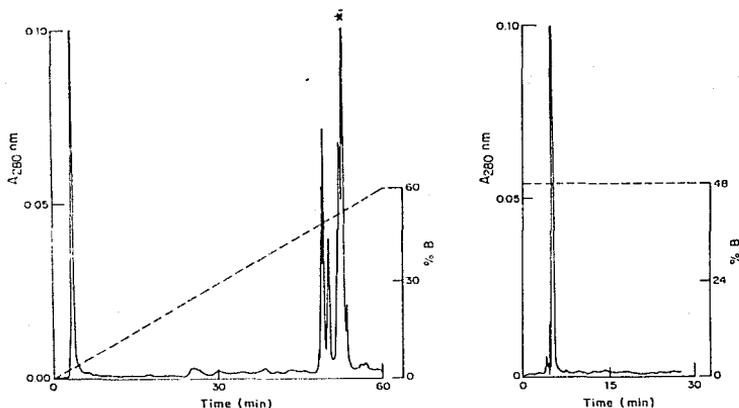
La fracción II-5 se resuspendió en 1ml de agua, se inyectó en una columna de fase reversa  $C_4$  y se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo de 0 al 60%. Las fracciones se fueron recolectando en tubos que contenían 1 ml de un amortiguador de acetato de amonio 0.5 M pH 8.0. Se tomaron 5  $\mu$ l de cada una de las fracciones y se probó actividad de fosfolipasa en cajas de agarosa-rodamina-yema de huevo.

El componente principal presentaba la más clara actividad de fosfolipasa, por lo que se secó en un aparato Savant y se recuperó en 0.5 ml de agua .

Esta fracción se volvió a aplicar en un sistema isocrático para corroborar su pureza. Para este caso se utilizó como eluyente 48% de acetonitrilo en una columna  $C_4$  de CLAP. Se decidió hacer este paso porque los componentes en la cromatografía estaban muy juntos y para asegurarnos una mejor separación se usó el isocrático en las mismas condiciones del gradiente lineal que utilizaron para liberar las muestras.

Cada una de las fracciones se recuperaron en 1 ml del amortiguador de acetato de amonio, 0.5 M pH 8.0. Se tomaron 5  $\mu$ l y

se les determinó actividad de fosfolipasa en una caja de agarosa-rodamina-yema de huevo. El componente principal que se observa en la fig 5 mostró ser fosfolipasa positiva (asterisco). Esta fracción se liofilizó.



**Figura No. 5. Cromatografía líquida de alta presión.**

La separación de la fracción II-5 se realizó en una columna de fase reversa C<sub>4</sub> (4.6 X 150 mm) equilibrada previamente con una solución de TFA al 0.12% en agua. La liberación se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0 - 60 % de un solución de TFA, al 0.1 % en acetonitrilo, en 60 minutos, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron re cromatografiadas en un sistema isocrático para corroborar su pureza (cromatograma del lado derecho).

## 6. ELECTROFORESIS DEL VENENO Y FRACCIONES PURIFICADAS.

El patrón electroforético del veneno soluble y de las subfracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión por peso molecular (Fig. 3) se muestran en la Fig. 6, utilizando un gel de poliacrilamida al 12%, en presencia de SDS, según el método de Laemmli (1970). En esta figura, los carriles 1 y 6 muestran el perfil de separación de varios marcadores de peso molecular, cuyo peso molecular está indicado en kDa a la izquierda de la figura. Los carriles 2 y 5 corresponden a la separación del veneno soluble. Por lo menos 18 componentes distintos se observan en este gel. Así mismo, los carriles 3 y 4 representan la separación de la fracción II y I, de la columna de Sephadex G-50, respectivamente. La fracción I (carril 4), como era esperado, está enriquecida por componentes de alto peso molecular. La fracción II (carril 3) contienen un menor número de componentes. Existe una banda doble alrededor de 30 kDa y otras bandas muy intensas en un peso molecular que corresponde a componentes de alrededor de 13 a 15 kDa. Estas bandas están muy cercanas, dando la impresión de ser una sola y probablemente correspondan a las fosfolipasas.

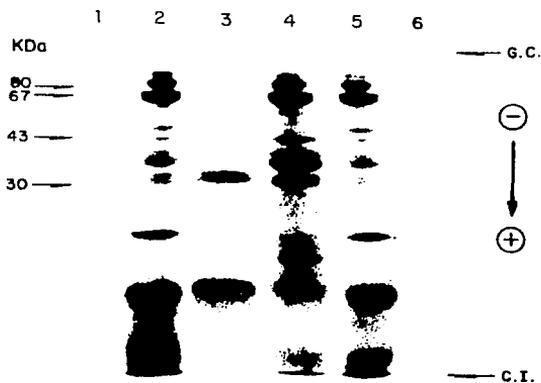
En la Fig. 7 mostramos un experimento similar al anterior, utilizando un gel de poliacrilamida al 12%, procesado de acuerdo a la metodología descrita en la página 15 de la sección de material y métodos; y colocado el gel sobre una caja que contiene un gel de agarosa-yema de huevo-rodamina, con la finalidad de revelar la presencia de actividad fosfolipásica al dejar que las bandas correspondientes a las fosfolipasas difundan al gel de agarosa-yema de huevo-rodamina y nos de actividad. La detección de la actividad de esta enzima se hace mediante iluminación con luz ultravioleta los ácidos grasos libres con la rodamina hacen que esta ya no fluoresca por lo tanto, donde hay actividad no hay fluorescencia, la detección de distintos tonos de color que se observa en la figura 7 se deben a la presencia de actividad fosfolipásica y de exceso de rodamina (parte inferior). El carril 1 contiene una muestra de veneno de *Heloderma horridum horridum*, el cual contiene una enzima con actividad fosfolipásica única, bien característica. Los carriles 2 a 4 corresponden a la fracción II-5,

fracción II y veneno soluble de *Hadrurus concolourus*, respectivamente. La fracción II proviene de la separación en Sephadex G-50, mientras que la sub-fracción II-5 es obtenida por columna de afinidad (Fig. 4). Es interesante observar que en los carriles 2 a 4, que corresponden al veneno de *Hadrurus concolourus* aparecen de 2 a 4 componentes. La interpretación de este gel, como se discutirá más adelante, sugiere la presencia de dos fosfolipasas distintas, y la presencia de dímeros de estas mismas fosfolipasas (posición en que migran menos). Las fosfolipasas de veneno, en general, presentan siempre un equilibrio entre una forma monomérica y una dímica (Rosenberg, P. 1991).

Finalmente, en la Fig. 8 se muestra la separación de la fracción II y el veneno crudo en gel de poliacrilamida (parte superior) y la detección histoquímica. Por un lado se trata de una muestra independiente aplicada en un gel de poliacrilamida al 15% y colocada sobre un gel de agarosa-yema de huevo-rodamina, para revelar la presencia de actividad fosfolipásica; realizándose posteriormente una tinción con plata del mismo gel para localizar o mejor, co-localizar la actividad fosfolipásica con bandas protéicas. La actividad enzimática detectada en este gel es muy débil debido a la cantidad de muestra aplicada; sin embargo permite tener una idea de los pesos moleculares de las mismas (alrededor de 12 kDa y 13 kDa) conforme a la Fig. 8 A. En esta figura el carril 1 contiene una muestra de la fracción II de la columna de Sephadex G-50. Este gel al ser colocado sobre la luz ultravioleta, da una banda (ver Fig. 8 B) con un peso molecular aproximado de 14 kDa. Obsérvese que la foto de la Fig. 8 B es un poco más pequeña que la de la Fig. 8 A, debido a que el gel al ser tratado para teñirlo con plata encogió un poco. El carril 2 de la Fig. 8 A contiene una muestra de veneno soluble de *Hadrurus concolourus*, y presenta las dos isoenzimas con actividad, con peso molecular aparente de 13 kDa y 12 kDa (Fig. 8 A), mientras que el carril 3 corresponde a marcadores de peso molecular, según lo indican los números, expresados en miles de Daltones (kDa) a la derecha de la misma foto.

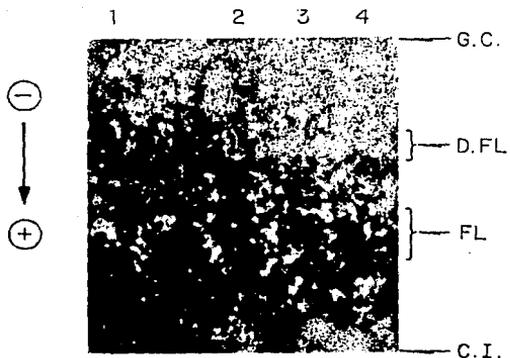
La conclusión de estos resultados es de que en el veneno soluble de *Hadrurus concolourus* hay por lo menos dos actividades distintas

de fosfolipasas, en equilibrio con los dos dimeros correspondientes. La fracción II-5 de la cromatografía de afinidad está enriquecida en las fosfolipasas mencionadas, con peso molecular aparente de 12 kDa y 13.5 kDa, las cuales pueden ser finalmente separadas en la cromatografía líquida de alta presión (Fig 5)



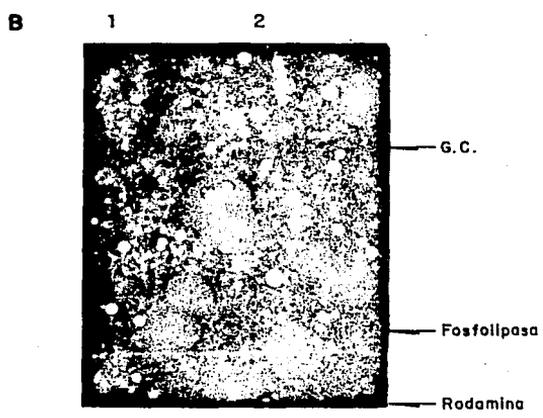
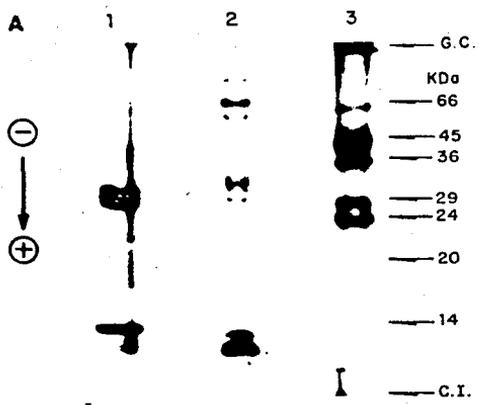
**Figura No. 6: Separación electroforética del veneno en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.**

El sistema de Laemmli (1970) con poliacrilamida al 12% fué utilizado para separar el veneno soluble de *Hadrurus concolorus*: carriles 2 y 5, (40  $\mu$ g cada uno), fracción I (carril 4, 40  $\mu$ g) y fracción II (carril 3, 20  $\mu$ g) de la separación en Sephadex G-50 del veneno. Carriles 1 y 6 contiene marcadores de peso molecular (2  $\mu$ g), Conalbumina (80 kDa), Albúmina B. (67 kDa), Ovalbúmina (43 kDa) y Anhidrasa carbónica (30 kDa). El gel fué teñido con azul de coomassie. G.C. significa gel de corrida, mientras C.I. significa la posición de migración del colorante indicador.



**Figura No. 7: Actividad del veneno en gel de agarosa-yema de huevo-rodamina.**

Gel de poliacrilamida al 12%, en presencia de SDS al .1%, después de ser tratado como se indica en la página 15 de Material y Métodos, se colocó sobre un gel de agarosa-yema de huevo-rodamina. Carril 1 ( $1\ \mu\text{g}$ ) veneno de *Heloderma horridum horridum*; carril 2 ( $7\ \mu\text{g}$ ) fracción 11-5 de la columna de afinidad; carril 3 ( $20\ \mu\text{g}$ ) fracción II y carril 4 ( $30\ \mu\text{g}$ ) veneno soluble de *Hadrurus concolourus*. D.FL indica el sitio probable de los dímeros de fosfolipasa, mientras que FL señala el doblete de fosfolipasa. G.C. significa gel de corrida y C.I. colorante indicador.



**Figura No. 8: Separación electroforética en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y detección de actividad de fosfolipasa en gel de agarosa-yema de huevo-rodamina.**

**A.** Gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS al .1% y teñido con plata: carril 1, fracción II de Sephadex G-50 (5µg); carril 2, veneno soluble de *Hadrurus concolourus* (5µg); carril 3, marcadores de peso molecular: 66 kDa (albúmina sérico bovina), 45 kDa (albúmina de huevo), 36 kDa (G3P deshidrogenasa), 29 kDa (anhidrasa carbónica), 24 kDa (tripsinógeno), 20 kDa (inhibidor de tripsina de soya) y 14 kDa (lactalbúmina). G.C. significa gel de corrida y C.I. colorante indicador. El gel fué teñido con plata, después de detectar actividad en gel de agarosa-yema de huevo-rodamina para la Fig. B.

**B.** Mismo gel que el de la figura A, pero tratado, antes de teñirlo, como se indica en Materiales y Métodos, y colocado sobre un gel de agarosa-yema de huevo-rodamina para detectar actividad. La flecha a la derecha del gel indica la posición de la actividad de fosfolipasa. Sobre luz ultravioleta solamente el carril 1 y 2 revelaron la presencia de bandas positivas, el carril 3 (no indicado) no presentó bandas positivas, como era de esperarse, por tratarse de los marcadores de peso molecular.

## 6. SECUENCIACION

La fracción de la II-5 que pasó por dos pasos de purificación más en CLAP, y que todavía presentaba actividad de fosfolipasa, se secuenció en forma directa en un secuenciador automático como se describe en la sección de Material y Métodos, y se obtuvo la secuencia del N-terminal que es la siguiente:

Asn	-	Glu	-	Lis	-	Glu	-	Asp	-	Glu	-	Met	-	Ala	-	Asn	-	Arg	-	5	10
N	E	K	E	D	E	M	A	N	R												
																				15	20
Tir	-	Cis	-	Ala	-	Lis	-	Asp	-	Cis	-	Ala	-	Arg	-	Glu	-	Gln	-		
Y	C	A	K	D	C	A	R	E	Q												
																				25	30
Ile	-	Gli	-	Ser	-	Cis	-	Gli	-	Gln	-	Asp	-	His	-	Fen	-	Pro	-		
I	G	S	C	G	Q	D	H	F	P												
																				35	
Lis	-	Fen	-	Met	-	Ser	-	Ile...													
L	F	M	S	I																	

Estos datos son consistentes con los resultados de los geles, presentados en la sección 6 arriba.

La presencia de una sola secuencia de aminoácidos, sugiere que la enzima 1 esta pura.

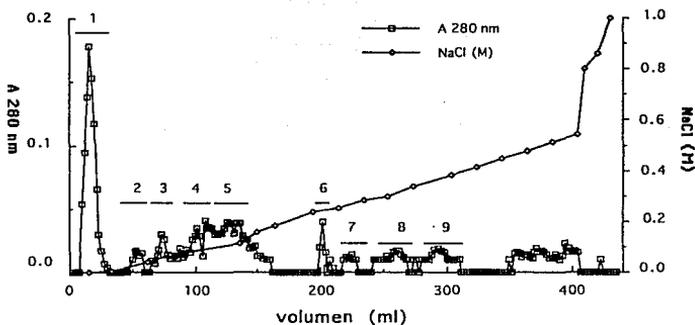
## V- DISCUSION

En este trabajo de tesis hemos podido demostrar, mediante pruebas de toxicidad, que el veneno de *Hadrurus concolorus* no es tóxico a mamíferos, pero podría ser tóxico a insectos, isópodos y crustáceos. El veneno total presenta toxicidad de alrededor de 80  $\mu\text{g}$  en grillos (100 $\mu\text{g}/\text{g}$ ) y es letal arriba de esta cantidad para los acociles (133 $\mu\text{g}/\text{g}$ ). En las cochinillas, donde obtuvimos un efecto más claro, se determinó la dosis letal media que es de 8.7  $\mu\text{g}/50$  mg (174 $\mu\text{g}\backslash\text{g}$ ). La cantidad inyectada en los ratones es muy alta, en comparación con la que se requiere con otros venenos para producir algún efecto, por lo que se puede decir que este veneno no presenta toxicidad en mamíferos.

El veneno total presenta varias proteínas de distintos pesos moleculares: por lo menos 18 proteínas distintas se observaron en geles de poliacrilamida (Fig. 7). Entre las actividades enzimáticas que se detectaron está la de fosfolipasa. La actividad se detectó por medio de geles de agarosa-rodamina-yema de huevo, que es un método muy sensible de detección para esta enzima. En las figuras 8 y 9 se muestran resultados semejantes obtenidos con geles de poliacrilamida sobrepuestos en geles de agarosa-rodamina-yema de huevo.

El veneno total se aplicó a una columna de Sephadex G-50 superfino y se separó en siete fracciones, a las cuales se les hizo pruebas para actividad de fosfolipasa y esta actividad se detectó en la segunda fracción.

Esta fracción se aplicó en una columna de carboximetilcelulosa y en una columna de afinidad 4-B Sepharosa unida al inhibidor de Rosenthal y obteniéndose un mayor rendimiento en la columna de afinidad que en la de CM-Celulosa ( comparar Figura No. 4 y tabla No. 4 con Figura No. 6 , Tabla No. 5), ya que esta columna nos separa de forma selectiva a todas las enzimas que presenten esta actividad, por lo que se prefirió usar esta columna para la purificación de esta proteína.



**Figura 9: Purificación de la Fracción II en una columna de carboxi-metil-celulosa.**  
 Se utilizó una columna de 0.9 X 9.0 cm. con un amortiguador de acetato de amonio pH 4.7. Se aplicaron 8.0 mg de la fracción II de la cromatografía de exclusión y se operó un corrimiento con un flujo de 30 ml por hora, con un gradiente de 0.8 a 0.5 M de NaCl. Las fracciones se colectaron en alícuotas de 2 ml y se les determinó la absorbancia a 280 nm. La gráfica muestra las principales fracciones colectadas con registro de absorbancia y el gradiente de NaCl, determinado por conductancia. Los principales componentes se muestran numeradas en la gráfica.

TABLA 5  
RECUPERACION DE LA COLUMNA CM-CELULOSA

Columna usada	Componente protéico	Recuperación (mg)	Recuperación % <sup>a</sup>
CMC-32	Fracción II	8.0	100
	Fracción II.1	1.932	24.15
	Fracción II.2	0.255	3.18
	Fracción II.3	0.238	2.97
	Fracción II.4	0.988	12.35
	Fracción II.5	1.209	16.13
	Fracción II.6	0.490	6.12
	Fracción II.7	0.160	2.00
	Fracción II.8	0.320	4.00
	Fracción II.9	0.342	4.27
	Tubos laterales	1.032	12.90
Proteína recuperada	6.966	87.07	

<sup>a</sup> Los valores reportados son porcentajes calculados del número de unidades de absorbancia a 280 nm recuperadas.

Después del paso por la columna de afinidad se realizaron dos pasos más para la purificación de una de las enzimas. Se utilizó el método de CLAP en donde se obtuvieron varios componentes que migran muy cercanos (Fig. 5). De estos componentes se observó actividad de fosfolipasa en las fracciones más cercanas al componente mayoritario, que fue el que presentó una actividad más clara de fosfolipasa. Debido a ésto, se siguió procesando esta fracción y se separó de los demás componentes. Se aplicó en un sistema isocrático al 48% de acetonitrilo como eluyente, en una columna C4 de CLAP. De esta cromatografía se obtuvo un componente que aún presentaba actividad de fosfolipasa.

A esta fracción se le determinó la secuencia de los primeros 35 aminoácidos a partir del N-terminal. Esta secuencia fué comparada por medio de un algoritmo de computadora denominado TFASTA, que busca homologías en todo el banco de secuencias "GENEBANK". Las 100 mejores homologías encontradas se ubicaron por debajo de 54 % de similitud, y ninguna fosfolipasa reportada se encontró entre éstas. La tabla 6 que presentamos a continuación nos muestra la secuencia de aminoácidos de 50 fosfolipasas y proteínas homólogas sin actividad. La FLA2 del veneno de abeja presenta una secuencia de aminoácidos muy distinta de las demás enzimas (Secuencia 1). La fosfolipasa pancreática (secuencia 2) presenta una alta homología con fosfolipasas encontradas en los venenos de serpiente (secuencias de la 3 hasta la 50). La fosfolipasa de *H. concolourus* (secuencia 51) no tiene homología con ninguna de la FLA2 presentadas en la tabla 6. La mayoría de las FLA2 tienen siete puentes de disulfuro y son pocas las fosfolipasas tipo A2 que presentan seis puentes de disulfuro. Hasta la fecha no se ha reportado ninguna secuencia de fosfolipasa de veneno de alacrán para poder comparar nuestra secuencia.

En un gel de electroforesis de SDS al 15% con la fracción II y el veneno total se le detectó actividad de fosfolipasa según la metodología descrita en Material y Métodos. Las bandas que presentan actividad de fosfolipasa presentan un peso molecular de 12 kDa y 13.5 kDa, aproximadamente, que es el peso característico de las fosfolipasas tipo A2. Se purificó una sola fosfolipasa y hasta ahora no sabemos si el peso molecular de esta fosfolipasa es de 12 kDa ó 13.5 kDa.

TABLA 6

	1	10	20	30	40	50	60
1	I	IYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACRTHDMCPNVMSAGESKHGLTDTASRLSCNN					
2	ALWQFRSMIKCAIPGSHPLMDFNNYGCYCGLGGSGTPVDELDRCCEETHDNCYRDAKNLSDSC						
3	HLLQFRMKIKKMTGKEPVISYAFYGCYCGSGGRGKDATDRCCFVHDCCYKVKTCGCKPKWDD						
4	SLIKFETLIMKVAKKSGMFWYSNYGCYCGWGGQGRPQDATDRCCFVHDCCYKVKTCGDPKM						
5	NLFQFEKLIKMTGKSGMLWYSAYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCCYKVKTCGCPKM						
6	SVLELGMILGETGKNAITSYGSYGCNCGWGHGKQPKDATDRCCFVHKCCYKKLTDCCNHTK						
7	NLIQFGNMISAMTGKSSLAYASYGCYCGWGGKQPKDDTDRCCFVHDCCYKADKCSPKMI						
8	DLTQFGNMNMGQSVFDYIYGCYCGWGGKGPDPATDRCCFVHDCCYKMGTYDTKWTSYNY						
9	DLTQFGNMNMGQSVFDYIYGCYCGWGGKGPDPATDRCCFVHDCCYKMGTYDTKWTSYNY						
10	NLYQFKNMECAGSRNAGFTNWQALVKYGCYCGPETHDPALEKNGCYTGPLRFGNFNPLAA						
11	NLYQFKNMQCAGTRNAGFTNWQALVKYGCYCGPETHDPALEKNGCYTGPLRFGNFNPLAAK						
12	NLYQFKNMECAGTRNAGFTNWQALVKYGCYCGPETHDPALEKNGCYTGPLRFGNFNPLAA						
13	NLYQFKNMCAGTRPFWGYVNYGCYCGAGSGTVPDELDRCYVHDNICYGAEAKGPCNPKTK						
14	NLNFMEMRYTPCEKTWGEYADYGCYCGAGSGRDPALDRCCYVHDNICYGDAEKHKCNPKT						
15	NLNFMEMRYTPCEKTWGEYADYGCYCGAGSGRDPALDRCCYVHDNICYGDAEKHKCNPKT						
16	NLNFMEMRYTPCEKTWGEYATYGCYCGAGSGRDPALDRCCYVHDNICYGDDAARDNPKTS						
17	SLVQFETLMKVAKRSGLLWYSAYGCYCGWGGHGRPQDATDRCCFVHDCCYKATNCNPKTV						
18	SLVQFETLMKAGRSGLLWYSAYGCYCGWGGHGLPQDATDRCCFVHDCCYKATDCNPKTVS						
19	HLLQFNKMKFZTRKBPWFYAFYGCYCGWGGZGRPKBATBRCCFVHBCCYGLKAKCBTKYWB						
20	NLVQFSYVTCANHNRRSSLDYADYGCYCGAGSGTVPDELDRCCKHDNICYGAEAKQGCYPK						
21	NLVQFKNMKCTVPSRSWVHFANYGCYCGRGGSGTVPDDLDRCCQTHDNICYGAEAKGCRPY						
22	NLVQFSNLQCNVKGSRASYHYADYGCYCGAGSGTVPDELDRCCKHDNICYGAEAKMGCYPK						
23	NLVQFTYLQCANSGKRASYHYADYGCYCGAGSGTVPDELDRCCKHDNICYGAEAKMGCYPK						
24	NLVQFSYLQCANTKGRASYHYADYGCYCGAGSGTVPDELDRCCKHDNICYGAEAKMGCYPK						
25	NLVQFKNMHCTVPNRPWHFANYGCYCGRGGKTPVDDLDRCCQHDKCYDEAKSGCWYPY						

ENZIMATICOS Y COMPARACION CON CON FLAZ PANCREATICA Y DE ABEJA

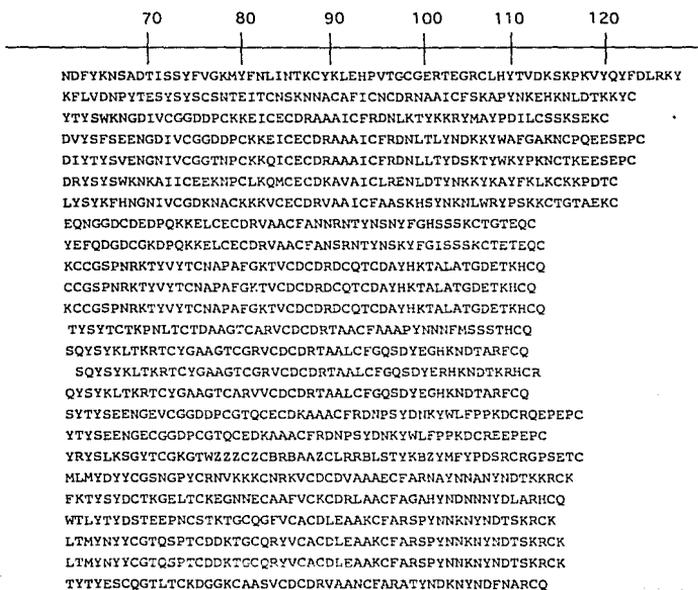


TABLA 6

	1	10	20	30	40	50	60
26	NLYQFKNMQCTV	PNRSWWHF	FANYGCY	CGRGGSGTP	VTDLDRCCQ	HDN	CYGEAEKSGCWPYK
27	NLYQFKNMHCTV	PNRSWWHF	FANYGCY	CGRGGSGTP	VDDLDRCCQ	HDN	CYGEAEKSGCWPYK
28	NLYQFKNMHCTV	PSRPWWHF	FADYGCY	CGRGGKGTAV	DDLDRCCQ	VHDN	CYGEAEKLGCPY
29	NLYQFKNMHCTV	PSRPWWHF	FADYGCY	CGRGGKGTAV	DDLDRCCQ	VHDN	CYGEAEKLGCPY
30	NLYQFKNMHCTV	PSRPWWHF	FADYGCY	CGRGGKGTAV	DDLDRCCQ	VHDN	CYGEAEKMGCPY
31	NLYQFKNMQCTV	PSRPWWF	FADYGCY	CGRGGSGTA	VDDLDRCCQ	VHDN	CYNEAEKSGCWPY
32	NLYQFKNMQCTV	PNRSWWF	FADYGCY	CGRGGSGTA	VDDLDRCCQ	VHDN	CYNEAEKSRCPY
33	NLYQFKNMQCTV	PSRSWWF	FADYGCY	CGRGGSGTA	VDDLDRCCQ	VHDN	CYNEAEKSGCWPY
34	NLYQFKNMKCTV	PSRSWLD	FANYGCY	CGRGGSGTA	VDDLDRCCQ	HDN	CYNEAGKSGSWPYF
35	NLYQFKNMHCTV	PSRSWWHF	FADYGCY	CGRGGKGTAV	DDLDRCCQ	VHDN	CYEKAGKMGSWPY
36	NLYQFSYLQCAN	HGKRPTWH	YMDYGCY	CGAGGSGTP	VDELDRCC	KHDD	CYEAAGKGCFFPK
37	NLYQFSNMQCAN	HGSRPSLA	YADYGCY	CSAGGSGTP	VDELDRCC	KTHDD	CYARATKYSYCT
38	NLYQFSYLQCAN	HGRRPTRH	YMDYGCY	CGWGGSGTP	VDELDRCC	KHDD	CYSDAEKKGCSFK
39	NLLQFGFMRCAN	RRSRPVWH	YMDYGCY	CGKGGSGTP	VDDLDRCCQ	VHD	CYGFVRRFGCA
40	NLYQFGKMECAR	NRPALDFM	NYGCY	CGKGGSGTP	VDDLDRCCQ	VHD	CYEAAGKHCYPS
41	DFFQFSNMQCT	PCGSECLAY	MDYGCY	CGPGGSGTP	DDLDRCC	KTHD	CYAEAGKLSACKSV
42	NLQFGNMQCAN	KSGRPSLD	YADYGCY	CGWGGSGTP	VDELDRCCQ	VHD	CYEQAGKGCFFPK
43	NLQFRKMQCAN	KSGRAAWHY	LDYGCY	CGPGRGTP	VDELDRCC	KHDD	CYEAAGKGCYPKLT
44	GLYQFENMKV	VVKSGLSYS	YAGCY	CGWGGKTP	KDATDRCC	FVHD	CCYGRVTCGNPKLGK
45	HLLQFRMKMK	TGKEPVS	YAFYGCY	CGKGGKPK	DATDRCC	FVHD	CCYKVTGCDPKWSY
46	HLMQFETLM	KAGRSVWV	WYGSY	GCYCGAGGQ	GRPQDPS	DRCC	FVHDCCYGRVTCGNTRDEF
47	SLLEFGMML	GETGKNPL	TSYSFY	GCYCGVGGK	TPKDATDRCC	FVHD	CCYGNLPDCSPKTD
48	SLLEFGMML	GETGKNPL	TSYSFY	GCYCGVGGK	TPKDATDRCC	FVHD	CCYGNLPDCSPKTD
49	NLPQFGDML	QKTGKEAV	HSYAY	GCYCGWGG	KRRQADTRCC	FAQC	DDCYGRATATYYSFEN
50	NLPQFAKMN	GKLGAF	SVWVYSY	GCYCGWGG	QTPKDATDRCC	FAVH	CCYGRVRCGNPKLAY
51	NEKEDEMAN	RYCAKDCARE	QIGSCG	QDHFPL	FMSI		

CONTINUA

70 80 90 100 110

TYTYESCQGLTSCGANNKCAASVCDCCRVAANCFARATYNDKNYNDFNARCO  
TYTYDSCQGLTSCGAANNCAASVCDCCRVAANCFARAPYDKNYNDFNARCO  
LTLYKYECESQGKLTCSGGNNKCEAAVCNCDLVAANCFAGAPYDANYNVLKERCQ  
LTLYKYECESQGKLTSSGGNNKCAAAVCNCDLVAANCFAGARYDNAYNNLKERCO  
FTLYKYKCSQGKLTSSGGNSKCGAAVCNCDLVAANCFAGARYDNAYNNLKERCO  
FKTYSYECSSQGLTCKGGNNCAAAVCDCLRLAACFGGAPYNDNNYDLKARCO  
FKTYSYECSSQGLTCKNGNNCAAAVCDCLRLAACFAGAPYNNNNYNDLKARCO  
FKTYSYECSSQGLTCKGGNNCAAAVCDCLRLAACFAGAPYNNNNYNDLKARCO  
KTYSYECSSQGLTCKGDNNSCAASVCDCLRLAACFAGAPYNNNDYNNLKARCO  
LTLYKYKCSQGKLTCSGGNSKCGAAVCNCDLVAANCFAGARYDANYNFKKRCQ  
MSAYDYCGENGPYCRNKKKCLRFWCDCDVEAAFCFAKAPYNNANWNTKKRCQ  
PYWTLYSWQCEKTPCTCDSKTGCQRFVCD CDATAAKCFKAPYKNENYNDPKKRCQ  
MSAYDYCGENGPYCRNKKKCLRFVCD CDVEAAFCFAKAPYNNANWNTKKRCQ  
PYWTLYSWKCYGKAPTCTNKTTRCQRVFCRCDAAKAAECFARSPYQNSNWNNTKARCR  
LTYTYWECRQVGPYCNCKTQCEVFVACADFAAAKCF AQEDYNPAHSNNTGERCK  
LSEPNNDTYSYECNEGQLTCNDDNDECKAFNCNDRTAVTCFACAPYNDLLYNGMECHK  
LTLYSWKCGNVPTCNSKPGCKSFVCAADAAAACFAKAPYKKNYMDTKKRCQ  
WYSWDCTGDAPT CNPKSKCKDFVCAADAAAACFAKAPYKNANWNTKTRCK  
TYSWQGNVCGDDPCDKEVCECDRAAACFRDNLDTYDRNKYWRYPACNCQEDSEPC  
YTYSLDGDVCGGDPYCTKVKCECDKKAACFRDNLKTYKNKYMTFFDFCTDPTEGC  
YTYTEEGASCGGNDPCLKEBCECDLAAACFRDNLNTYDSKKYWMFPAKNCLESEEP  
RYKYHRENGAVCGKGTSCENRCECDRAAACFRKNLKTYNYHYNYPDFLCKKESEKC  
RYKYHRENGAVCGKGTSCENRCECDRAAACFRKNLKTYNYHYNYPDFLCKKESEKC  
GDVCGDNCLRVNDCNPKAVCECDRAAACLGENVNTYDKNYEYSSHCTESEQ  
SSFKGNVCGKNNGLRDI CECDRVAANCFHQNKNYNYKFLSSSRQRQTESEQ

TABLA 6 CONTINUACION

La identificación de las enzimas y proteínas homólogas no enzimáticas es la siguiente :

NUMERO	FUENTE (NOMBRE COMUN)
1	<i>Apis mellifica</i> ( <i>mellifera</i> ) FLA2 de veneno de abeja.
2	FLA2 de pancreas de porcino.
3	<i>Agkistrodon halys blomhoffi</i> (A2-1).
4	<i>Agkistrodon Halys pallas</i> (ácida).
5	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i> (App-D-49)
6	<i>A. p. piscivorus</i> (App-K-49).
7	<i>Bitis caudalis</i> (caudotoxina).
8	<i>Bitis gabonica</i> .
9	<i>Bitis nasicornis</i> (CM-II).
10 <sup>a</sup>	<i>Bungarus fasciatus</i> (Toxina V-2).
11 <sup>a</sup>	<i>B. fasciatus</i> (toxina V-3).
12 <sup>a</sup>	<i>B. fasciatus</i> (toxina VI).
13	<i>Bulgarus multincinctus</i> .
14	<i>B. multincinctus</i> (βbungarotoxina cadena A1).
15	<i>B. multincinctus</i> (βbungarotoxina cadena A2).
16	<i>B. multincinctus</i> (βbungarotoxina cadena A3).
17	<i>Crotalus adamanteus</i> .(fracción alfa).
18	<i>Crotalus atrox</i> .
19	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (crotoxina--componente básico).
20	<i>Enhydrina schistosa</i> (VI:5).
21	<i>Hemachatus haemachatus</i> (DE-I).
22	<i>Laticauda semifasciata</i> (AI).
23	<i>L. semifasciata</i> (AIII).
24	<i>L. semifasciata</i> (AIV).
25	<i>Naja melanoleuca</i> (DE-I).
26	<i>N. melanoleuca</i> (DE-II).
27	<i>N. melanoleuca</i> (DE-III).
28	<i>Naja mossambica mossambica</i> (CM-I).
29	<i>N. m. mossambica</i> (CM-II).
30	<i>N. m. mossambica</i> (CM-III).

- 31 *Naja naja atra*.  
32 *Naja naja kaouthia* (CM-II).  
33 *N. n. Kaouthia* (CM-III).  
34 *Naja naja axiana*.  
35 *Naja nigricollis*. (CMS-9).  
36 *Notechis scutatus scutatus* (Notexina).  
37<sup>a</sup> *N. s. scutatus* (Notechis II-1).  
38 *N. s. scutatus* (Notechis II-5).  
39 *Oxyuranus scutellatus* (Taipoxina cadena alfa).  
40<sup>a</sup> *O. scutellatus* (Taipoxina cadena beta).  
41 *O. scutellatus* (Taipoxina cadena gama). La  
secuencia empieza en la posición 9, los  
primeros 8 aminoácidos son SELPQPSI.  
42 *Pseudechis australis* (Pa-11).  
43 *P. australis* (Pa-13).  
44 *Trimeresurus flavoviridis* (Dimérico).  
45 *T. flavoviridis* (TFV-PL-X).  
46 *Trimeresurus okinavenesis* (DE-I).  
47 *Vipera ammodytes* (Ammodytoxina A).  
48 *V. ammodytes* (Ammodytoxina B).  
49<sup>a</sup> *V. ammodytes* (Vipoxina- componente A).  
50 *V. ammodytes* (Vipoxina- componente B).  
51 *Hadrurus concolourus*.

---

<sup>a</sup> Proteínas no enzimáticas homólogas a FLA2.

Las secuencias fueron tomadas de Rosenberg (1990).

Nuestro grupo tiene colaboración con el Dr. Héctor Valdivia el cuál trabaja con los receptores de Ryanodina, que median la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico cardíaco y muscular. La activación de las células musculares provoca la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que se encuentra dentro de las pozas celulares. Estudios del canal y de la célula completa muestran que la ryanodina abre el canal, liberando calcio. Cuando ésto sucede, hay una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y dado que la ryanodina sólo afecta los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , se ha usado para detectar la contribución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el acoplamiento de excitación-contracción. Pero la ryanodina tiene varias limitaciones en su uso como sonda en la función del RS. La ryanodina presenta cinéticas lentas de asociación y disociación, que hacen el efecto farmacológico lento y esencialmente reversible; además, de que ciertas concentraciones de ryanodina abren y otras bloquean la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del canal dando lugar a controversias en el mecanismo de acción de dicho canal. Debido a ésto se ha buscado otros ligandos que contribuyan al entendimiento de la función de este canal.

En el veneno del alacrán *Buthus hottentota* se encontró un ligando que selectivamente incrementa la unión de ( $^3\text{H}$ )-ryanodina al receptor y abre el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hector H. Valdivia y col., 1991). Buscando otros posibles ligandos el Dr. Valdivia probó el veneno total de varios alacranes entre ellos el de *Hadrurus concolourus*, y obtuvo una curva de desplazamiento con ( $^3\text{H}$ )-ryanodina. Después probó las fracciones II-4 y II-5 que son las fracciones que se obtuvieron de la columna de afinidad y que corresponden a las fracciones que presentan actividad de fosfolipasa y también obtuvo curvas de desplazamiento (Fig. No. 10). Ahora falta probar si la fosfolipasa pura presenta esta misma actividad para ver si es la misma molécula con las dos actividades.

EFFECT OF HADRURUS TOXINS ON THE BINDING OF [<sup>3</sup>H]RYANODINE TO SR VESICLES  
OF RABBIT SKELETAL MUSCLE

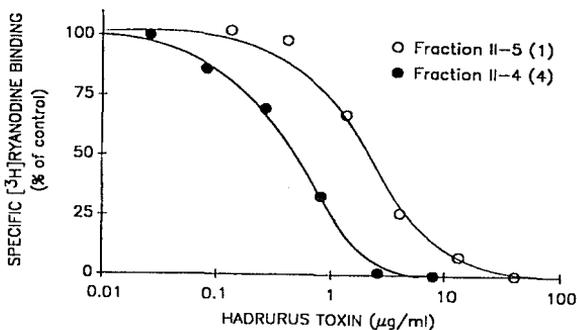


Figura No 10: Curva de Inhibición por las fracciones II-4 y II-5 del receptor de (<sup>3</sup>H)-Ryanodina del retículo sarcoplásmico (RS) de músculo esquelético de conejo. La (<sup>3</sup>H)-Ryanodina (7 nM) se incubó por 2 h a 36 0°C con 0.1 mg/ml de vesículas de RS en un medio que contenía: 200 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 10 mM HEPES-Na, pH 7.2. Las concentraciones indicadas de toxina se pusieron al principio de la incubación. La unión de (<sup>3</sup>H)-Ryanodina en la ausencia de toxinas fue de pmoles/mg de proteína.

Los hallazgos de este trabajo de tesis, en mi opinión, son relevantes en varios aspectos:

1.- Por primera vez se describe la purificación y caracterización a nivel de secuencia de aminoácidos de una fosfolipasa del veneno de alacranes. En la literatura mundial hay muy pocos reportes sobre fosfolipasas del veneno de alacranes. En un trabajo previo publicado en 1990 por Ramanaiah y col., se describe la purificación de una fosfolipasa tipo  $A_2$  del veneno del alacrán *Heterometrus fulvipes* de la India. En este trabajo los autores separan el veneno de *H. fulvipes* por dos pasos cromatográficos; el primero de intercambio iónico en dietilamino-etil-celulosa y el segundo en Sephadex G-50. El peso molecular calculado para esta fosfolipasa es de 16 kDa, por lo tanto muy distinto a las fosfolipasas reportadas por nosotros. Reportan que son específicos para fosfolípidos, con preferencia para fosfatidilcolina, pero no reportan datos de toxicidad a mamíferos u otros animales. También, desafortunadamente no reportan datos químicos (análisis de aminoácidos o secuencia de fosfolipasa), para posibles comparaciones. Hay otro trabajo publicado sobre la existencia de fosfolipasas en venenos de alacranes, por Kar y col. (1986), publicado en la revista Indian Journal of Medical Research, de difícil accesibilidad. Los autores reportan la presencia de actividad fosfolipásica en el veneno del alacrán *Heterometrus bengalensis*, pero no describen la caracterización química de la misma.

2. Por primera vez en México, un veneno de alacranes no peligrosos al hombre es caracterizado bioquímicamente en cuanto al número de componentes proteicos y la especificidad de la ponzoña. En el veneno de *Hadrurus concolourus* existen por lo menos 18 componentes proteicos distintos, y entre éstos, están por lo menos dos fosfolipasas diferentes.

3. El veneno no es tóxico a mamíferos en las dosis ensayadas (hasta 80 veces superiores a la  $DL_{50}$  del veneno del alacrán de Nayarit *Centruroides noxius*), pero es tóxico a acósciles (crustáceos) (133  $\mu\text{g/g}$ ), cochinillas de jardín (isópodos) con una  $DL_{50}$  de 8.7  $\mu\text{g}$

por animal ( $174\mu\text{g/g}$ ) y a grillos (insectos)( $100\mu\text{g/g}$ ). Esto hace este veneno un modelo altamente interesante para el estudio de toxinas especie-específicas.

4. La fracción de fosfolipasa (II-5 de la columna de afinidad) es un excelente fármaco, capaz de desplazar el pegado de ryanodina (un alcaloide de plantas) específico para un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de mamíferos. Este canal es conocido como el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a la ryanodina. Esto lleva a pensar que esta fosfolipasa eventualmente (si fuera accesible al sistema muscular de mamíferos) pudiera causarle daño. Hay muchos interrogantes, posibles asuntos de investigación, que se presentan con estos hallazgos, sobre todo relacionado con la especificidad a especie de los venenos en general.

5. Este trabajo abre el camino para una serie de experimentos futuros que se describen en la próxima sección de esta tesis.

## VI.- PERSPECTIVAS FUTURAS

Entre las perspectivas futuras que se abren con la terminación de este proyecto, algunas de las cuales ya se encuentran en marcha, podemos mencionar:

- 1.- Con la fosfolipasa pura determinar la participación de ésta en la toxicidad del veneno total.
- 2.- Continuar con la caracterización de la fosfolipasa en relación a su actividad y especificidad.
- 3.- Determinar qué componente de la fracciones II-4 y II-5 presenta una curva de desplazamiento con ( $^3\text{H}$ )-ryanodina.
- 4.- Obtener la secuencia completa, utilizando la secuencia del N-terminal como sonda para rastrear en un banco de cDNA de las glándulas productoras del veneno.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## VII- REFERENCIAS

Albuquerque E.X., Daly J.W., Warnick.J.E. (1988). Macromolecular sites for specific neurotoxins and drugs on chemosensitive synapses and electrical excitation in biological membranes. *Ion-Channels*. 1988; 1: 95-162.

Beaver C. P, Jung R. C. y Cupp E.W. (1990). *Parasitología Clínica*, p.p. 621-624., ed. Salvat.

Cahalan M.D. (1975). Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom. *J. Physiol.*, 244, 511-534.

Carbone E., Wanke E., Prestipino G., Possani L. D., y Maelicke A. (1982). Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 299: 90-91.

Catterall W., Ray R., Morrow C. (1976). Membrane potential Dependent Binding of Scorpion Toxins to Action Potential Na Ionophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.73, 2682-2686.,

Catterall,W. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20:15-43.

Ceccarelli y Clementi, (Eds) (1979). *Advances in Cytopharmacology*, Vol III, Neurotoxins: Tools in Neurobiology, Raven Press, New York.

Cevallos M. A., Navarro Duque C., Varela-Julia M.A. Alagón A. (1992). Molecular Mass determination and assay of venom hialuronidases by sodiumdodecylsulfate-polyacrlamide gel electrophoresis. *Toxicon* 30: 925-930.

Chang J, Musser J.H McGregor H. (1987). Phospholipase A2: Function and pharmacological regulation. *Biochemical pharmacology*. Vol 36, No 15 : 2429-2436.

Chhatwal G.S., Haberman E. (1981) Neurotoxins, protease inhibitors and histamine releasers in the venom of the indian red scorpion (*Buthus tamulus*): Isolation and partial characterization. *Toxicon* 19:807-823.

Corbett A.M., Krueger B.K. (1990) Isolation of two saxitoxin-sensitive sodium channel subtypes from rat brain with distinct biochemical and functional properties. *J-Membr-Biol.* 1990 Aug; 117(2): 163-76

Dent M.A.R., Possani L.D., Ramirez G.A., Fletcher Jr. P.L. (1980). Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 18: 343-350.

Harwood R.F., James M. T (1987) *Entomología médica y veterinaria*. Ed. Limusa. p.p. 523-527, México.

Herrera E. (1986) *Bioquímica* pp 482-485,499,594-597 ed. Interamericana, España.

Ismail M., Osman O.H. and El-Asmar M.F. (1973) Pharmacological studies with scorpion (*Palamneus gravimanus*) venom: Evidence for the presence of histamine. *Toxicon* 13: 49-56.,

Jover E., Couraud F., and Rochat H, (1980). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, No. 4, 1607-1614.

Kar P.K., Sarangi B., Datta A., Gomes A., Lahiri S.C. (1986) Occurrence of phospholipase in the venom of the scorpion (*Heterometrus bengalensis*). *Indian Journal Medical Research.* 83:332-337.

Kini R.M, Evans H.J (1987). Structure-function Relationships of phospholipases. *J Biol. Chem* 262: 14402-14407.

Koppenhöfer, E., y Schmidt, H. (1968) Die Wirkung von Skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierchen Schürrings. Die Permeabilitäten  $P_{Na}$  und  $P_K$ . Pflügers Arch. Gen. Physiol. 303: 133-149.

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

Le-Treut-T, J.L. Boudier, E. Jover., P. Cau. (1990) Localization of voltage-sensitive sodium channels on the extrasynaptic membrane surface of mouse skeletal muscle by autoradiography of scorpion toxin binding sites. J-Neurocytol. 1990 Jun; 19(3): 408-20

Lehninger A.L. (1985) Bioquímica. pp 293-297. Ed. Omega. S.A., Barcelona, España.

Massacrier A., F. Couraud y P. Cau. 1990. Voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channels in mammalian peripheral nerves detected using scorpion toxins. J-Neurocytol. 1990 Dec; 19(6): 850-72

Master R.W.S., Rao S., Somán P.D. (1963) Electrophoretic separation of biologically active constituents of scorpion venom. Biochem. Biophys. Acta 71:422-428

Mazzotti L. y Bravo Becherelle M. A (1961). Escorpionismo en la República Mexicana. Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop, (México), Vol. XXI, Núm 1 y 2 p.p: 3-19.

Mead F.J, Alfin Slater-Roslyn B., Howton R. and Popják (1986). Lipids, Chemistry, Biochemistry and Nutrition. pp 405-410. Plenum press, New York U.S.A.

Possani L. D., Calderón E.S.A., Olamendi T. P. Dávila M. D., Gurrola G. B. (1992). Protección contra el alcranismo. En Vacunas Ciencia y Salud. (Editado por Gutiérrez A. E y Gómez, J. L. V.) p.p. 533-544. Secretaría de Salud.

Ramanaiah M., Parthasarathy P.R., Venkaiah B (1990). Purification and properties of phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of scorpion, (*Heterometrus fulvipes*). *Biochem-Int.* 1990; 20(5): 931-40 .

Radwan S.S. (1987) Glycerophospholipids. In *Handbook of Chromatography, lipids. Volume I* (edited by Mangold H. Zweig G and Sherma J. ) C.R.C. Press Inc. Boca Raton Florida.

Rosenberg P. (1990) Phospholipases. In *Handbook of Toxinology* (Edited by Thomas Shier and Dietrich Mebs) pp 67-277., Marcel Decker, Inc, New York.

Rosentahl F.A., Geyer R.P. (1960). A Synthetic Inhibitor of Venom Lecithinase A. *J. Biol. Chem.* 235 (8): 2202-2206.

P.N. Strong (1990). Potassium Channel Toxins. *Pharmac. Ther.* 46:137-162. 1990.

Valdivia H. et al (1991). Activation of the Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> release channel of Sarcoplasmic reticulum by a Novel Scorpion Venom.. *J. Biol. Chem.* 266, No 29 1935-38.

Vargas-Villareal J., Martín-Polo J.J., Reynaud E., y Alagón A.C. (1991). A new affinity adsorbent for the purification of phospholipases A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> from animal venoms. *Toxicon* 29:119-124, 1991.

Vazquez J., Feigenbaum P.,; F. King V.F., Kacsorowski G.J. (1990). Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membrane from rat brain. Evidence for a direct association with an inactivating voltage-dependent, potassium channel. *J-Biol-Chem.* 1990 Sep 15; 265(26): 15564-71

Zamudio F., Saavedra R., Martin B. M., Gurrola-Briones G., Heri6n P., Possani L. D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Eur. J. Biochem* 204: 281-292.

Zlotkin E, Miranda F. and Rochat H. (1978) Chemistry and pharmacology of *Buthidae* scorpion venoms. In *Handbook of experimental pharmacology*, vol.48, Arthropod Venoms, S. Bettini (Ed.), SpringerVerlag, Berlin, pp 317-369.