



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FOSFOLIPASAS TIPO A DEL VENENO DE ALACRAN MEXICANO Hadrurus aztecus (TRABAJO EXPERIMENTAL DE INVESTIGACION)

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA PRESENTA BLANCA GRACIELA FLORES CASTILLO



MEXICO, D. F.

2001.

29/09/01



FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

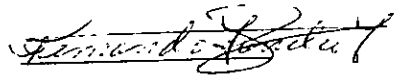
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO

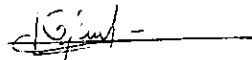
Presidente: Ernestina Cervera Flores.
Vocal: Luz del Carmen Castellanos Román.
Secretario: Fernando Zamudio Zúñiga.
1er suplente: Elpidio García Ramírez.
2do suplente: Fabiola Jaimes Miranda.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México., Campus Cuernavaca. En el laboratorio del Dr. Lourival Possani Postay.

Dr. Fernando Zamudio Zúñiga
Asesor



Blanca Graciela Flores Castillo
Sustentante



Con la asesoría del Dr. Lourival Possani Postay.
Jefe de grupo del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Gracias al Dr. Lourival Possani Postay por el apoyo, enseñanza, simpatía, consejos y confianza brindada para realizar ésta investigación, por compartir sus experiencias en los seminarios.

Deseo Agradecer al Dr. Fernando Zamudio por su invaluable ayuda en la elaboración del presente estudio, ya que con su dirección, orientación y supervisión ha sido posible la presente investigación

**Se agradece el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo, que fue posible gracias a donativos provenientes de las siguientes Instituciones:
Howard Hughes Medical Institute No. 55000574; CONACyT No. Z-005 y
Dirección General de asuntos del personal académico
DGAPA-UNAM No. IN216900.**

**Se agradece a la Universidad del Estado de Oklahoma, en particular al Dr. Steven D. Hartson del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por el análisis de espectrometría de masas.
Gracias al Dr. George Odell, por su apoyo e impulso en la realización del estudio de espectrometría de masas.**

A mis amigos y compañeros del laboratorio Freddy, Zam, Cipriano, Balta, Georgina, Martha, Rive, Liliana, Ricardo, Consuelo, Timo, César, Linda, Joacir, Consuelo, Lidia, Adriana y Blanca Inés. por su compañía, y amistad.
Agradezco a Pedro Saucedo por su ayuda en los dibujos

A la gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A la Escuela Nacional Preparatoria No. 2 Erasmo Castellanos Quinto
Iniciación Universitaria.

A todos mis maestros. que con su paciencia y enseñanzas me moldearon:

Muy en especial a mis maestros de iniciación Universitaria: Daniel Castro de lengua y literatura, Armando Beltrán de historia de México, Ramón Campos Campos de álgebra, Delfino de matemáticas, Dessire Altamirano de Inglés, Kuri de Francés, Alberto Magallón de Biología, Lucio Arreola de temas selectos de Biología, Martha Guzmán de Biología, Piedad Zambrano de química, Rafael Castillo de Dibujo, Etchart de Historia Universal, Lourdes Arroyo de Literatura Univesal, Bello de química por sus clases tan emocionantes, Raymundo López de Derecho.

A mis maestros de la Facultad de Química: Bolivar de matemáticas, Susana Almaraz de fisicoquímica por su concepto de entropía, Mauricio Castro Acuña, Buttenkepler, Silvia Bello, Alfonso Romo, Mendez Stivalet, James por sus clases de química experimental, Eduardo Marambio, Lena Ruiz por sus magníficas clases de inorgánica, Pysanti, Caballero de productos naturales, el colega Oropeza, Alejandro Baeza, Andoni Garritz, Roldán, Miguel Castro Acuña, Miguel Castro, Mercedes Mijueiro, Enriquez, León Cedeño, Amalia, Esquivel, Batres, Martinez de laboratorio de física, Ariel Vega, Danache, Olivia, Velez Pratt y a todos los maestros que estuvieron conmigo, gracias a todos, por compartir su vida.

En especial al profesor Heberto Alcázar Montenegro por haber sido un hombre visionario, por su vida, su legado filosófico y científico, y por haberle conocido.

A todos mis compañeros de generación.

A los compañeros del CGH por la defensa de la Universidad Pública.

A quien más, sino a ustedes,
que les debo y les sigo debiendo todo.
Por supuesto a ustedes mis Padres.
Por su paciencia, su comprensión y
Gracias es poco.

A Mario por que me
enseñó una forma valiosa
y sencilla de ver la vida cuando crecimos
que me marcó
para toda la vida.

A Carlos por que
entre sus travesuras
e investigaciones
crecimos juntos.

A Ray por que contigo hasta
lo imposible es posible.

A Lénika por su
sensibilidad, y análisis

A Diego por su capacidad
de asombro y bondad

Índice

Resumen

I.- Introducción

1.1 Generalidades de alacranes.....	13
1.2 Especies conocidas y toxicidad de los venenos.....	15
1.3 El alacrán <i>Hadrurus aztecus</i> y el veneno de los alacranes.....	23
1.4 Composición química del veneno.....	24
1.5 Distribución en el mundo	24
1.6 Distribución de alacranes en México.....	25
1.7 Fosfolipasas y su clasificación.....	30
1.8 Fosfolipasas tipo A2, distribución y abundancia.....	32

II.-Antecedentes

2.1 Fosfolipasas y el veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	39
--	----

III.-Objetivos.....	40
---------------------	----

IV.-Metodología.

4.1 Recolección.....	41
4.2 Extracción del veneno y su liofilización.....	41
4.3 Determinación de la actividad fosfolipasa.....	41
4.4 Procedimiento de purificación. : Separaciones cromatográficas	
4.4.1 Exclusión molecular.....	42
4.4.2 Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RV-HPLC) con columna C ₁₈ semipreparativa	42
4.5 Determinación de estructura primaria de la proteína.....	43
4.5.1 Reducción y alquilación.....	43
4.5.2 Digestiones enzimáticas con diferentes enzimas proteolíticas, con endopeptidasa Lys-C y proteasa V ₈	43
4.6 Bromuro de cianógeno.....	44
4.7 Determinación del peso molecular por espectrometría de masas.....	44
4.8 Búsqueda de Homología con otras secuencias de proteínas, especialmente fosfolipasas reportadas en la literatura.....	44

V.-Resultados y Discusión.

5.1	Extracción del veneno.....	44
5.2	Ensayo de actividad fosfolipasa del veneno total.....	44
5.3	Cromatografía por exclusión molecular.....	45
5.4	Pruebas de actividad fosfolipasa de las seis fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.....	46
5.5	Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa en una columna C ₁₈ semipreparativa.....	47
5.6	Ensayo de actividad fosfolipasa de las subfracciones de la fracción Haz II del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	50
5.7	Purificación del componente 9 por cromatografía líquida de alta presión en una columna analítica C ₁₈ en fase reversa.....	51
5.7.1	Secuencia directa del componente 9.....	52
5.8	Purificación del componente 12 por cromatografía líquida de alta presión en una columna C ₁₈ analítica en fase reversa.....	53
5.8.1	Secuencia directa del componente 12.....	54
5.9	Secuencias obtenidas en la búsqueda de actividad fosfolipasa.....	55
5.10	Digestiones enzimáticas:	
	a) Componente 9.....	56
	b) Componente 12.....	58
5.11	Superposición de péptidos obtenidos por secuencia directa y por rupturas proteolíticas:	
	1) Componente 9.....	62
	2) Componente 12.....	63
5.12	Determinación del peso molecular por espectrometría de masas.....	64
5.12.1	Conclusión del análisis de espectrometría de masas.....	68
5.12.2	Espectros de masas.....	69
5.13	Alineación con fosfolipasas tipo A ₂ de secuencias reportadas en la literatura con las encontradas en la presente tesis, mediante el programa FASTA (Wisconsin package versión 10.1 Genetics computer group); (GCG) Madison; Wisconsin.....	74
5.14	Comparación y homología de secuencia con las fosfolipasas reportadas como del grupo III.....	80

5.15 Alineación con fosfolipasas de veneno de serpientes, sólo del fragmento del sitio de catálisis.....	81
5.16 Alineamiento con la Rhono toxina aislada de <i>Rhopilema nomadica</i> (nemátodo).....	81
5.17 Subunidad pequeña o cadena pequeña.....	82
VI.- Conclusiones y Perspectivas	84
VII.-Bibliografía.....	87

Lista de figuras.

Figura 1 Diagrama de flujo que resume la metodología.....	11
Figura 2 Apariencia de un alacrán antiguo y uno moderno.....	13
Figura 3 Regiones del mundo donde no habitan alacranes.....	24
Figura 4 Mapa de la República Mexicana, con la distribución de alacranes más peligrosos del género <i>Centruroides</i>	25
Figura 5 Lista de las especies más venenosas del género <i>Centruroides</i>	26
Figura 6 Estructura química del fosfolípido y clasificación de las diferentes fosfolipasas de acuerdo al éster que hidrolizan.....	30
Figura 7 Cromatograma de las fracciones obtenidas de la separación del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i> , por cromatografía de exclusión molecular.....	46
Figura 8 Patrón cromatográfico de la recromatografía líquida de alta presión en fase reversa, de la separación de la fracción Haz II del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	49
Figura 9 Esquema del ensayo de actividad fosfolipasa del gel-agarosa-yema de huevo, de las subfracciones obtenidas en la purificación de la fracción Haz II del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	50
Figura 10 Gráficos de las cromatografías de la separación y purificación del componente 9 aislado del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	51
Figura 11 Componente 9, del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i> , determinación de la estructura primaria de la proteína	52
Figura 12 Cromatogramas de las purificaciones sucesivas del componente 12 del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	53

Figura 13 Secuencia directa del componente 12, del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	54
Figura 14 Cromatograma de la digestión enzimática con Lys-C del componente 9, tras digestión y reducción con ditioneitol (DTT) por RV-HPLC.....	56
Figura 15 Cromatograma de la digestión enzimática con V_8 y reducción con ditioneitol (DTT) del componente 12, por cromatografía líquida de alta presión en una columna C_{18} en fase reversa.....	58
Figura 16 Cromatograma de la purificación del componente 12 tras digestión enzimática con Lys-C y reducción ditioneitol (DTT) por cromatografía líquida de alta presión en una columna C_{18} en fase reversa.....	60
Figura 17 Comparación de las digestiones hechas con Lys-C en ambas fosfolipasas encontradas en este trabajo.....	61
Figura 18 Superposición de péptidos de fosfolipasa azteca.....	62
Figura 19 Superposición de péptidos de fosfolipasa hadrura.....	63

Lista de tablas.

Tabla 1 Datos de alacranes peligrosos con importancia médica.....	18
Tabla 2 Datos de alacranes no peligrosos, sin importancia médica.....	21
Tabla 3 Resumen de los principales péptidos de alacranes estudiados.....	28
Tabla 4 Fosfolipasas Tipo A ₂ , (clasificación) fosfolipasas que utilizan una histidina catalítica.....	36
Tabla 5 Fosfolipasas que utilizan una serina catalítica.....	37
Tabla 6 Resumen del ensayo de actividad fosfolipasa, previo al fraccionamiento del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	45
Tabla 7 Patrón de fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	45
Tabla 8 Ensayo de actividad fosfolipasa de las fracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	48
Tabla 9 Fracciones obtenidas en la recromatografía líquida de alta presión en fase reversa o RV-HPLC, de la fracción Haz II, del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	48
Tabla 10 Resultados del ensayo de actividad fosfolipasa de las subfracciones de la fracción Haz II del veneno del alacrán <i>Hadrurus aztecus</i>	50
Tabla 11 Tiempo de retención y cantidad obtenida en Haz II del componente 9	52
Tabla 12 Repurificación del componente 9, tiempo y cantidad obtenida.....	54
Tabla 13 Repurificación sucesiva del componente 9.....	54
Tabla 14 Resumen de secuencias obtenidas en la búsqueda de péptidos con actividad fosfolipasa.....	55

Abreviaturas usadas en el texto.

RV-HPLC –Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa.

DTT.- Ditiotreitól ó 1,4 DIMERCAPTO-2,3-BUTANODIOL

RESUMEN

Aislamiento, purificación y caracterización de péptidos con actividad fosfolipasa del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*

METODOLOGÍA

Obtener veneno y comprobar actividad fosfolipasa en él.

En tres pasos cromatográficos obtener fracciones homogéneas de los péptidos, y verificar actividad fosfolipasa en cada fracción obtenida.

Secuenciar componentes purificados con secuenciador automático de acuerdo al método de degradación de Edman (Edman 1960)

Determinación del peso molecular, por espectrometría de masas

Mediante el programa FASTA generar una alineación de secuencias peptídicas de fosfolipasas tipo dos (PLA₂), del grupo III reportadas en la literatura, con lo encontrado.

Figura 1. Diagrama de flujo que resume la metodología.

Resumen.

En esta tesis se reporta el aislamiento, la purificación y caracterización de los componentes con actividad fosfolipasa del alacrán *Hadrurus aztecus*. Nos referiremos con este nombre a pesar de que cambió cuando se realizaba la escritura de la presente tesis a *Hadrurus gertschi*.

El trabajo se realizó con la siguiente metodología:

- 1.-Se comprobó la actividad fosfolipasa en el veneno.
- 2.-Se realizaron tres pasos cromatográficos para la obtención de fracciones homogéneas, probando en cada paso, la existencia o no de actividad fosfolipasa.
- 3.-Se secuenciaron las fracciones purificadas y su estructura aminoacídica primaria fue determinada al utilizar un secuenciador automatizado LF 3000 de acuerdo al método de Edman.

De esta forma se encontró con al menos seis componentes, con actividad fosfolipasa, entre ellos, dos fosfolipasas heterodiméricas cuyas cadenas largas son de 105 y 104 aminoácidos cada una, y las cadenas pequeñas de 21 aminoácidos cada una con peso molecular promedio aproximado de 15 000 Daltones.

El peso molecular fue determinado mediante equipo MALDI-TOF Voyager en la Universidad del Estado de Oklahoma, en los Estados Unidos de América.

Mediante el uso del programa FASTA; se generó un alineamiento de secuencias peptídicas de fosfolipasas tipo dos (PLA₂) reportadas en la literatura; que pertenecen a venenos de serpientes, monstruo de Cuentas (*Heloderma horridum horridum*), de abeja (*Apis mellifera*), abejorro, alacranes, y de mamíferos; con las fosfolipasas obtenidas en este trabajo. Al observar el alineamiento generado, se encontró, que los sitios catalíticos señalados para las fosfolipasas se encuentran conservados.

La homología de secuencias se hizo entonces, exclusivamente con las fosfolipasas del grupo III, entre ellas la Iptxi una fosfolipasa del veneno del alacrán *Pandinus imperator* con la que se encontró una alta homología en relación, a las fosfolipasas estudiadas en este trabajo.

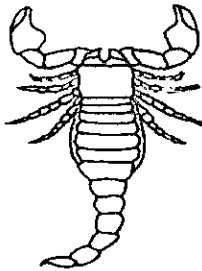
También se generó un alineamiento de la cadena pequeña de las fosfolipasas obtenidas con cadenas pequeñas de fosfolipasas heterodiméricas provenientes de la serpiente India naja naja que presenta múltiples isoformas y se encontró una alta homología en las secuencias.

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades.

Restos fósiles de alacranes, son fuerte evidencia que demuestra existieron en periodos tan antiguos que datan desde hace 400 a 425 millones de años (Smith, R.L., 1992), en el periodo Silúrico. Se tiene conocimiento de tres alacranes fósiles, el *Brontoscorpio anglicus*, *Gigantoscordio willsi*, y el *Praercturus gigas*, cuyo tamaño oscilaba entre 35 cm hasta un metro o más de longitud, en éste último. Fueron acuáticos muy parecidos a los de ahora y los primeros terrestres eran muy pequeños.

Alacrán del periodo Silúrico



Alacrán contemporáneo

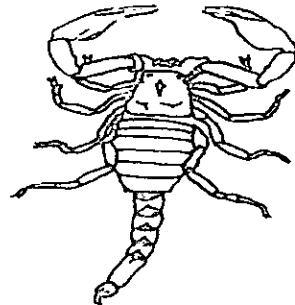


Figura 2. Muestra la apariencia de un alacrán antiguo y uno moderno.

En el dibujo se esquematiza la reconstrucción de un alacrán del periodo Silúrico y a la derecha un alacrán actual, pocos cambios anatómicos han sufrido por lo que se les considera como fósiles vivientes

El hombre inició el estudio de los alacranes, en fechas muy antiguas, al investigar como protegerse contra la picadura, como lo demuestran los papiros hallados del viejo Egipto (1600 años A.C.), en donde se habla del tratamiento para el piquete de alacrán y de serpiente, (Balozet, L., 1971) y el estudio sobre ellos no ha cesado, como lo prueba una recopilación interesante de tratamientos contra venenos de alacrán a partir de plantas, usadas en diversas partes del mundo y que perduran hasta nuestros días. Son conocimientos transmitidos por generaciones, que coinciden en el uso de las mismas especies de plantas, por etnias de diferentes puntos geográficos alrededor de toda la tierra. Se sabe que algunas contienen alcaloides pero muchas de ellas no han sido estudiadas (Hutt, M. J., and Houghton, 1998).

En la actualidad el estudio está enfocado a la caracterización bioquímica de cada componente del veneno y su actividad biológica.

Los alacranes son artrópodos que han sobrevivido millones de años, debido a su gran poder de adaptación, que les ha permitido tener una supervivencia asombrosa.

Especímenes de alacranes han sido encontrados a 5 000 metros de altura en la región de los Andes, y una especie el Alacrán *tartarus*, fue encontrado a profundidades mayores de 800 metros debajo de la superficie (Polis G.A., 1994).

Las especies más pequeñas viven por lo general de 3 a 4 años, mientras que las más grandes reportan datos de supervivencia de 20 años, con un promedio de ocho años. El hecho de que aparentemente vivan menos tiempo en cautiverio está relacionado con la edad en que son capturados, y con el drástico cambio en las condiciones de vida al estar cautivos.

Varían en tamaño, el representante más pequeño probablemente es el alacrán, *Microtityus waeringi* con 1.2 cm de largo cuando es adulto (Stockwell, S.A., 1989).

Las tres especies consideradas como las más grandes del mundo son: *Hadogenes troglodytes* de Sudáfrica por su longitud, ya que los machos alcanzan 21 cm de longitud, aunque son muy planos y de menor peso comparados con las especies, *Pandinus imperator* del oeste y centro de África y *Heterometrus* de Vietnam y Tailandia, que son gruesos y llegan a alcanzar entre 17 y 18 cm de longitud y hasta 60 gramos de peso, aproximadamente (Enciclopedia Británica, 1994).

Es tal su capacidad de supervivencia que se desarrollan en condiciones ambientales extremas. Algunas especies pueden ser enfriadas abajo del punto de congelación del agua por semanas, y aún así, regresan a su actividad normal con el paso de las horas. Otros llegan a sobrevivir a una inmersión total en agua, tanto como uno o dos días. Los alacranes del desierto pueden tolerar temperaturas extremas, desde 45°C hasta - 47°C, arriba de temperaturas letales, para otros artrópodos del desierto.

Los alacranes mudan su exoesqueleto o piel constituida de quitina un promedio de 5 veces a lo largo de su vida, con un rango de cuatro veces mínimo y máximo 9, antes de alcanzar la madurez. No existen reportes de mudas que ocurran después de alcanzada la edad reproductiva (Goodnight, M., 1994).

Dentro del reino animal, el alacrán presenta uno de los más bajos niveles metabólicos, puede permanecer prácticamente inmóvil. En una sola comida llega a incrementar el peso de su cuerpo en un tercio. Es posible que sólo se alimente de 5 a 50 veces al año. Resiste largos periodos sin comer y conserva muy bien el agua de las presas que ingiere. El sistema excretor del alacrán es muy eficiente en la conservación del agua. Sus excreciones fecales contienen alto contenido en nitrógeno, (xantina, guanina y ácido úrico), prácticamente insolubles en agua, por ello son secas.

Presentan actividad nocturna y, poca actividad en la superficies, es decir al descubierto, debido a sus depredadores. La mayoría de los alacranes son activos sólo unas horas, del 20% al 50% de todas las noches del año.

1.2 Especies conocidas y toxicidad de su veneno

Actualmente se conocen aproximadamente 1500 especies de alacranes en todo el mundo, de las cuales sólo alrededor de 24 son letales al hombre (Rubio M., 2000).

Las 1500 especies han sido divididas en 18 familias (Fet *et al.*, 2000):

- ✓ Pseudochactidae
- ✓ Scorpionidae
- ✓ Scorpiopidae
- ✓ Superstitionidae
- ✓ Troglotayosicidae
- ✓ Vaejovidae
- ✓ Iuridae
- ✓ Microcharmidae
- ✓ Bothriuridae
- ✓ **Buthidae * (peligrosa)**
- ✓ Chactidae
- ✓ Chareilidae
- ✓ Diplocentridae
- ✓ Euscorpiidae
- ✓ Heteroscorpionidae
- ✓ **Ischnuridae *(peligrosa)**
- ✓ Hemiscorpiidae
- ✓ Urodacidae

Buthidae y Ischnuridae son las dos especies que se consideran de riesgo para el hombre, sin embargo la familia Buthidae es la que cuenta con mayor distribución en todo el mundo y la más importante, comprende 48 géneros, con varias especies de importancia médica a saber: *Androctonus* y *Buthus* del continente Africano, *Leiurus* del norte de África y Asia, *Centruroides* en E.E.U.U. desde su parte central, hasta México, Chile, Argentina e Islas del Caribe, *Tityus* con presencia en Brasil y Trinidad Tobago, *Parabuthus* de Sudáfrica, *Mesobuthus* de Turquía, *Buthus* de

China y *Heterometrus* de la India, *Hottentotta* y *Odontobuthus* de Irán. De la familia Ischuridae, el alacrán *Hemiscorpius lepturus*, es considerado altamente peligroso en Khuzestan, Irán, ya que existen algunos decesos reportados (Radmanesh, M., 1990).

La gran mayoría de los estudios reportados son de venenos de alacranes de la familia Buthidae, que son todos tóxicos para humanos. Muy poco o nada es lo que se conoce de otras familias como Vejovidae, Chactidae, Scorpionidae, Diplocentridae y Bothriuridae (Possani, L.D., 1984)

La mayoría de los estudios científicos con alacranes, han sido con especies, que amenazan la vida del hombre y a partir del concepto de dosis letal media (LD_{50}), que se define como la cantidad de toxina requerida para matar el 50% de los animales de experimentación del ensayo de toxicidad, y que se expresa en miligramos de toxina por kilogramo de peso de animal, ésto es mg/kg es posible considerar de manera general, lo siguiente:

Si la $LD_{50} \leq 1.5\text{mg/Kg}$, es decir, si la dosis letal media es menor o igual a 1.5 miligramos por kilogramo, son considerados alacranes peligrosos, de importancia médica. Si la $LD_{50} > 1.5\text{mg/Kg}$, es decir, si la dosis letal media es mayor de 1.5 miligramos por kilogramo, se consideran alacranes que no ponen en peligro la vida del hombre. Mientras más baja sea la LD_{50} , más potente será el veneno. (Zlotkin, E., F. Miranda, y H. Rochat. 1976).

Con el fin de evaluar el efecto que puede tener la picadura en un individuo, se deben considerar ciertos factores, tanto del alacrán como de la víctima esto es:

Del alacrán 1) especie o toxicidad del veneno del alacrán involucrado, 2) condición del telson al momento del accidente, 3) número de picaduras al momento del ataque para evaluar cantidad del veneno inyectado en el accidente.

De la víctima 1) peso corporal del individuo afectado, y estado fisiológico y nutricional, 2) enfermedades asociadas, 3) efectividad del tratamiento. (Dehesa-Dávila, M. and Possani, L.D. (1994)

Particularmente los niños, por su menor peso, están en mayor riesgo que los adultos, de sufrir un envenenamiento severo, otro factor que debe ser tomado en consideración para la pronta atención médica, es la rápida distribución del veneno en la víctima, y el tiempo de eliminación en el organismo (Ismail, M., and ABD-Elsalam, A., 1988).

La ruta de diseminación intravenosa de los componentes tóxicos del veneno es rápidamente distribuida y eliminada con un tiempo de eliminación total de 1.9 horas (Calderón-Aranda *et. al.*, 1999).

Es importante mencionar que han sido reportados casos de picaduras de alacrán de especies no tóxicas, que sin embargo, han llegado a causar la muerte debido a que la víctima desarrolla una severa reacción alérgica al veneno (Simard y Watt, 1990).

En la siguiente tabla número 1 están recopilados datos interesantes de las especies de alacranes consideradas peligrosas y de impacto en el área médica.

Se enlistan las especies de alacranes más peligrosas distribuidas en todo el mundo, y que mejor han sido estudiadas. También se muestra la familia del alacrán, la especie, el reporte de la dosis letal media LD₅₀ de veneno total, calculada con ratones de 20g de peso promedio, si existe el estudio o el ensayo hecho con la fracción tóxica solo si se menciona y la ubicación geográfica del alacrán, es decir la región de donde es endémico.

En gris, se resalta las especies que han sido estudiadas por el grupo del Dr. Possani desde hace casi 30 años, en la Universidad Nacional Autónoma de México

Como se puede observar en la tabla 1, todas las especies pertenecen a la familia Buthidae con excepción del alacrán *Hemiscorpius lepturus* de la familia Ischnuridae. La razón de incluirle aquí se debe a su importancia desde el punto de vista médico, no obstante que la LD₅₀ reportada excede los valores promedio reportados para los alacranes de importancia médica, es decir la LD₅₀ es mucho mayor de 1.5 mg/Kg, sin embargo el veneno de éste alacrán, es citotóxico (Radmanesh M., 1998), su piquete produce necrosis y ampúlas en el sitio de la picadura, y su veneno actúa de manera similar al piquete producido por la araña *Loxocoles reclusa*, mejor conocida como araña violín o araña de jardín (Stockwell, 1984).

TABLE 1
 Algunos datos de alacranes peligrosos, de importancia médica.

Especies	Familia	LD ₅₀ mg/Kg	Vía	Región
<i>Androctonus amoreuxi</i> ^[2]	Buthidae	0.75	sc	Africa del norte
<i>Androctonus bicolor</i> ^[2,6,7]	Buthidae	1.21	iv	Africa del norte
* <i>Androctonus mauretanicus</i> ^[19]	Buthidae	0.16-0.50	ip	Africa del norte
* <i>Androctonus australis hector</i>	Buthidae	-	-	Africa del Norte.
* <i>Androctonus australis garzoni</i> ^[19]	Buthidae	-	-	Africa del Norte
* <i>Androctonus australis</i> ^[2,10]	Buthidae	0.32-5.69	sc/iv	Africa del norte
<i>Androctonus crassicauda</i> ^[2,10]	Buthidae	0.08-0.50	sc/iv	Sudoeste de Asia
<i>Leiurus morio</i> ^[2,10]	Buthidae	0.16-0.50	sc/iv	Africa del norte, Sudoeste de
* <i>Tityus serrulatus</i> ^[11,12] Fracciones: III-8, IV-5, y II-XI	Buthidae	0.21	ip	Brasil
* <i>Tityus bahiensis</i> ^[2,13,15,20]	Buthidae	1.38	ip	Brasil
<i>Tityus trinitates</i>	Buthidae	-	-	Trinidad y Tobago
* <i>Tityus stigmurus</i> ^[20]	Buthidae	0.21	ip	Brasil, Venezuela
* <i>Tityus discrepans</i> ^[18]	Buthidae	-	-	Venezuela
* <i>Tityus costatus</i>	Buthidae	0.21	ip	Brasil
<i>Compsobuthus acuticarinatus</i> ^[2]	Buthidae	0.75	iv	Egipto
<i>Mesobuthus tamulus</i>	Buthidae	-	-	India
<i>Odontobuthus doriae</i> ^[2]	Buthidae	0.19	iv	Irán
<i>Hottentotta saulcyi</i> ^[2]	Buthidae	1.01	iv	Irán

<i>Hemiscorpius lepturus</i> ^[2]	Ischnuridae	5.81	iv	Irán
<i>Buthus occitanus</i> ^[2,10]	Buthidae	0.90- 1.44	sc/iv	Mediterráneo
* <i>Centruroides elegans</i>	Buthidae	.10	ip	Jalisco, México
* <i>Centruroides limpidus</i> L. ^[11,8,4]	Buthidae	0.65- 1.56	ip	Morelos y Guerrero, México
* <i>Centruroides noxius</i> ^[1,3] ☼	Buthidae	0.26	ip	Nayarit, México
* <i>Centruroides sculpuratus</i> ^[14,16]	Buthidae	1.12 0.80	ip	Norte de México
* <i>Centruroides santa María</i> ^[11]	Buthidae	.39	ip	Norte de México
* <i>Centruroides infamatus</i> ^[11]	Buthidae	1.27	ip	Guanajuato, México.
* <i>Centruroides exilicauda</i> ^[14,8,2]	Buthidae	1.10- 1.90 1.12- 1.46	ip	Arizona, USA; Península de Baja California y Sonora.

Vía: intravenosa (in); intraperitoneal (ip); subcutánea (sc). ☼Debido a que no cohabita con humanos, no constituye un gran peligro. En gris y con asterisco "*" todos los estudios realizados de las distintas especies en nuestro laboratorio, encabezado por el Dr. Lourival Possani. En oscuro las especies más venenosas. ¹Dehesa, M., Ramírez A.N., *et al.* (1996); ²Hassan, F.(1984); ³Dent, M.A. y Possani, L.D., (1980); ⁴Alagón, A.C., *et al.* (1988); ⁵Possani, L.D. y Fletcher, P.L.Jr. (1980); ⁶Johnson, B. D. *et al.* , (1966); ⁷Stahnke, H. L. (1963).; ⁸Watt, D. D. (1964) ; ⁹Whittemore, F. W. and Keegan H.L., (1963); ¹⁰Zlotkin, E., F. Miranda, and Rochat H. (1976); ¹¹Possani, L.D. y *col.*, (1992); ¹²Possani L.D. and Martín, B.M., (1981); ¹³Becerril, B., (1996); ¹⁴Ismail, M., *et al.* (1974). ¹⁵ Possani, L.D., Coronas F.I.V., *et al.*, (1993); ¹⁶Pete, J.M. y *cols.* . (1992); ¹⁷ Possani, L.D., Ramírez, A.G., *et al.*, (1978); ¹⁸ Suze, D. G., Coronas, F.I., *et al.* (1996), ¹⁹ Pisciotta, M., Coronas FI, Possani LD, Prestipino G. *et al.*, (1998); ²⁰ Becerril, B., *et al.*, (1996).

Las especies en tono más oscuro *Androctonus australis*, y *Leiurus quinquestriatus*, son consideradas de las más venenosas, incluso *C. exilicauda* presenta baja toxicidad en comparación a ellos (Bush, S.P. *et al.*, 2001). *Leiurus quinquestriatus* es considerado el

alacrán más venenoso en Israel, su veneno causa complicaciones cardíacas (Kristal, C. *et al.* 1998).

En la especie *Tityus* de la familia Buthidae, específicamente *Tityus silvestris*, en la Guyana se reportó complicación neurológica al parecer irreversible, después de la picadura, lo cual nunca había sido reportado antes en venenos de alacranes (Fuchs, S., *et al.*,1998).

Las especies de alacranes que no constituyen una amenaza para la vida del hombre, pero que tampoco es despreciable su picadura en cuanto a incidencia de piquetes y desencadenamiento de alergias son enlistadas en la siguiente tabla 2.

En gris las especies cuyo veneno presenta actividad fosfolipasa, señaladas con asterisco " * " las estudiadas en nuestro laboratorio.

TABLA 2
Algunos datos de alacranes no peligrosos, sin importancia médica.

Especies	Familia	LD ₅₀ mg/kg	Método	Región
<i>Centruroides margaritatus</i> ^[5]	Buthidae	59.9	sc	América Central
<i>Hottentotta judaicus</i> ^[2]	Buthidae	7.94	iv	Egipto; Israel
<i>Pandinus exitialis</i> ^[3]	Scorpionidae	40	sc	Este de Africa
* <i>Pandinus imperator</i>	Scorpionidae			Oeste de África
<i>Compsobuthus</i> ^[2] <i>matheisseni</i>	Buthidae	4.94	iv	Irán
<i>Buthacus arenicola</i> ^[2]	Buthidae	3.25	iv	Norte de África
<i>Buthacus leptochelys</i> ^[2]	Buthidae	5.62	iv	Norte de Africa; Sudoeste de Asia
<i>Scorpio maurus</i>	Scorpionidae	9.37	iv	Norte de África; Sudoeste de Asia
<i>Parabuthus</i> ^[6] <i>transvaalensis</i>	Buthidae	4.25	sc	Sudáfrica
<i>Opisthophthalmus</i> <i>sp.</i> ^[2]	Scorpionidae	625	iv	Sudáfrica
<i>Hadogenes</i> <i>sp.</i> ^[1]	Ischnuridae	2000-2667	sc	Sudáfrica

	<i>Hadrurus arizonensis</i> ^[4]	Iuridae	168	ip	Sudoeste de USA; Noroeste de México
*	<i>Hadrurus concolourus</i>	Iuridae			Baja California, México
*	<i>Hadrurus aztecus</i> ahora <i>Hadrurus gertschi</i>	Iuridae			Guerrero, México
	<i>Heterometrus bangalensis</i>				India
	<i>Heterometrus fulvipes</i>				

¹Bücherl, W. (1971). ²Hassan, F. (1984). ³Ismail, M., *et al.* (1974) ⁴Johnson, B. D., J. C. Tullar, and H. L. Stahnke. (1966). ⁵Marinkelle, C. J. and Stahnke, H.L (1965). ⁶Zlotkin, E., F. Miranda, and Rochat, H. (1976). Según Stockwell, S. A., (1989).

A la fecha, los alacranes sin importancia médica es decir, los que no constituyen una amenaza para la vida del hombre, no son objeto de cálculo de dosis letal media, esto debido a que el monto de toxina que es necesaria para matar un mamífero, no se encuentra en el veneno de un sólo alacrán, y para calcularla se requiere la ordeña de varios alacranes.

Difícilmente ocurrirá un accidente en donde la persona sea masivamente picada, por tanto no tiene una aplicación práctica desde el punto de vista médico, el determinar la dosis letal media en alacranes no peligrosos al hombre.

Una de las razones importantes para estudiar el veneno de especies no peligrosas se debe a que su veneno no ha sido estudiado, no se han aislado los péptidos que causan toxicidad específica a crustáceos e insectos, pero existe el antecedente de haber sido aislado un péptido con actividad antimicrobiana específicamente en el alacrán *Hadrurus aztecus*, lo cual podría utilizarse para el desarrollo de nuevos antibióticos.

1.3 El alacrán *Hadrurus aztecus* y el veneno de los alacranes.

La familia Iuridae comprende seis géneros y 21 especies, (Tallarovic, S.K. *et al.*, 2000). En el género *Hadrurus* (Thorell, 1876), se encuentran ocho especies y ellas son las siguientes: *H. arizonensis* (Ewing, 1928), *H. Aztecus*, (Pocock, 1902), *H. concolor* (Stahnke, 1969), *H. Gertschi*, (Soleglad, 1976), *H. Hirsutus* (Wood, 1863), *H. Obscurus*, (Williams, 1970), *H. Pinteri*, (Stahnke, 1969), *H. Spadix*, (Stahnke, 1940). (Fet et al., 2000). La palabra *Hadrurus* viene del griego "Hadr" que significa grueso y "ur" cola " de cola gruesa "(Ewing, H.E., 1928). El género *Hadrurus* comprende los alacranes más grandes de América, con 7g peso y vida promedio de 25 años (Stanke, 1966). El alacrán *Hadrurus aztecus*, de la familia Iuridae, objeto de estudio de ésta tesis, es un alacrán que vive en zonas áridas, en tierra arenosa compacta, que excava para enterrarse y se esconde debajo de piedras, no tiene hábitos de trepar, no hace vida común con otros alacranes, es agresivo, rápido en velocidad, vive aproximadamente a 29°C, con una humedad baja (Rubio, M., 2000). Es endémico del estado de Guerrero. su tamaño oscila entre 7 y 14 cm. Su veneno tiene actividad fosfolipasa y es tóxico para crustáceos. En un estudio previo, se aisló del veneno *Hadrurus aztecus* un péptido antimicrobiano, con actividad hemolítica, que demostró capacidad de inhibir a bajas concentraciones, del orden micromolar, crecimiento bacteriano de *Salmonella thyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus cloacae*, *Pseudomonas auroginosa*, *Escherichia coli*, y *Serratia marscences*. Estudio generado a partir de la observación que periódicamente los alacranes se rocían un líquido en su cuerpo, que aparentemente les sirve como protector, ya que están sometidos al contacto con la humedad y la tierra, (Torres-Larios, A., Gurrola, G.B. *et al.*, 2000).

1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL VENENO

La composición química del veneno de los alacranes está diseñado para ser mortalmente efectiva en sus presas, esto se sabe debido a los ensayos de toxicidad efectuados en diferentes especies como insectos, crustáceos y mamíferos con las diferentes fracciones de veneno de alacrán y con veneno total (Balderas, A.C., Tesis 1988), lo cual concuerda con su forma de alimentarse que es principalmente de insectos y otros artrópodos de talla pequeña como cucarachas, grillos, larvas de ciertos escarabajos, moscas, arañas, etc, aunque se han encontrado especies que se alimentan de pequeños vertebrados como lagartijas y víboras, crías de ratón, etc.

Cuando se estudia el veneno del alacrán, éste se separa en varias fracciones que son ensayadas independientemente con el fin de encontrar toxicidad específica contra insectos, crustáceos o mamíferos, (Possani, L.D., *et al.*, 1992)

De acuerdo a nuestra experiencia en el laboratorio podría decirse que, generalmente si su veneno es ligeramente tóxico a mamíferos, es más activo contra insectos y/o crustáceos.

1.5 Distribución en el mundo

Son prácticamente habitantes de toda la masa terrestre, a excepción de la región Antártica: Escandinava (Noruega, Suecia, Dinamarca, Finlandia e Islandia) y Groenlandia.



○ Figura 3. Muestra las regiones del mundo en donde No habitan alacranes. (Enciclopedia Encarta, 2000)

1.6 Distribución de alacranes en México. En México han sido registradas 221 especies de alacranes pertenecientes a varios géneros, de las cuales sólo 7 poseen veneno de importancia médica. Las cifras señalan una incidencia de hasta 200 mil picaduras y 310 muertes anuales (Dehesa-Dávila M., Possani, L.D., 1994).

De acuerdo con el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Institución de Asistencia Médica Pública de México, de 1990-1995, se registraron 327,000 casos de picadura de alacrán, y de esos casos 7,799 ocurrieron en el Estado de Jalisco, por ello ocupa el segundo lugar de alacranismo en toda la República Mexicana, tan sólo superado por Morelos con un valor promedio reportado de 117, 820 casos al año. (Universidad Autónoma de Guadalajara, 2001).

En el estado de Jalisco habitan las siguientes cuatro especies: *Centruroides noxius* en los límites con Nayarit, *Centruroides elegans* en la vertiente del Pacífico, *Centruroides limpidus tecomanus* en la costa sur limitrofe con Colima y *Centruroides infamatus* en toda la zona centro del estado.

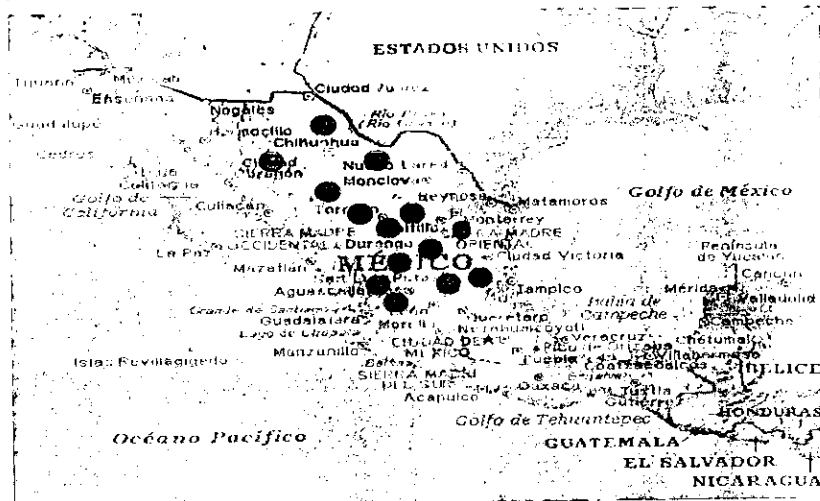


Figura 4 Mapa de la República Mexicana que muestra en círculos, la distribución de alacranes más peligrosos del género *Centruroides*, en México. (Enciclopedia Británica, 1994).

En lo que va del presente año 2001, hasta septiembre, Jalisco ha reportado 22, 424 accidentes por picadura de alacrán, seguido de Morelos con 17,785 casos, Guanajuato con 13, 599 casos, Guerrero con 11,696 casos, Puebla con 8,320 casos y Nayarit con

8,246 casos entre ellos seis decesos (Dr. Andrés Romero Pérez , Jefe del Departamento de Vectores de la Secretaría de Salud de Nayarit (SSN), 2001)

- | | |
|-------|---|
| I. | <i>C. elegans</i> –Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Guerrero y Centro |
| II. | <i>C. elegans elegans</i> - Guerrero, Sinaloa, Islas Marias |
| III. | <i>C. elegans insularis</i> -Guerrero, Sinaloa, Islas Marias |
| IV. | <i>C. infamatus</i> -- zona centro |
| V. | <i>C. infamatus ornatus</i> - zona centro |
| VI. | <i>C. limpidus</i> ---zona centro |
| VII. | <i>C. limpidus limpidus</i> –Guerrero, Puebla, Morelos, Edo. Méx. |
| VIII. | <i>C. limpidus tecomanus</i> —Colima- México. |
| IX. | <i>C. noxius</i> —Nayarit y Sinaloa |
| X. | <i>C. sculpuratus</i> – alacrán letal- N. Sinaloa-Arizona |
| XI. | <i>C. santa maria</i> -zona norte |
| XII. | <i>C. suffusus</i> ---Durango |
| XIII. | <i>C. suffusus suffusus</i> - Durango, Zacatecas y Sinaloa |
| XIV. | <i>C. suffusus chiaravigli</i> |

Figura 5. El cuadro enlista las especies más venenosas del género *Centruroides* con presencia en México de todas ellas (Enciclopedia Encarta, 2000)

La alta peligrosidad del veneno del alacrán radica en la presencia de neurotoxinas específicas que actúan sobre los canales iónicos de sodio, potasio, calcio y cloro dependientes de voltaje de las membranas excitables. (Possani, L.D., Becerril, B., *et al.*, 1999). Saber ésto, nos lleva a considerar la importancia de conocer más a fondo el mecanismo y funcionamiento biológico de las toxinas, ya que sabemos que los canales iónicos gobiernan el potencial eléctrico de las membranas celulares que se encuentran en todos los seres vivos.

El veneno del alacrán, es resultado de un complejo mecanismo evolutivo empleado por esta especie para su supervivencia, estudiarlo ha permitido conocer su composición química y se han elaborado sueros eficaces, como el polivalente, que contrarresta la toxicidad del veneno de especies tan peligrosas como las que habitan en México (Dehesa-Dávila y Possani, 1994)

En México se utiliza el suero polivalente antialacrán de *Centruroides*, producido en caballos tras la inyección de un macerado de glándulas venenosas, que funciona como antígeno, preparado de las cuatro (4) especies de mayor importancia médica a saber (*C. noxius*, *C. l. limpidus*, *C. l. tecomanus* y *C. suffusus suffusus*). El suero obtenido es digerido y liofilizado. Este antiveneno reacciona cruzadamente y protege contra todas las especies venenosas del país. Existen dos productores de suero que protege contra las especies de *Centruroides*: Laboratorios Bioclón y Gerencia general de Biológicos y Reactivos, Health Ministry,. (Dehesa-Dávila M., Possani L.D., y col., 1994).

De los venenos de alacrán se han aislado péptidos tóxicos hacia muchas especies como: mamíferos, insectos, y crustáceos (Possani L.D., y col., 1992) que han servido para elucidar el funcionamiento de muchos mecanismos, nerviosos y membranales.

El hacer la caracterización química del veneno de alacrán ha permitido el entendimiento del mecanismo de acción de las toxinas y ha proporcionado herramientas biológicas para investigar muchos procesos fisiológicos que se dan en el orden molecular.

El veneno de alacrán esta constituido por una gran variedad de compuestos, y se define como un líquido neurotóxico de apariencia lechosa y de color blanquecino, en cuya composición bioquímica se encuentra lo siguiente: aminoácidos libres, sales inorgánicas, lípidos, nucleótidos, mucopolisacáridos, y proteínas, entre ellas pequeños polipéptidos de diferentes pesos moleculares, que presentan neurotoxicidad a invertebrados y/o vertebrados y algunos con actividad antimicrobiana.

Entre las toxinas recientemente descritas destacan aquellas que tienen una función excitatoria en membranas (Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., and Ziin-Justin, S., 1998) y algunas con acción depresiva en insectos. (Zlotkin, E. Guveritz, M., et al., 1993), (Ali S.A., Stoeva S, Grossmann JG, et al., 2001).

El contenido enzimático es pobre en comparación con el veneno de otros animales venenosos. Se han reportado dos enzimas, como la hialuronidasa (Cevallos M. A., y col., 1992), (Pessini AC, Takao TT, et. al, 2001) y fosfolipasas tipo A₂ (Ramanaiah M, Parthasarathy et al.,1990), (Tan NH, Ponnudurai G., 1992), (Cossio V. R., 1993), (Zamudio, F. Z., et al 1997);, (Conde R, Zamudio, F. Z, Becerril B, Possani LD. 1999) en algunos especímenes.

El veneno posee además, moléculas de bajo peso molecular, tales como serotonina (Master R.W.S. y col., 1963); que causa constricción de los vasos sanguíneos en mamíferos y se ha sugerido como un compuesto productor de dolor; la serotonina en

insectos incrementa la excitación muscular. Algunos investigadores han encontrado también, que la presencia de serotonina en venenos de alacranes induce contracciones uterinas y causa abortos espontáneos en ratas de laboratorio (Simard *and* Watt, 1990); inhibidores de proteasas y liberadores de histamina, de la histamina se sabe dilata los vasos sanguíneos en mamíferos, (Chatwal G.S. *y col.*, 1981).

De los venenos de aproximadamente 1500 especies distribuidas en todo el mundo, se calculan a groso modo que existen alrededor de 100, 000 diferentes péptidos, de los cuales menos de 200; (0.02%); se conocen realmente, en términos de su secuencia primaria y función específica. Se han aislado cientos de péptidos de aproximadamente treinta diferentes especies de alacranes. . (Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., *et al.*, Tytgat J., 2001).

Tabla 3. Resumen de los principales péptidos estudiados.

Canal iónico que afectan	Péptidos aislados	# de aminoácidos	# de puentes disulfuro
Na ⁺	85	60-70	4
K ⁺	51	23-42	3 ó 4
Cl ⁻	1	36	4
Ca ²⁺	3	33 - 104	4-5

(Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., *and* Tytgat J., 2001)

De los péptidos aislados de venenos de alacrán, se tienen identificadas cuatro familias de toxinas que interaccionan con canales iónicos de Ca²⁺, Na⁺, K⁺, y Cl⁻, es decir, los péptidos tóxicos interfieren con la función de varios de estos canales iónicos.

Un canal iónico es una estructura proteica, intrínseca de las membranas celulares, a través de la cual se da un intercambio de iones que es indispensable para el funcionamiento celular (Hall, Z.W., *et al.*, 1992).

Existen otras funciones que no han sido estudiadas, como por ejemplo, su actividad enzimática y su papel mediador de muchos procesos membranales (Dr. Possani, comunicación personal).

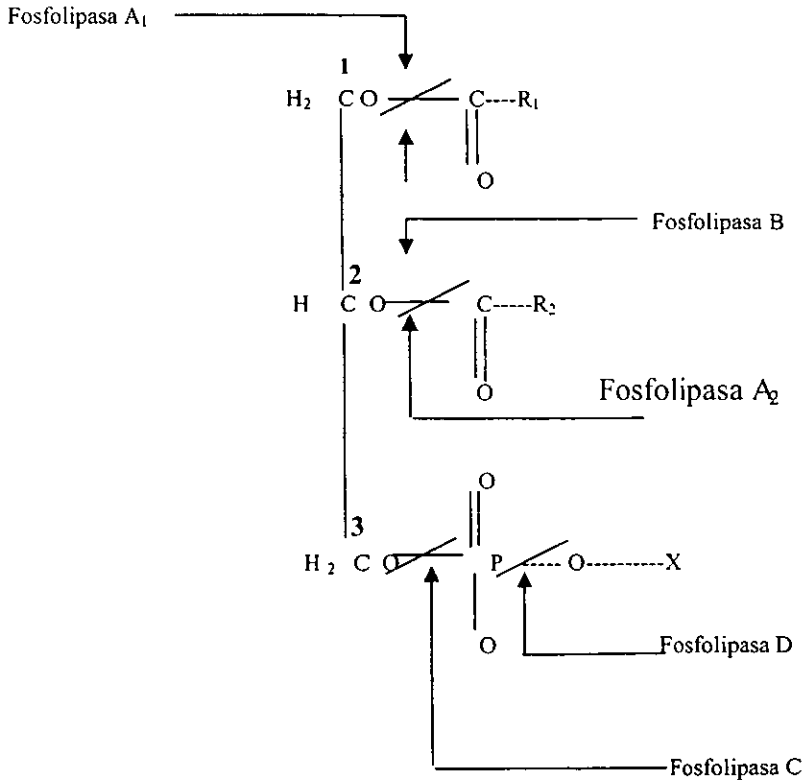
La determinación de las secuencias de aminoácidos de varios péptidos de alacranes, permitió su clasificación y caracterización bioquímica, sobre la base del número de

aminoácidos presentes. Entre los componentes tóxicos encontrados, están los péptidos de cadena corta, media y larga, los cuales reconocen específicamente canales iónicos. Los péptidos de cadena corta (con 31-39 aminoácidos residuales y con tres o cuatro puentes disulfuro), son específicos contra canales iónicos de potasio, K^+ y Cl^- (Carbone 1982, Miller 1985), (Froy., *et al.*, 1999; Becerril *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1999a). Los de cadena media (con 60 a 70 aminoácidos residuales), actúan sobre canales iónicos de sodio, Na^+ (Catterall, W. , (1980)) y además existen péptidos que actúan sobre canales de Ca^{2+} (Valdivia y *cols.*, 1988), y los que actúan sobre canales de cloro (Debin., 1993; Lippen y *cols.*, 1995). De los péptidos tóxicos de cadena larga, que afectan canales de sodio Na^+ han sido caracterizados tres grupos farmacológicos de los cuatro encontrados en el alacrán chino *Buthus martensii* Karsch (Bmk). El primer grupo incluye toxinas α , que afectan a mamíferos y/o insectos a través de una lenta inactivación del canal de sodio (Na^+), (Xiong *et al.*, 1997; Ji *et al.*, 1996), el segundo grupo representado por las toxinas β que afectan la activación del canal de sodio. el tercer grupo incluye toxinas depresoras selectivas para insectos, las cuales inducen parálisis flácida progresiva, y el cuarto grupo contiene toxinas excitatorias selectivas las cuales causan rápida parálisis contráctil después de la inyección en insectos (Xiong *et al.*, 1999). Los péptidos de cadena larga (con actividad residual de fosfolipasa) mostraron afectar el pegado de ryanodina al canal de calcio (Ca^{2+}), en preparaciones vesiculares de retículo sarcoplásmico (Cossio y *col.*, 1993) y (Zamudio, F. Z., y *col.* 1997).

1.7 FOSFOLIPASAS Y SU CLASIFICACIÓN

Las fosfolipasas son una clase heterogénea de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces tipo éster de los fosfolípidos de las membranas celulares, para liberar ácidos grasos.

De acuerdo al mecanismo específico de ataque, para uno u otro enlace éster, se han clasificado como A1, A2, B, C, ó D (Lehninger A.L., 1998).



En los fosfolípidos, los tres grupos hidroxilo primarios del glicerol están esterificados, R₁ y R₂ son cadenas hidrocarbonadas en las posiciones 1 y 2 del esqueleto del glicerol.

Figura 6. Estructura química del fosfolípido y la clasificación de las distintas fosfolipasas, de acuerdo a la posición del enlace del éster que hidrolizan.

Fosfolipasas A₁.

Son aquellas que hidrolizan el éster en la posición 1, dejando un lisofosfoglicérido y un ácido graso libre. Se puede encontrar en procariontes y eucariontes. Las enzimas A₁ solubles que se encuentran en lisosomas y en el citoplasma tienen un pH óptimo ácido, mientras que, el pH de las que están unidas a membrana es básico. La actividad hidrolítica de PLA₁ soluble (que se encuentra en el citoplasma) no es inhibida por Ca²⁺, mientras que las enzimas unidas a membranas son estimuladas por Ca²⁺.

Fosfolipasas tipo A₂

Son enzimas que específicamente hidrolizan el enlace éster de la posición 2 de los fosfolípidos, desplegando marcada actividad hacia lípidos laminares y agregados micelares, ambos de membrana y otros de interface lípido-agua, liberando ácidos grasos y lisofosfoglicéridos. Son termoestables a pH ácidos y requieren concentraciones milimolares de calcio para llevar a cabo su actividad. Son resistentes a agentes desnaturizantes. Contienen 6 ó 7 enlaces disulfuro, que contribuyen a su estabilidad. Tienen masas moleculares bajas de 12 a 18 kDa, (Farooqui A.A., Yang H.C., and Horrocks L. *et al.* 1997).

Fosfolipasa tipo B.

También conocida como lisofosfolipasa, están ampliamente distribuidas en organismos procariontes como eucariontes. Su concentración es alta en pulmón, intestino, hígado, bazo y páncreas de rata, no requieren de Ca²⁺ para su actividad y son inhibidas por detergentes. Las lisofosfolipasas catalizan la hidrólisis del grupo acilo de los lisofosfoglicéridos, dando lugar a un ácido graso y un glicerol 3 fosfato (Rosenberg, P., 1990)

Fosfolipasa tipo C

Catalizan la hidrólisis de la unión entre el diacilglicerol y el ácido fosfórico, dando como productos diacilglicerol y derivados fosfatados de la base. Las PLC 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. La esfingomielasa es una PLC ya que actúa sólo en esfingomielina y la fosfatidil inositolinasa que actúa sobre fosfatidil inositol.

Fosfolipasas tipo D.

Su acción es eliminar el grupo de la cabeza polar, dejando ácido fosfatídico libre (Lehninger, A.L. 1985) Esta fosfolipasa es la que se encuentra en mayor abundancia en tejidos vegetales. También se encuentra en bacterias y mamíferos, donde interviene alterando las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana.

1.8 Fosfolipasas tipo A₂ distribución y abundancia.

Las proteínas encontradas en toda la naturaleza, con actividad fosfolipasa tipo A₂, han sido clasificadas en once grupos (I-XI), y se siguen cuatro criterios para su clasificación dentro de éstos grupos (Six, A.D., and Dennis, E.A., *et al.*, 2000).

- 1.-La enzima debe catalizar la hidrólisis del enlace éster de la posición 2 de un sustrato fosfolípido natural, es decir actividad específica razonable, aunque la enzima pueda también tener otras actividades.
- 2.-La secuencia completa de la proteína madura debe ser conocida, para poder asignarle un grupo.
- 3.-Cada grupo puede incluir todas aquellas enzimas que por homología de secuencia sean identificables con el grupo., si son de la misma especie con subgrupo de letra, sin embargo, homólogos de diferentes especies pueden ser clasificados en el mismo subgrupo .
- 4.-Variantes en el sitio activo catalítico serán distinguidas por números arábigos dentro del mismo subgrupo.

En los sistemas animales, las fosfolipasas tipo A₂ se activan en respuesta a hormonas, y a factores de crecimiento, que están relacionadas con un amplio número de tipos celulares. Las PLA₂ extracelulares participan en diversos roles, que incluye la agregación plaquetaria. Muchas de éstas fosfolipasas A₂ presentes en los venenos de insectos y artrópodos comparten características entre sí, como un bajo peso molecular de 12000 a 18000 Daltones, varios puentes disulfuro de 4 a 8, y una característica muy importante dependen de Ca²⁺ o de un catión divalente para llevar a cabo su actividad.

Otra forma de clasificar a las fosfolipasas ha sido por medio de su patrón de cisteínas, donde dos características son evidentes, la región del sitio activo (-CCxxHDxC) y el asa de unión a calcio (-W/YCGxG-), (Scott *et al.* 1990), su peso molecular, su secuencia aminoacídica, su dependencia por el Ca²⁺ y su localización dentro de la célula.

Modelos detallados del mecanismo catalítico han sido propuestos y las bases estructurales de otros aspectos de la función, como la activación interfacial y la actividad farmacológica están aún siendo discutidas (Arni, R.K. and Ward, R.J 1996). La investigación se ha acrecentado recientemente debido a los estudios computarizados, las investigaciones genómicas, la técnica de PCR, y las búsquedas de bases nucleotídicas, que han permitido la clasificación de 11 grupos de PLA₂, con un total de 23 subgrupos (Six, A.D., and Dennis, E.A., *et al.*, 2000).

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza en organismos vivos, tanto intracelularmente como extracelularmente. Pertenecen al grupo de enzimas más pequeñas, encargadas de realizar funciones fisiológicas vitales y que han sido aisladas de un amplio número de fuentes como: venenos de animales ponzoñosos; víboras, abejas, abejorros, lagartijas, algunos alacranes, mamíferos; páncreas de mamífero; pulmón, mucosa gástrica, hígado, bazo, macrófagos alveolares, intestino, membranas, corazón placenta y cerebro (Betzel, C., *et al.*, 1999).

A la fecha ocho distintas fosfolipasas tipo A₂ de mamíferos han sido clonadas y clasificadas en los grupos I, II, V, y X. Aunque el rol biológico de cada una de estas enzimas no está realmente claro. Las fosfolipasas PLA₂ han sido implicadas en varios mecanismos fisiológicos, así como también en funciones pato fisiológicas incluyendo digestión de lípidos, proliferación celular, neurosecreción, liberación de lípidos mediadores de la inflamación, defensa antibacterial, cáncer y en enfermedades de tipo inflamatorio o autoinmunes (Six, A.D., and Dennis, E.A., *et al.*, 2000).

Las enfermedades neurodegenerativas podrían estar asociadas con la actividad fosfolipasa ya que una prolongada actividad fosfolipasa podría dañar la integridad de las membranas, no solamente por la pérdida esencial de fosfolípidos de la bicapa lipídica, sino por el influjo incontrolable de calcio intracelular Ca²⁺.

Un incremento del nivel de calcio Ca²⁺ intracelular, podría ser responsable de una mayor lipólisis, proteólisis y fragmentación del DNA. Este proceso, acompañado por la acumulación de productos de la peroxidación de lípidos podría estar asociado con la neurodegeneración en trauma neural agudo y en enfermedades neurodegenerativas. (Farooqui, A.A., Yang, Hsiu-chiung, Horrocks, L. 1997). Los productos de hidrólisis de las PLA₂ son ácidos grasos y fosfolípidos.

Los ácidos grasos liberados como el ácido araquidónico (AA) y el ácido oleico(AO), son importantes reservorios de energía y en el caso del ácido araquidónico (AA), éste es usado como precursor para la síntesis de eicosanoides; (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrenos); que están encargados de modular la contracción muscular, el stress localizado y las respuestas inflamatorias.

Los lisofosfolípidos son importantes en señalización celular, remodelaje y perturbación de membrana.

Las fosfolipasas PLA₂ forman parte esencial de diversos procesos biológicos tales como el intercambio de los fosfolípidos en las biomembranas, la digestión y la producción de ácidos grasos libres; (en los fagosomas); la neurotoxicidad y la citotoxicidad, (en venenos de animales ponzoñosos y de hongos venenosos), en los procesos inflamatorios, y en la reacción inmunitaria y antimicrobiana (fosfolipasa encontrada en ratón), (Valentín, E., Ghomashchi, F, *et al* , 2000)

Entre las fosfolipasas tipo PLA₂ existen numerosas familias estructurales con diferencias fisicoquímicas marcadas, éste es, estado de agregación (monoméricas o diméricas), su especificidad por el sustrato, y punto isoelectrico.

Las fosfolipasas catalizan reacciones en la interfase lípido-acuosa de la membrana celular y la actividad fosfolipasa es mucho más afin sobre sustratos agregados como monocapas, bicapas, miscelas membranales y vesículas en comparación con sustratos solubles mononucleares y dispersos, éste fenómeno se denomina activación interfacial.

Las diversas fosfolipasas PLA₂ que se han descubierto en la naturaleza, han sido clasificadas con respecto a su patrón de cisteínas, su peso molecular, su secuencia de aminoácidos, su dependencia por el calcio y su localización dentro de la célula. (Dennis, E. A., *et al.*, 1997).

Con la secuencia del genoma de muchos organismos y con el proyecto genoma humano terminado, muchos más genes PLA₂ homólogos, serán seguramente descubiertos y tal vez más nuevos Grupos de PLA₂ serán agregados y será posible un mejor entendimiento de las fosfolipasas y su diversidad en la naturaleza.

Actualmente se cuenta con la siguiente clasificación de fosfolipasas (Six, A.D., Dennis E.A., *et al.*, 2000).

A continuación se presentan las siguientes dos tablas de la más reciente clasificación de fosfolipasas tipo A₂:

La clasificación de la tabla 4 se basa en las siguientes características

Son típicas fosfolipasas pequeñas y extracelulares (PLA₂s) el tamaño varía de 12 -18 kDa.

Requieren concentraciones milimolares de Ca²⁺ para llevar a cabo su actividad.

Presentan un sitio activo formado por el par histidina y aspártico.

Los grupos V y X están listados después de los grupos I y II por su cercana homología con muchos residuos conservados incluyendo 6 puentes disulfuro, un aminoácido histidina y dos aminoácidos aspárticos.

Clasificación de Fosfolipasas.

Tabla 4

Fosfolipasas A₂ que utilizan una histidina catalítica.

Grupo	Fuente Inicial	Tamaño (kDa)	Puentes disulfuro	Región	Carboxilo Terminal Extensión	Enzima arquetipo	
I	A	Cobra, crótalo	13-15	7	11-77	-	cobra
	B	Páncreas humano	13-15	7	11-77	-	Humano
II	A	Fluido sinovial Humano, Plaquetas/ veneno de víbora/ crótalo	13-15	7	50-137	7	Humano
	B	Víbora Gabón Veneno	13-15	6	50-137	6	Víbora
	C	rata, testículo ratón	15	8	50-137, 86-92	7	Ratón
	D	Humano, páncreas ratón, bazo	14-15	7	50-137	7	Humano
	E	Humano, cerebro ratón, corazón, útero.	14-15	7	50-137	7	Humano
	F	Testículo ratón, embrión,	16-17	7	50-137	30	Ratón
V		corazón mamífero, pulmón	14	6	-	-	Humano
X		Bazo humano/ timo/ leucocitos	14	8	11-77, 50-137	8	Humano
III		Abeja/monstruo de cuentas /alacrán	15-18	5	-	-	Abeja de miel
IX		Veneno de caracol	14	6	-	-	Caracol marino
XI	A	Retoño de arroz verde(PLA2-I)	12.4	6	-	-	arroz
	B	Retoño de arroz verde(PLA2-II)	12.4	6	-	-	arroz

Según (Six, A.D., and Dennis. E..A., *et al.*, 2000)

Tabla # 5. Fosfolipasas que utilizan una serina catalítica.

Grupo		Fuente general	Nombres alternos	Tamaño kDa	Ca ²⁺ efectos	Características
IV	A	Células Humanas 937 /plaquetas RAW264.7/ riñón de ratón W	cPLA ₂ α	85	<μM ;traslocación de membrana	C2 dominio, Regulación α β-hidrolasa fosforilación regulada
	B	Páncreas humano/ hígado/ corazón/ cerebro	cPLA ₂ β	114	<μM; traslocación de membrana.	C2 dominio α β-hidrolasa
	C	Corazón humano / músculo esquelético	cPLA ₂ γ	61	-	α β-hidrolasa
VI	A-1	P388D ₁ macrófagos, CHO	iPLA ₂ o iPLA ₂ -A	84-85	-	Empalme corto.
	A-2	Linfocitos B humanos, bazo	iPLA ₂ -B	88-90	-	Empalme largo
	B	Corazón humano/ músculo esquelético	iPLA ₂ γ o iPLA ₂ -2	88	-	Enlace de membrana
VII	A	Humano/ ratón/ porcino/ plasma bovino.	PAF-AH	45	-	Secretada α β-hidrolasa
	B	Humano/ bovino /hígado/ riñón	PAF-AH (II)	40	-	intracelular
VIII	A	Cerebro humano	PAF-AH1b α ₁ subunidad o trímero	26	-	Intracelular proteína G foldeada
	B	Cerebro humano	PAF-AH1b α ₂	26	-	Activa como heterodímero o como homodímero

Según (Six, A. D., Dennis, E. A., *et. al.*, 2000)

L a clasificación de la **tabla 5** se basa en el siguiente criterio:

Son fosfolipasas de mayor tamaño de un rango de 26-114 kDa aproximadamente.

Son enzimas intracelulares.

Utilizan una serina catalítica

No presentan puentes disulfuro.

Las fosfolipasas tipo A_2 están presentes en el veneno de vertebrados como de invertebrados, pueden ser los componentes más abundantes del veneno como en las víboras, o el menos abundante como en los alacranes.

Pueden tener función digestiva y tóxica. Solamente algunas de ellas exhiben una tremenda variedad de toxicidad, en algunas es difícil medir su actividad catalítica pero aún así son tóxicas. Algo más de 150 fosfolipasas aisladas de venenos han sido caracterizadas, (Valentín, E., and Lambeau, G. 2000), la mayoría de víboras. Estudios con fosfolipasas aisladas de venenos ($vPLA_2$) han demostrado poseer potentes efectos farmacológicos desde neurotoxicidad hasta proliferación celular, actividad antibacterial y HIV-1 antiviral. Paramo L., *et al.*, (1998), Fernand D., *et al.*, (1999); Kini R.M. *et al.*, (1997), Kini R.M., *et al.*, (1989).

Los primeros trabajos sobre fosfolipasas se llevaron a cabo en el veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus* con el aislamiento de la toxina β -bungarotoxina. Esta toxina es heterodimérica formada por una subunidad larga de 120 aminoácidos (aa) y subunidad pequeña de 61 aminoácidos (aa), unidas por un puente disulfuro (Kondo, K. *et al.*, (1982a).

Se han descubierto isoformas de la β -bungarotoxina, en el veneno de ésta serpiente (Kondo, K. *et al.*, (1982b).

Las PLA_2 fosfolipasas de venenos de invertebrados son proteínas ricas en puentes disulfuro, pero tienen una estructura primaria distinta de los mamíferos y de las serpientes por ello han sido clasificadas en los grupos III y IX.

Han sido encontradas en abejas, alacranes, medusas, y venenos de caracoles marinos. La fosfolipasa de la abeja es la mejor estudiada, es por ello que se propone como el arquetipo de la fosfolipasas del grupo III.

La clonación de la fosfolipasa de humano, ha revelado diferencias importantes con el grupo I y II, aunque el sitio catalítico es similar a ese grupo.

Fosfolipasas que siguen el arquetipo de la fosfolipasa de la abeja, han sido aisladas del veneno del saurio *Heloderma horridum horridum* (Sosa, Alagón, Possani, (1986). lo que arroja una fuerte evidencia que indica que las fosfolipasas del grupo tres III PLA_2 se encuentran en vertebrados y también en invertebrados.

En los últimos tres años, la búsqueda sistemática de PLA₂ homólogos, en bases de datos nucleicos ha permitido la clonación de nuevas fosfolipasas. (Cupillard, L., Koumanov, K., Mattéi, M. G., Lazdunski, M., y Lambeau, G., 1997)

El uso de bases de datos permitió la identificación de la secuencia genómica humana que desplegó una homología significativa con las fosfolipasas del grupo III..

II.-ANTECEDENTES.

2.1 Fosfolipasas y el veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

La actividad fosfolipasa ya ha sido descrita en numerosos venenos de animales, sin embargo el estudio de actividad fosfolipasa en alacranes inició apenas hace algunos años. Se cuenta con pocos estudios de venenos de alacrán con actividad fosfolipasa.

La caracterización bioquímica de la actividad fosfolipasa inicia en el grupo del Dr. Possani de la UNAM con el trabajo del alacrán *Hadrurus concolourus*., (Cossio, B. R., 1993), y continua con el estudio del veneno del alacrán *Pandinus imperator* en donde se encontraron dos péptidos con actividad residual fosfolipasa, ambas heterodiméricas y dependientes de Ca²⁺, la Imperatoxina I, (Zamudio F. Z., y col. 1997), y la fosfolipina, otra fosfolipasa encontrada en el veneno del alacrán *Pandinus imperator* (R. Conde, F.Z. Zamudio, B. Becerril, and L.D. Possani, 1999), estudios que permitieron, el reconocimiento formal dentro de la gran familia de fosfolipasas, ya que son las primeras secuencias completas reportadas (Six, A.D., Dennis A.E. 2000).

En la literatura, se menciona que existe actividad fosfolipasa en los siguientes alacranes :

Heterometrus bengalensis, (Kar P.K., and Sarangi B., 1986),

Heterometrus fulvipes, (Ramanaiah y col., 1990),

Androctonus mauretanicus (Lazar, N. y Ghalim, M., 1998).

Desgraciadamente no se hace mención de secuencia o algún otro dato.

Dentro de la gran familia de fosfolipasas distribuidas en toda la naturaleza, las fosfolipasas de alacranes han quedado clasificadas en el grupo III PLA₂ por homología de secuencia aminoacídica, junto con las fosfolipasas encontradas en veneno de abeja *Apis mellifera*. (Shipolini R.A., et al, 1976), y en el abejorro *Bombus pennsylvanicus*, (Hoffman D.R., 1994), monstruo de Cuentas, *Heloderma horridum horridum*, y veneno de medusa, y recientemente clonada, una fosfolipasa de humano (PLA₂). Según lo muestra la tabla No.4. (Valentín E., and Ghomashchi F., 2000).

Con éstos antecedentes se inició la búsqueda de fosfolipasas en el veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

III.-OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo, aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente péptidos con actividad fosfolipasa del veneno del alacrán mexicano *Hadrurus aztecus*, mediante la siguiente estrategia. :

- 1.-Purificar del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* el péptido o péptidos que tengan actividad fosfolipasa.
2. -Caracterizar químicamente el péptido con actividad fosfolipasa.
3. -Determinar la estructura primaria del péptido con actividad fosfolipasa.
4. -Determinar el peso molecular por espectrometría de masas.
5. -Con la información obtenida, comparar las secuencias con lo reportado en la literatura.

IV.-Metodología.

Se usaron reactivos grado analítico marca Millipore y Beckman para el análisis de secuencia y Sephadex G-50 (medio) marca Pharmacia Fine Chemicals hecho en Suecia. Se utilizaron disolventes grado HPLC en la cromatografía líquida de alta presión. Sólo agua tetradesilada fue utilizada.

4.1 Recolección

Los alacranes *Hadrurus aztecus* se capturaron en el Estado de Guerrero, cerca de Iguala. Fueron llevados al laboratorio y se mantienen vivos.

4.2 Extracción del veneno y liofilización.

El veneno crudo se obtiene en el laboratorio por estimulación eléctrica del telson de los alacranes colectados. Los especímenes fueron anestesiados con anhídrido carbónico (CO₂) antes de la extracción. El veneno fue recuperado en agua tetradesilada y centrifugado por 10 minutos a 4° C a 18,000 g en centrifuga Beckman. El sobrenadante fue liofilizado y almacenado a -20° C.

Una vez liofilizado el veneno, es un polvo blanco seco que puede ser guardado indefinidamente a -20° C., sin perder sus propiedades tóxicas o descomponerse, hasta su uso posterior (Stahnke, H.L. *et al.*, 1978).

4.3 Determinación de la actividad fosfolipasa

Para la determinación de la actividad fosfolipasa se prepararon placas de agar -yema de huevo de acuerdo a la técnica de (Haberman, E., Hork, K.L., 1972).

- A) Se mezclan 12 ml de yema de huevo fresco, con 36 ml de disolución de NaCl 0.86% y se centrifuga a 3500 r.p.m. por 5 minutos. Se descarta el precipitado. El sobrenadante es guardado para su uso inmediato, en hielo. Si es necesario se puede almacenar por una o dos semanas a -20°C, siempre y cuando se congele inmediatamente después de prepararlo.
- B) Disolver 0.3 g de agarosa en 50 ml de 50mM de Tris-HCl pH=7.95 en un baño de agua hirviendo o un minuto en el horno microondas.
- C) Preparar 100 ml de disolución de CaCl₂ 10 mM.
Se mezclan 0.5 ml de A) con 50 ml de B) y 0.5 ml de C).

Inmediatamente antes de que se enfríe se vacía aproximadamente 15 ml de la mezcla en cada caja de Petri, para obtener geles de aproximadamente 0.2mm de espesor, que son enfriadas a temperatura ambiente.

Una vez que se encuentran a temperatura ambiente las cajas de Petri, se les hace una serie de pozos o perforaciones de 2mm de diámetro, que son llenados con 3µg disueltos en 3µl de agua tetradesilada, como cantidad mínima de muestra del veneno o de las fracciones a probar. Se incuban tapadas, por aproximadamente 2 hrs. transcurrido el tiempo, la actividad fosfolipasa se traduce en la aparición de una halo transparente alrededor del pozo.

4.4 Procedimiento de purificación.

Separaciones cromatográficas para la purificación del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

4.4.1 Cromatografía por Exclusión Molecular.

Una vez liofilizado el veneno, se somete a una cromatografía por filtración en gel o exclusión molecular. Se empacó por gravedad una columna de 2m de largo por 0.9 cm de diámetro con resina Sephadex G-50 medio marca Pharmacia Fine Chemical (Suecia). La columna se equilibró con una disolución amortiguadora de acetato de amonio 20 mM a pH=4.7, por 12 horas.

El veneno liofilizado fue disuelto en 1 ml de agua tetradesilada y centri fugado por 15 min. a 10,000 revoluciones por minuto. Se aplicó el sobrenadante a la columna, con un flujo de 15 ml por hora, y la columna fue corrida con amortiguador Buffer 20mM de acetato de amonio, pH 4.7. Las fracciones fueron colectadas automáticamente con un colector marca Ultracac[®], 2070 LKB (BROMMA).

Se colectaron fracciones de aproximadamente 2.5 ml que son monitoreadas automáticamente a una longitud de onda de 254 nm. Aparte se hicieron lecturas a 280nm en espectrofotómetro Beckman G50., para construir la gráfica.

4.4.2 Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa.

(RV-HPLC)

Se utilizó siempre para las cromatografías líquidas de alta presión en fase reversa un cromatógrafo Waters 600 E equipado con detector de onda variable y pantalla digital.

Se utilizaron siempre las mismas disoluciones:

Disolución A : Agua con 0.12% de ácido trifluoro acético (TFA.)

Disolución B : Acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoro acético (TFA)

Lo que varió en las cromatografías fue el gradiente utilizado de acuerdo a las condiciones de la muestra, el tipo de columna utilizada C_{18} semipreparativa y C_{18} analítica, así como el flujo de la columna de 2 ml y de 1ml según la columna utilizada respectivamente.

4.5 Determinación de estructura primaria.

La determinación de la secuencia de aminoácidos se realizó en un secuenciador automático marca Beckman LF 3000 Sequencing System “ adaptado con System Gold Micro HPLC”, que utiliza la Técnica de Degradación de Edman de forma automática (Edman, 1960).

4.5.1 Reducción.

La muestra fue reducida con DTT (ditiotreitol), y disuelta en solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, a continuación la solución fue purgada con corriente de N_2 por 10 minutos, e inmediatamente se le adicionó 10 μ l de 0.01M de DTT y se calentó por 15 minutos a 55°C.

4.5.2 Digestiones enzimáticas

Con el fin de determinar la secuencia de aminoácidos internos.

a) Proteasa V_8

La digestión proteolítica se realizó al usar la proteasa V_8 de *Staphilococcus aureus* marca Boehringer Mannheim. Una muestra de 25 μ g de fosfolipasa se disolvió en 100 μ l de bicarbonato de amonio 0.1M, se agregaron 2 μ g de proteasa V_8 , y se incubó a 37° durante 4 horas. A continuación se le agregó 10 μ l de ditiotreitol (DTT) (1mg/ml), se burbujeó con gas nitrógeno por 5 minutos, se tapó, se incubó a 55° C por 15 minutos e inmediatamente se purificó en RV-HPLC con una columna C_{18} fase reversa analítica. Los péptidos separados se enviaron a secuenciar.

b) Digestión con Lys-C

Una muestra conteniendo de 25 μ g de fosfolipasa se disolvió en 100 μ l de disolución (Tris 50 mM con 1mM de EDTA a pH 6.5), a continuación se adicionaron 2 μ l de enzima-Lys-C, se incubó a 37° C durante cuatro horas. Posteriormente se agregaron 10 μ l de ditiotreitol (DTT) de concentración 1mg/ml, se burbujeó con gas nitrógeno por 15 minutos, y finalmente se incubó a 55°C por 15 minutos e inmediatamente se hizo pasar

por cromatografía líquida de alta presión, con una columna C_{18} fase reversa analítica. Los péptidos obtenidos se enviaron a secuenciar.

4.6. Bromuro de cianógeno.

1. - Se disolvieron 30 mg de CNBr (Bromuro de cianógeno) en 210 μ l de ácido fórmico al 98%, se adicionan 90 μ l de agua para obtener una concentración final de 70% de ácido fórmico.
2. - Se adiciona la mezcla anterior a 40 μ g de muestra fosfolipasa, y se incuba a temperatura ambiente durante doce (12) horas en la oscuridad.
3. -La muestra de reacción se burbujea con N_2 , hasta sequedad e inmediatamente se resuspende en agua y es inyectada en el cromatógrafo.
- 4 -Se procesa a la par en otro tubo Eppendorf los reactivos sin proteína, siguiendo los tres pasos anteriores, para ser usado como blanco de reactivos.

4.7 Determinación del peso molecular por Espectrometría de masas.

La determinación de peso molecular se hizo en espectrómetro de masas MALDI-TOF en la Universidad de Oklahoma.

4.8 Búsqueda de alineaciones, con secuencias de proteínas, especialmente fosfolipasas reportadas en la literatura.

Las comparaciones de secuencia se realizan con los programas de análisis FASTA y Clustal X, al utilizar secuencias del banco de datos de programa SWISSPROT.

V.- Resultados y Discusión.

5.1 Extracción del veneno

Se ordeñaron 70 alacranes adultos, y del veneno recuperado y liofilizado se obtuvo un rendimiento de 106.8 mg de veneno total. Lo que corresponde a 1.54 mg por alacrán ordeñado aproximadamente y de fracción Haz II con actividad fosfolipasa 0.192 mg ó ~ 192 μ g por alacrán.

5.2 Ensayo de actividad fosfolipasa del veneno total.

Se realizó el ensayo de actividad fosfolipasa gel agarosa-yema de huevo, con el veneno total de *Hadrurus aztecus*, un control positivo a ensayo de fosfolipasa, de veneno de *Heloderma Horridum horridum* y agua como control negativo. Conforme a lo esperado, el veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* presenta actividad fosfolipasa, que se traduce en la formación de un halo alrededor del pozo; de tamaño entre 5mm y 9mm de diámetro; en donde fue aplicada la muestra.

por cromatografía líquida de alta presión, con una columna C₁₈ fase reversa analítica. Los péptidos obtenidos se enviaron a secuenciar.

4.6. Bromuro de cianógeno.

1. - Se disolvieron 30 mg de CNBr (Bromuro de cianógeno) en 210 µl de ácido fórmico al 98%, se adicionan 90 µl de agua para obtener una concentración final de 70% de ácido fórmico.
2. - Se adiciona la mezcla anterior a 40 µg de muestra fosfolipasa, y se incuba a temperatura ambiente durante doce (12) horas en la obscuridad.
3. -La muestra de reacción se burbujea con N₂, hasta sequedad e inmediatamente se resuspende en agua y es inyectada en el cromatógrafo.
- 4 -Se procesa a la par en otro tubo Eppendorf los reactivos sin proteína, siguiendo los tres pasos anteriores, para ser usado como blanco de reactivos.

4.7 Determinación del peso molecular por Espectrometría de masas.

La determinación de peso molecular se hizo en espectrómetro de masas MALDI-TOF en la Universidad de Oklahoma.

4.8 Búsqueda de alineaciones, con secuencias de proteínas, especialmente fosfolipasas reportadas en la literatura.

Las comparaciones de secuencia se realizan con los programas de análisis FASTA y Clustal X, al utilizar secuencias del banco de datos de programa SWISSPROT.

V.- Resultados y Discusión.

5.1 Extracción del veneno

Se ordeñaron 70 alacranes adultos, y del veneno recuperado y liofilizado se obtuvo un rendimiento de 106.8 mg de veneno total. Lo que corresponde a 1.54 mg por alacrán ordeñado aproximadamente y de fracción Haz II con actividad fosfolipasa 0.192 mg ó ~ 192 µg por alacrán.

5.2 Ensayo de actividad fosfolipasa del veneno total.

Se realizó el ensayo de actividad fosfolipasa gel agarosa-yema de huevo, con el veneno total de *Hadrurus aztecus*, un control positivo a ensayo de fosfolipasa, de veneno de *Heloderma Horridum horridum* y agua como control negativo. Conforme a lo esperado, el veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* presenta actividad fosfolipasa, que se traduce en la formación de un halo alrededor del pozo; de tamaño entre 5mm y 9mm de diámetro; en donde fue aplicada la muestra.

Veneno ensayado	cantidad	resultado	Tamaño del halo
<i>H. h.h.</i>	3µg/5µl	+	7mm
<i>H. az.</i>	3µg	+	6mm
Agua	5µl	-	-

Tabla 6 Resultados del ensayo de fosfolipasa previo al fraccionamiento del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*. *H.h.h.* se refiere al veneno de *Heloderma horridum* del que se han aislado compuestos con actividad fosfolipasa, Sosa B.P., Alagón, A.C., *et al.*, (1986), *H.az.* se refiere al veneno del alacrán mexicano *Hadrurus aztecus*, ambos presentaron actividad fosfolipasa. Por último agua como control negativo.

5.3 Separaciones cromatográficas.

Cromatografía por exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular mostró la separación de 106.8 mg de veneno total, en seis (6) fracciones denominadas Haz (I, II, III, IV, V y VI), cada una colectada por separado. Se obtuvieron 80.86 mg totales recuperados, lo que representa un rendimiento del 75.72%.

Número Fracción	# de tubos	Absorbencia $\lambda_{280\text{nm}}$	Volumen (ml)	mg de fracción. en veneno total.	%de fracción en veneno total.
Haz I	47-62	0.252	38	9.6	9
Haz II	63-81	0.302	44	13.3	12.5
Haz III	82-120	0.275	95	26.13	24.5
Haz IV	121-130	0.126	25	3.15	3
Haz V	131-150	0.450	50	22.5	21.0
Haz VI	151-170	0.127	49	6.23	5.8

La tabla 7. Patrón de fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular. Se resume la cantidad de muestra obtenida en cada fracción en mg, así como la cantidad porcentual con respecto al veneno total.

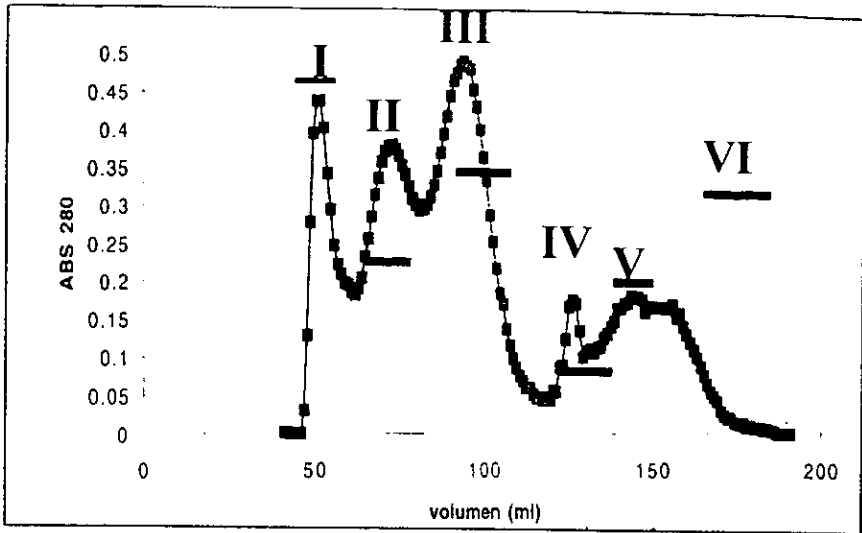


FIGURA 7. Cromatograma de las fracciones obtenidas de la separación del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* por exclusión molecular

El gráfico muestra la separación de los componentes del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*, por cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel. los componentes del veneno de mayor peso molecular eluyen primero.

5.4 Prueba de actividad fosfolipasa de las seis fracciones obtenidas por Cromatografía de exclusión molecular.

Se hizo el ensayo de actividad fosfolipasa con las seis fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular, ésto es Haz I, HazII, Haz III , Haz IV, Haz V y Haz VI.. (La abreviatura Haz. significa *Hadrurus aztecus*).

En cajas de Petri con gel agarosa-yema de huevo se hicieron nueve pozos de 3 mm de diámetro estratégicamente distribuidos para evitar perfusión entre cada una de las muestras.

Se aplicaron 3 µg disueltos en 3µl de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular, veneno total de *Hadrurus aztecus*, control positivo de veneno de *Heloderma horridum horridum*, y agua tetrastilada como control negativo.

Muestra	cantidad	resultado
Veneno Total <i>H.az</i>	3µg	+
Agua tetradesilada	3µl	-
Veneno de <i>H.h.h.</i>	3µg	+
Haz I	3µg	-
Haz II	3µg	+
Haz III	3µg	-
Haz IV	3µg	-
Haz V	3µg	-
Haz VI	3µg	-

Tabla 8 Ensayo de actividad fosfolipasa de las fracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular del alacrán *Hadrurus aztecus*.

Se muestra el resultado del ensayo de actividad fosfolipasa de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular. En gris se resalta la fracción Haz II que resultó positiva.

La fracción Haz II, es la única de las seis fracciones obtenidas, que presenta actividad fosfolipasa, con respuesta similar al veneno total crudo de *Hadrurus aztecus* y al control positivo del veneno de monstruo de Cuentas o *Heloderma horridum horridum*. Lo anterior permite confirmar y definir la presencia de actividad fosfolipasa en la fracción Haz II del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

Por ser la fracción Haz II positiva en la prueba de actividad fosfolipasa, se procedió a la búsqueda y purificación de los péptidos responsables de ésta actividad.

5.5 Cromatografía en HPLC **con columna C₁₈, semipreparativa de fase reversa**

Se recromatografiaron ~ 13.22 mg de la fracción Haz II, con actividad fosfolipasa, en cantidades variables de 250 µg y 950 µg.

Se utilizó un gradiente de 0 a 60% de B en un tiempo de 60 minutos de las disoluciones mencionadas en metodología.

Se obtuvo un perfil cromatográfico compuesto de 19 subfracciones

Todas las corridas efectuadas tienen este patrón, los datos y gráficos son reproducibles.

Se presentan los datos de la separación de la fracción Haz II en HPLC con columna C₁₈ analítica fase reversa, el porcentaje presente de cada uno de los componentes, en la propia fracción Haz II y en el veneno total.

# tubo	Tiempo de Retención (min.)	Cantidad (µg)	A _{230nm} %	% en veneno total.
1	31.92	13.965	1.47	0.18
2	32.75	23.78	2.503	0.31
3	34.19	21.44	2.257	0.28
4	35.18	107.34	11.299	0.10
5	36.48	2.508	0.264	0.03
6	37.81	2.85	0.301	0.04
7	38.5	21.07	2.218	0.27
8	39.37	104.56	11.007	1.4
9	40.21	335.14	35.278	4.3
10	41.64	25.44	2.678	0.33
11	42.52	12.68	1.335	0.17
12	43.49	13.48	1.419	0.18
13	43.94	182.7	19.232	2.39
14	45.36	5.89	0.62	0.77
15	45.95	9.671	1.018	0.126
16	46.75	13.63	1.435	0.178
17	47.26	28.04	2.952	0.37
18	48.56	15.53	1.635	0.14
19	50.16	10.26	1.08	0.13

Tabla 9. Fracciones obtenidas en la recromatografía líquida de alta presión en fase reversa, de la fracción Haz II del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

La tabla muestra los datos de la cromatografía de la fracción Haz II del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* en cromatografía de alta presión en fase reversa (HPLC-RE)

con una columna C₁₈ semipreparativa fase reversa. Se inyectaron 950 µg disueltos en 1 ml de agua tetradesilada, en un gradiente de 0 a 60% de disolución "B" o acetonitrilo con 0.1% de TFA con un flujo de 2ml por minuto

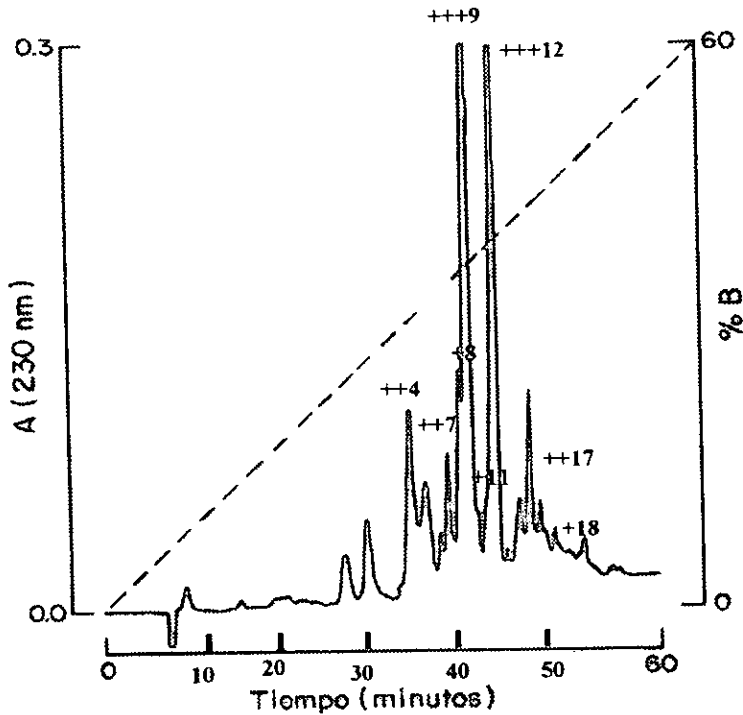


Figura 8 Patrón cromatográfico de la recromatografía de alta presión en fase reversa de la fracción Haz II, del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

Gráfico de la cromatografía líquida de alta presión de la fracción Haz II del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*. Se indican con número las fracciones positivas al ensayo de actividad fosfolipasa.

Se utilizó un gradiente de 0 a 60% de B en un tiempo de 60 minutos, con una columna C₁₈ semipreparativa de fase reversa, y una sensibilidad de 0.3.

5.6 Ensayo de actividad fosfolipasa de las subfracciones de la fracción Haz II.

Se hizo el ensayo de actividad fosfolipasa de las subfracciones de la fracción Haz II del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*. La mayoría de las fracciones resultaron positivas para realizar el ensayo. se utilizaron 3µg de muestra de cada una,

subfracción	resultado	subfracción	resultado
4	++	11	+
7	++	12	+++
8	+	17	++
9	+++	18	+

Tabla # 10 Resultados del ensayo de actividad fosfolipasa de las subfracciones de la fracción Haz II. Una cruz , (+) significa actividad ligera, (++) actividad moderada, (+++) mayor actividad.

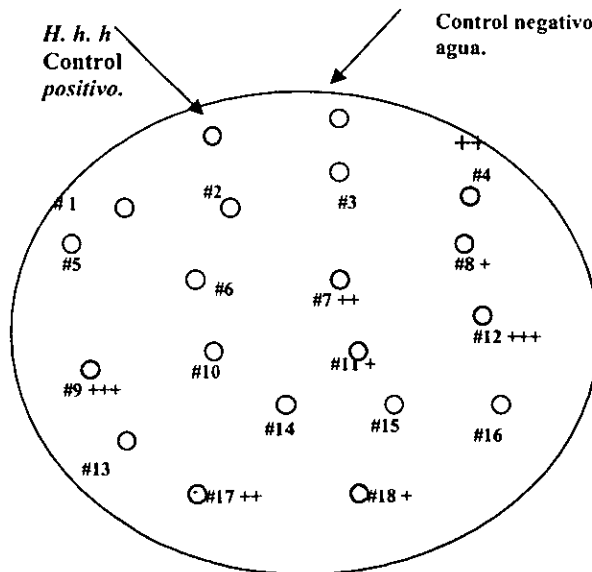


Figura 9

Esquema del ensayo de actividad fosfolipasa, en el gel agarosa yema de huevo de las subfracciones obtenidas de la purificación de la fracción Haz II del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

De acuerdo al resultado del ensayo de actividad fosfolipasa, se trabajaron las subfracciones que resultaron ser positivas y de mayor actividad.

5.7 Purificación de fracción 9 a la que se le llamó fosfolipasa Azteca, por cromatografía de alta presión en fase reversa con columna C_{18} analítica.

Se hizo la purificación de la fosfolipasa azteca con tiempo de retención 40 21. Aproximadamente 50 μg se recromatografiaron en una gradiente de 20 a 60% de B (acetonitrilo con 0.1% de TFA), en 40 min. con una columna C_{18} reversa analítica, para su purificación.

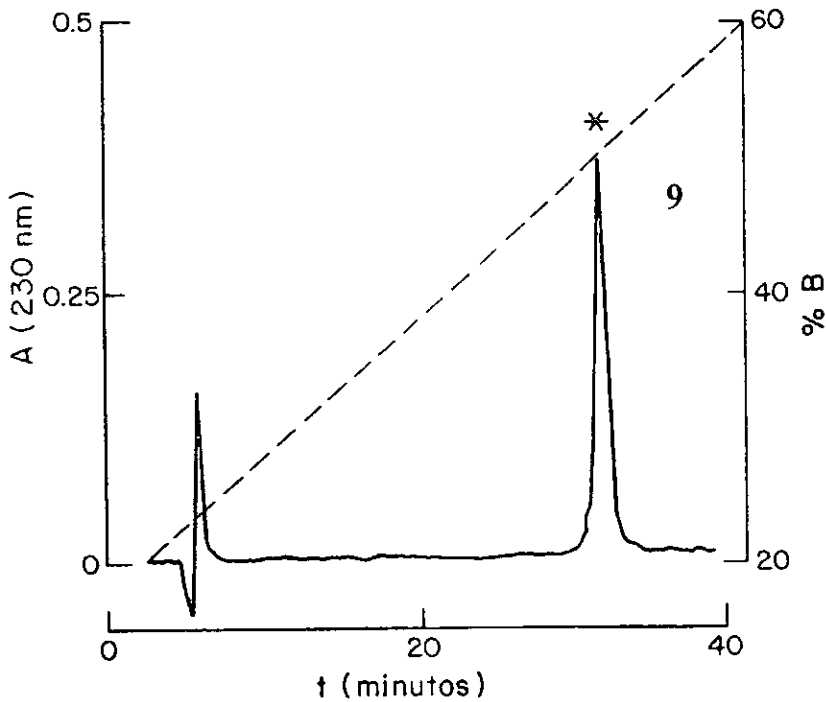


Figura 10

Gráfico de la cromatografía de la purificación de fosfolipasa azteca del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

Se muestra repurificación de la fosfolipasa azteca, señalada, la subfracción que se purificó, en un gradiente de 20-60% de B en 40 minutos, con columna C_{18} analítica de fase reversa, corrido con una sensibilidad de 0.5. El componente se purifica en el minuto 16.72.

En la siguiente tabla se observa la cantidad en μg obtenida en la recromatografía del componente 9.

Componente	tiempo min.	Cantidad μg	% de área
1	16.17	42.6	77.6

Tabla 11 Repurificación de fosfolipasa azteca tiempo y cantidad obtenidos

5.7.1 Secuencia directa del componente fosfolipasa azteca.

Después de recromatografiar la fosfolipasa Azteca se obtuvieron 42.6 μg . El componente fue enviado a secuenciar y se observó que había una señal doble durante los primeros veinte aminoácidos, que posteriormente desaparecía, de haber sido un contaminante este no hubiera desaparecido súbitamente, al observar con detalle la secuencia y con el antecedente de las fosfolipasas heterodiméricas encontradas en el alacrán *Pandinus imperator*, se hicieron los experimentos adecuados para confirmar que era una fosfolipasa heterodimérica, es decir la muestra se redujo y alquiló y se envió a secuenciar. Al hacer posteriores repurificaciones los datos seguían siendo los mismos.

La secuencia se alineó de la siguiente forma, 49 aminoácidos para la cadena larga y 21 aminoácidos para la cadena pequeña.

Se había logrado determinar el amino terminal de las dos cadenas

5	10	15	20	25	30	35	40	45
TVLGT	KWCGA	GNEAA	WYSDL	GYFNN	VDXCC	XEHDH	CDNIP	AGETDYETK
1	5	10	21					
STSNE	CPNGV	AEYTG	E TGLGA					

Figura 11 Fosfolipasa Azteca, determinación de la estructura primaria, secuencia amino terminal, obtenida de manera directa por secuenciación automatizada de Edman. El aminoácido número 24 asparagina, fue la primera diferencia encontrada entre las dos fosfolipasas secuenciadas.

5.8 Purificación de la fracción 12, ahora llamado fosfolipasa Hadrura por cromatografía de alta presión en fase reversa con una columna analítica C₁₈ de fase reversa.

Aproximadamente 44 µg de la fracción 12, correspondiente al tiempo de retención 43.94, llamada fosfolipasa Hadrura, se inyectó al cromatógrafo con el fin de obtener mayor homogeneidad, la muestra obtenida se recromatografió de nuevo .

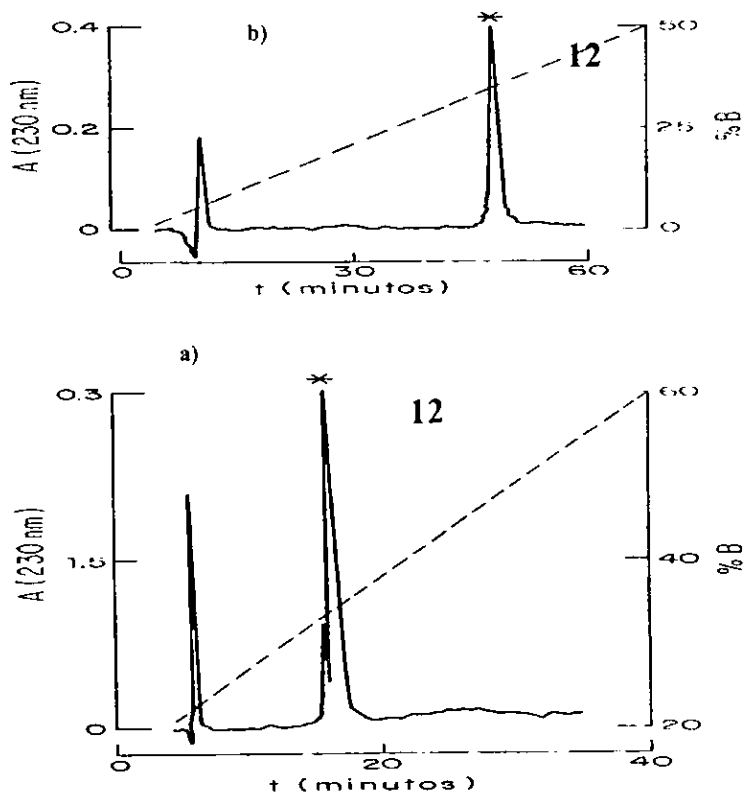


Figura 12 representa los cromatogramas de las purificaciones sucesivas del componente fosfolipasa hadrura, del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*.

a) Muestra la recromatografía del componente fosfolipasa hadrura al utilizar un gradiente de 20 a 60% de B en 40 min con la misma columna C₁₈ analítica de fase reversa y una sensibilidad de 0.3. b) la recromatografía sucesiva de la fosfolipasa hadrura al utilizar un gradiente de 0-50% de B en 60 min con columna C₁₈ de fase reversa y sensibilidad 0.4.

En las siguientes tablas se observa la cantidad en μg obtenidos en las recromatografías.

# de Componentes	Tiempo en min	Cantidad en μg	% de área.
1	19.21	26.7	60.4

Tabla 12 del gráfico a). Repurificación del componente Fosfolipasa Hadrura.

# de Componentes	Tiempo en min	Cantidad en μg	% de área
1	46.40	26.26	99.22

Tabla 13 gráfico b) Repurificación sucesiva del componente Fosfolipasa Hadrura

5.8.1 Determinación de estructura primaria del componente fosfolipasa hadrura.

Después de la recromatografía se obtuvieron 26 μg del componente fosfolipasa Hadrura, que se enviaron a secuenciar y se observó que también había una señal doble durante los primeros veinte aminoácidos, que posteriormente desaparecía, de haber sido un contaminante este no hubiera desaparecido súbitamente. Al observar con detalle la secuencia y con el antecedente de las fosfolipasas heterodiméricas encontradas en el alacrán *Pandinus imperator*, se hicieron los experimentos adecuados para confirmar que era una fosfolipasa heterodimérica, es decir la muestra se redujo y alquiló y se envió a secuenciar.

La secuencia se alineó de esta forma 47 aminoácidos para la cadena larga y 21 aminoácidos para la cadena pequeña. Se habían logrado determinar los amino terminales La muestra **Fosfolipasa Hadrura**, se envió a secuenciar y se obtuvo, de manera directa lo siguiente:

	5	10	15	20	25	30	35	40	47
TVLGT	KWCGA	GNEAA	WYSD	LGYFY	NVDRCC	REHDH	CDNIP	ATDYET	
1	5			21					
STSNE	CPNGV	AEYTGE	TGLGA						

Figura 13 Secuencia directa del componente fosfolipasa Hadrura..

Esta resaltado el aminoácido 24, que fue la primera diferencia encontrada entre las fosfolipasas Azteca y Hadrura.

Tirosina Y para la fosfolipasa hadrura.y asparagina N para la fosfolipasa azteca.

Con el fin de elucidar la secuencia del componente **fosfolipasa Azteca**, se procedió al rompimiento enzimático.

5.10 Digestión enzimática.

a) Fosfolipasa Azteca.

Digestión con Lys-C y reducción con DTT.

Se digirieron aproximadamente 8 μg del componente fosfolipasa azteca con enzima Lys-C y tras el rompimiento del péptido, éste se redujo con ditioneitol e inmediatamente se purificó en HPLC con columna analítica C_{18} de fase reversa en un gradiente de 0-60% de acetonitrilo con una sensibilidad e 0.2 con un flujo de 1 mililitro por minuto.

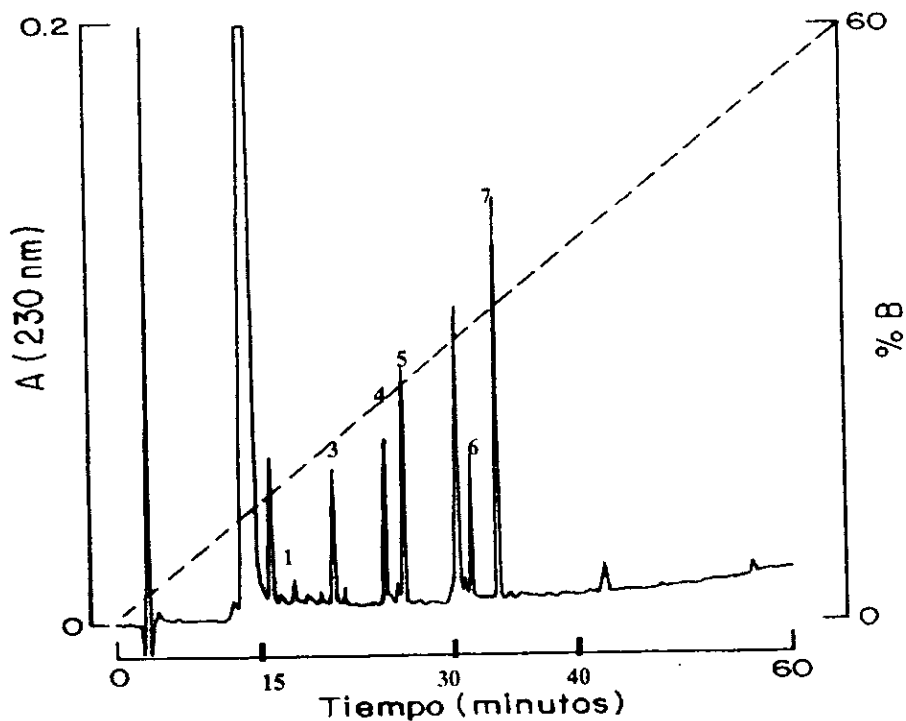


Figura 14 Cromatograma de la digestión de **Fosfolipasa Azteca**, tras el rompimiento enzimático con Lys-C y reducción con DTT. Cromatografía de alta presión en fase líquida con columna C_{18} analítica de fase reversa.

Secuencias obtenidas de los péptidos puros del componente fosfolipasa azteca, tras la digestión con la enzima Lys-C

1	Lys-C	15.7	AFD
2	Lys-C	15.82	AVSAV
3	Lys-C	19.36	TVLGT
4	Lys-C	23.80	NEGTY TMMNC
5	Lys-C	25.44	STSNE CPNGV AEYTG E
6	Lys-C	30.35	WCGAGNEAAWYSDLG
7	Lys-C	31.66	FLSDI SGYFT R
8	Lys-C	34.05	FTYFTLYGNGCYNV

De la ruptura enzimática se obtuvieron los péptidos enumerados arriba.

El péptido 2 confirmó el amino terminal.

El péptido 3 es la cadena corta o subunidad pequeña.

Con ésta digestión se pudo comprobar el amino terminal y se logró aislar el péptido corto, datos que se habían obtenido de la secuencia directa. Con ello confirmamos que se trataba de una fosfolipasa heterodimérica.

5.10 Digestión enzimática.

b) Fosfolipasa Hadrura

Con el fin de elucidar la secuencia del componente fosfolipasa Hadrura, se procedió al rompimiento proteolítico o enzimático.

Digestión con enzima V_8

Se digirieron 20 μg del componente fosfolipasa hadrura y una vez terminada la reacción se redujo con DTT, e inmediatamente, la muestra se purificó por HPLC con columna C_{18} analítica de fase reversa con una gradiente de 0-60% de acetonitrilo, con una sensibilidad de 0.5, y un flujo de 1 ml por minuto.

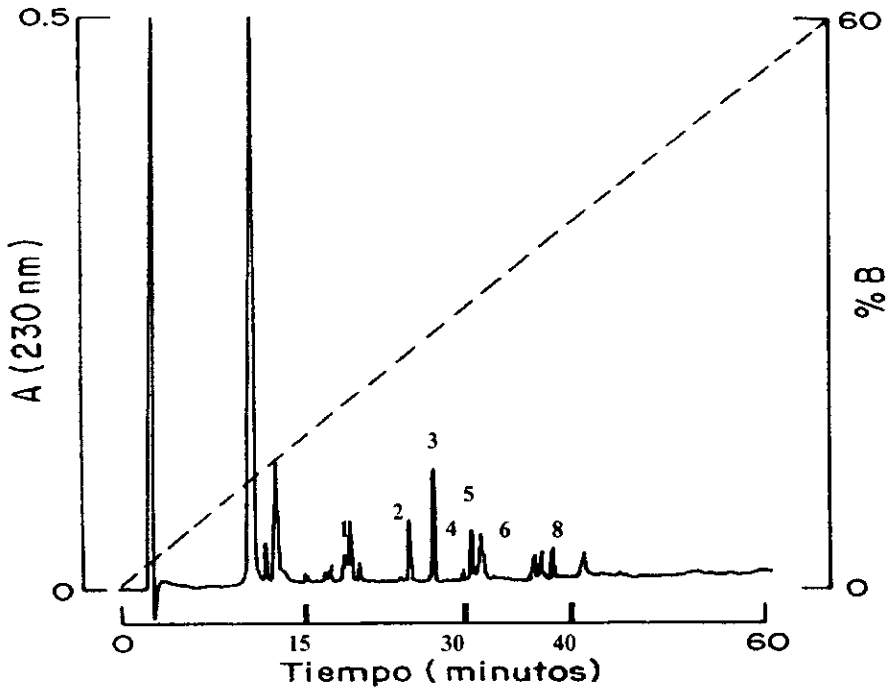


Figura 15. Cromatograma de la digestión de la fosfolipasa hadrura, tras la digestión con enzima V_8 y reducción con DTT. Cromatografía de alta presión en fase líquida con columna C_{18} analítica de fase reversa.

Peptidos de la digestión con V₈.

Fosfolipasa hadrura

Después de la digestión con proteasa V₈ de *Staphylococcus aureus*, al ser secuenciados los componentes colectados, se obtuvieron los siguientes péptidos. A continuación se enlistan:

- | | | |
|-------------------|-------|---------------------------------|
| 1. V ₈ | 14.67 | TKYGL KNE |
| 2. V ₈ | 25.23 | GTYTM MNC |
| 3. V ₈ | 27.26 | TVLGT KWC GAGN (amino terminal) |
| 4. V ₈ | 29.94 | TGL |
| 5. V ₈ | 30.24 | LGYF |
| 6. V ₈ | 31.60 | AAWYSDLGYFYND R |
| 7. V ₈ | 36.21 | KAFDK CLSDI AG |
| 8. V ₈ | 37.84 | NGCYN VK |

De la ruptura enzimática se obtuvieron los péptidos enumerados arriba.

El péptido 1 confirma el amino terminal.

Con la digestión, se pudo comprobar el amino terminal, dato que se había obtenido de la secuencia directa. Con ello confirmamos que, en efecto, ese era el amino terminal.

Por homología de secuencia con la imperotoxina Iptxi de *Pandinus imperator* se fueron acomodando los péptidos encontrados.

Digestión con Lys-C

Fosfolipasa Hadrura

Digestión con Lyc-C y reducción con DTT.

Se digirieron aproximadamente 28 µg del componente fosfolipasa hadrura con enzima Lys-C y tras el rompimiento del péptido, éste se redujo con ditioneitol e inmediatamente se purificó en HPLC con columna analítica C₁₈ de fase reversa en un gradiente de 0-60% de acetonitrilo con una sensibilidad e 0.2 con un flujo de 1 mililitro por minuto.

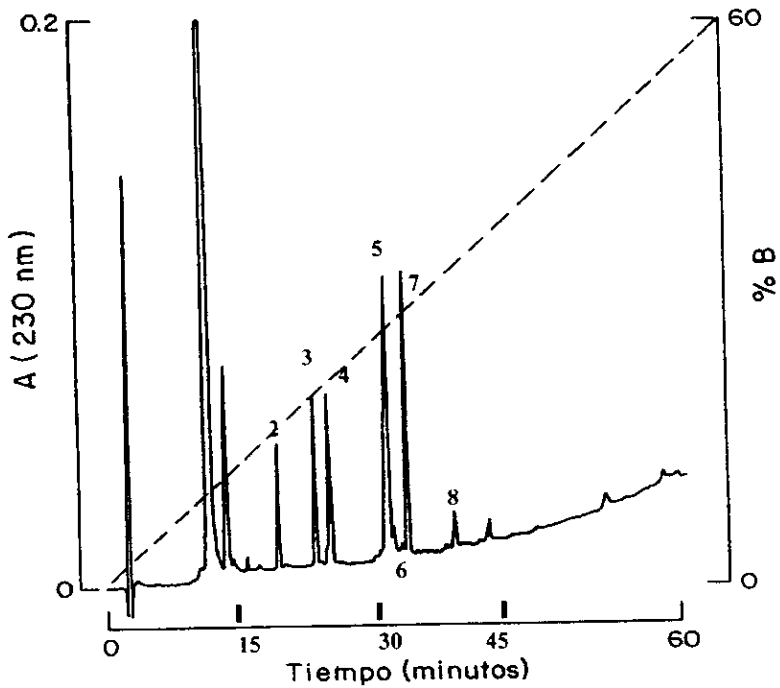


Figura 16 Cromatograma de la purificación del componente fosfolipasa hadrura, por HPLC tras digestión con Lys-C y reducción con ditiotretiol.

Secuencia obtenida de los péptidos puros del componente fosfolipasa hadrura tras la digestión con la enzima Lys-C

- | | |
|-----------------|-----------------------|
| 1. Lys-C 16 | AFD |
| 2. Lys-C 19.62 | TVLGT |
| 3. Lys-C 23.89 | NEGTY TMMNC |
| 4. Lys-C 25.42 | STSNECPNGVAEYTGETGLGA |
| | (subunidad pequeña) |
| 5. Lys-C 31.87 | WCGAG NEAAW YSDLG |
| 6. Lys-C 32.54 | TPGAEN |
| 7. Lys-C 33..58 | FTYFT LYENG CYNV |
| 8. Lys-C 39.44 | FLSDI |

De la ruptura enzimática se obtuvieron los péptidos anteriores.

El péptido dos es la cadena pequeña, es aquí donde se confirma el amino terminal de la cadena pequeña, que por secuencia directa era una señal doble.

Las digestiones hechas con la enzima Lys-C en ambas fracciones, ésto es fosfolipasa hadrura y fosfolipasa azteca muestran un patrón de digestión muy parecido. Al efectuarse la secuenciación de los péptidos se encontró que la fosfolipasa azteca presentaba un péptido que no estaba presente en la fosfolipasa hadrura, que resultó ser la región diferente entre ambas fosfolipasas (señalado con una flecha). La cadena pequeña de las dos fosfolipasas heterodiméricas es igual, por secuencia, ésto confirma lo hallado por secuencia directa de los componentes.

A continuación se presentan los cromatogramas de la digestión con Lys-C y se señala la región diferente con una flecha.

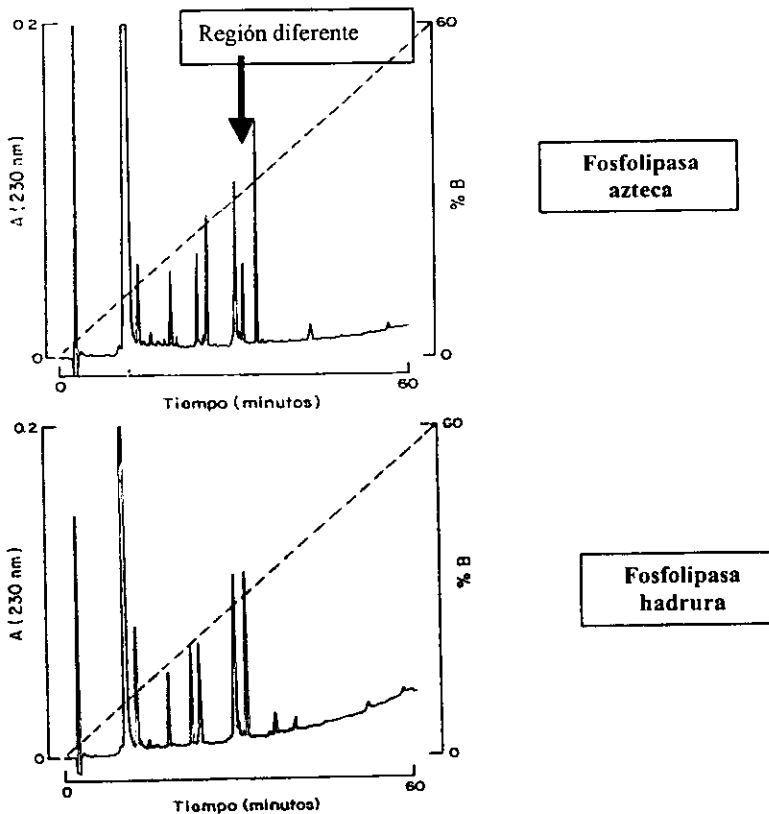


Figura 17 Comparación de las digestiones hechas con Lys-C en ambas fosfolipasas.

5.11 Superposición de péptidos obtenidos por rupturas proteolíticas.

a) Componente 9

1.-Fosfolipasa-azteca

Azteca

Encuadrados los péptidos correspondientes a la digestión con Lys-C.

:-----: Fragmento obtenido por secuencia directa.

Unidad larga: 104 aa.

5 10 15 20 25 30 35 40 46 52

TVLGT K WCGA GNEAA WYSDLGYFN VDRCC REHDH CDNIP AGETDYE TKYGL

POR SECUENCIA DIRECTA

60 65 70 75 80 90 104

K NEGTYTMM NC KCE KAFD K FLSDISGYE TR K AVSAV KFTYFTLYGNGCYNVK

5 10 15 20

STSNE CPNGV AEYTG E TGL GA

POR SECUENCIA DIRECTA

Lys-C

Los péptidos fueron acomodados haciendo homología con la secuencia de la fosfolipasa heterodimérica Iptxi, aislada del veneno del alacrán *Pandinus imperator*.

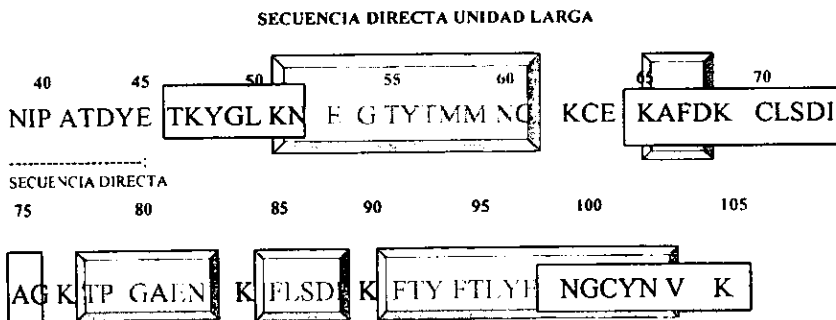
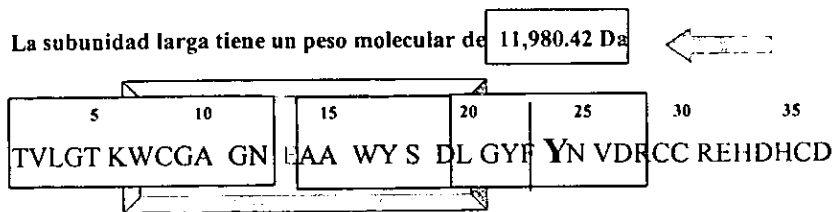
5.11 Superposición de péptidos obtenidos por rupturas proteolíticas.

b) Componente 12

2.-Fosfolipasa Hadrura

La fosfolipasa Hadrura es una proteína heterodimérica de doble cadena. Se presenta la secuencia de la proteína armada con los péptidos obtenidos de las digestiones con las enzimas V8 y con Lys-C.

Unidad larga de 105 aa .



Subunidad pequeña con 21 aminoácidos tiene un peso molecular de **2,057.13 Da** ←

5 10 15 21
STSNE CPNGV AEYTG E TGL G A

Secuencia directa subunidad pequeña

Superposición de péptidos

De **V8** y **Lys-C**

El peso molecular para esta fosfolipasa es de 14, 827 Da es decir la suma del peso molecular de la cadena larga y de la cadena pequeña.

5.12 Determinación del peso molecular

por espectroscopia de masas E.M.

Las muestras se enviaron a analizar en equipo Termo Finnigan LCQ-DUO electro spray sin embargo, los resultados obtenidos nos indicaban que la muestra era muy grande y que podría estar contaminada debido a las múltiples cargas que eran observadas.

Se optó por enviar las muestras para su análisis, a la Universidad de Oklahoma ya que cuentan con equipo MALDI-TOF cuyas siglas significan (Matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight).

a) Muestra Fosfolipasa Hadrura

1 50
 TVLGTRKCGA GNEAAWYSDL GYFYNVDRCC REHDHCDNIP ATDYETKYGL
 70 80 105
 KNEGTYTMMN CKCEKAFDKC LSDIAGKTPG AENKFLSDIK FTYFTLYENG CYNVK
 Subunidad larga 105 aa

1 21
 STSNE CPNGV AEYTG ETGLG A

Subunidad corta 21 aa

Se logra determinar lo siguiente:

Del análisis de masas por MALDI-TOF se logra descubrir que la muestra fosfolipasa Hadrura, es una población de cuatro isoformas, diferentes en todas ellas. **Espectro II-E**

Con un peso molecular promedio de 14, 637.00 Da.

(4 ISOFORMAS) **Espectro II-E**

15207.23	±58.3		
15148.84	G		
		±162.3	}
15044.40	±57.88		
14986.52	G		}
		±146.2	
14897.9	±57.69		}
14840.2	G		
		±203.42	}
14694.4	±57.54		
14636.8	G		349

Las isoformas son modificadas por los siguientes valores : +203, +146 y +162, datos obtenidos del análisis de los **Espectros II-F Y II-G**. Los valores coinciden con azúcares, es decir las diferencias entre las isoformas son debido a azúcares. Se presume sean glicosilaciones.

162.3	Hexosa(fructuosa, galactosa, glucosa, manosa.
146.27	Deoxihexosa (fructuosa, rh.)
203.42	N acetilhexosamina (N acetil galactosa, N acetil glucosa)

Después de la reducción del componente fosfolipasa hadrura con Ditiotreitol, las cadenas de la fosfolipasa heterodimérica se separan y se observan dos péptidos en la cadena chica o subunidad pequeña reducida de masas: 2631 m/z y 2657m/z., lo que lleva a considerar dos isoformas en esta subunidad pequeña, la diferencia entre ellos dos puede ser de un sólo aminoácido, pues la diferencia es de sólo 26 unidades.

Espectro V-E.

La subunidad larga de la fosfolipasa hadrura tiene una masa teórica de 11, 981.00, o una masa iónica teórica promedio de 11,981.00 Da, de acuerdo al Programa de Cálculo de Masas de Péptidos Expasy. Este valor concuerda de manera muy similar con el valor de masa experimental **11,982.90 Da** (para la MH+ ión) que fue determinado por espectrometría de masas de acuerdo al **Espectro III C**, de tal manera que, la diferencia entre la masa teórica y la experimental está dentro del rango de error experimental del equipo MALDI-TOF en que fue determinado.

Con respecto a la cadena pequeña, al hacer el cálculo de la masa hipotética encontrada por secuencia en este trabajo con el Programa de Cálculo de Masas de Péptidos Expasy, tenemos un valor de 2,057.13 Da.

En donde **2, 657.6** y **2, 631.6** son los valores experimentales determinados por MALDI-TOF para las dos isoformas de la subunidad pequeña **Espectro V-E** y 2057.13 Da. es el valor teórico obtenido en ésta tesis. Se postula que algunos aminoácidos faltan, por ello la discrepancia.

Al efectuar la suma de la masa de la subunidad larga obtenida por secuencia con las masas experimentales obtenidas por MALDI-TOF de las subunidades pequeñas se tiene lo siguiente

$$11,983 + 2657.6 = 14,640.6 \rightarrow 14,639.6 \text{ Da}$$

$$11,983 + 2631.6 = 14,614.6 \rightarrow 14,613.6 \text{ Da}$$

que de acuerdo con MALDI-TOF, son valores que se encuentran dentro del rango de error para el equipo MALDI-TOF DE 0.02% y 0.07% de las masas observadas para el componente hadrura sin reducir **Espectro II-D**. Se concluye que la masa del péptido sin reducir es consistente con las masas de las subunidades vistas después de la reducción.

a) Fosfolipasa Azteca

1		50
	TVLGTKWCGA GNEAAWYSDL GYFNNVDRCC REHDHCDNIP ATDYETKYGL	
	70 80	104
	KNEGTYTMMN CKCEKAPDK FLSDISGYFTR KAVSAVK FTYTYLYGNG CYNVK	

Subunidad larga 104 aa

1		21
	STSNECPNG VAEYTGETGLGA	

Subunidad pequeña 21 aa.

Se logra determinar lo siguiente:

Del análisis de masas del componente fosfolipasa azteca se sabe, constituye una población de cuatro isoformas, aparentemente la cadena larga es diferente en todas ellas.

El peso molecular promedio de las cuatro ISOFORMAS es de 14, 708 Da de masa promedio.

15277.97	57.78		} 511	4 Isoformas Espectro I-A
15220.19	+G	≠162.3		
15116.51	-58.7			
15057.81	+G			
		≠146.2	} 349	
14968.84	57.3			
14911.54	G			
		≠203.42		
14766.03	57.9			
14708.11	+G			

Las isoformas son modificadas por los siguientes valores : 203, 146 y 162, datos obtenidos del análisis de los **Espectros I-F**. Los valores coinciden con azúcares, es decir las diferencias entre las isoformas son debido a azúcares. Se presume sean glicosilaciones.

- 1) 162 hexosa
(furanosa, galactosa, glucosa, manosa)
- 2) 146 deoxihexosa (fuc., rha)
- 3) 203 N acetil hexosamina. (N Ac. galactosamina,
Ac. Glucosamina)

Después de la reducción con Ditiotreitól se separan las dos cadenas y se observa un péptido en la cadena chica o subunidad pequeña reducida de masa 2, 657m/z, lo que lleva a considerar sólo una isoforma en la subunidad pequeña. **Espectro VI-B**

Con respecto a la subunidad larga de la fosfolipasa Azteca, tiene una masa teórica de 11, 827.22 Da o (una masa iónica teórica promedio de 11,827.00 Da de acuerdo al Programa de Cálculo de Masas de Péptidos **Expasy**, que al comparar con los valores determinados por MALDI-TOF, el valor de masa experimental más aproximado es de 12,055.38 Da para la MH⁺ ión, de acuerdo al **Espectro IV-F**, la diferencia entre la masa teórica y la experimental es debida seguramente a la falta de algún aminoácido en la secuencia.

Con respecto a la cadena pequeña encontrada en este trabajo para la fosfolipasa hadrura, la masa hipotética de la secuencia determinada de acuerdo al Programa de Cálculo de Masas de Péptidos **Expasy**, es de 2,057.13 Da.

De acuerdo a MALDI-TOF no esta completa la masa hipotética de la secuencia obtenida ya que existe esta diferencia

$$2657.6 - 2057.13 = 600.47 \text{ Da.}$$

En donde 2, 657.6 es el valor experimental determinado por MALDI-TOF para la subunidad pequeña **Espectro VI-B** y 2057.13 Da es el valor teórico obtenido en ésta tesis. Se postula que algunos aminoácidos faltan, por ello la discrepancia.

Al efectuar la suma de la masa de la subunidad larga obtenida por secuencia con las masas experimentales obtenidas por MALDI-TOF de la subunidad pequeña se tiene lo siguiente:

$$11, 827 + 2657.6 = 14, 416.6 \rightarrow \mathbf{14, 715 \text{ Da}}$$

que de acuerdo con el análisis de MALDI-TOF, son valores que se encuentran dentro del rango promedio de las masas observadas para la fosfolipasa azteca sin reducir **Espectro I-A**. Se concluye que la masa del péptido sin reducir es consistente con las masas de las subunidades vistas después de la reducción.

5.12.1 Conclusión del análisis por espectrometría de masas.

Se tienen dos familias de fosfolipasas heterodiméricas, cada una constituye una familia conformada por cuatro isoformas, una llamada azteca y otra llamada hadrura.

Se puede decir que entre ellas también son isoformas.

La cadena larga tiene modificaciones postraduccionales.

Los cambios se encuentran en las cadenas largas.

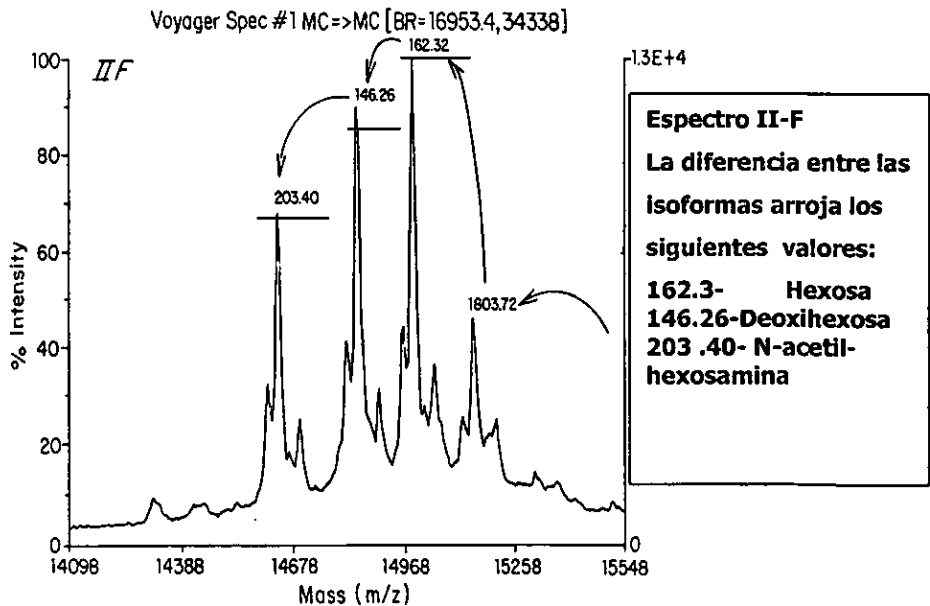
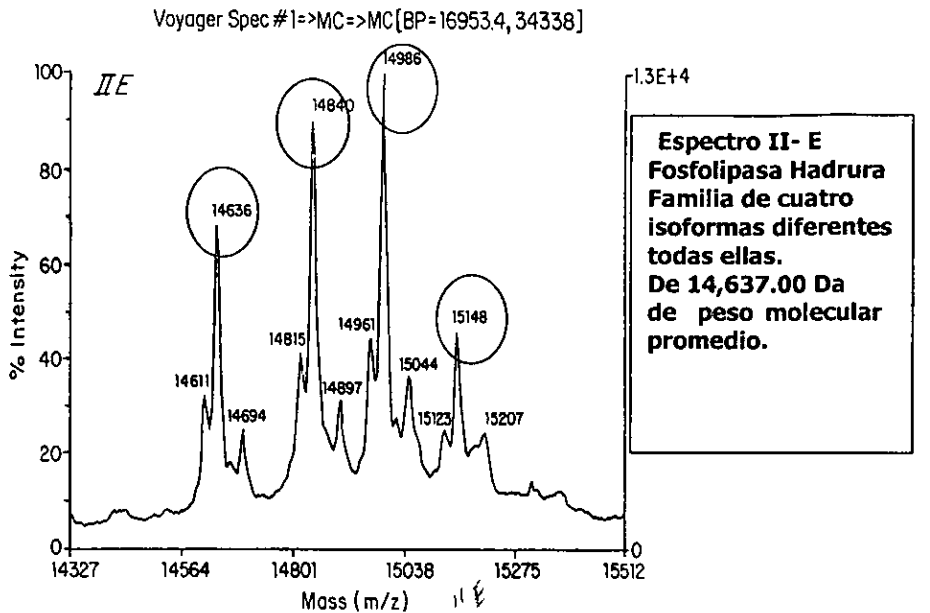
Las cadenas pequeñas son iguales en la fosfolipasa azteca.

Existen dos isoformas de la cadena pequeña en la fosfolipasa hadrura.

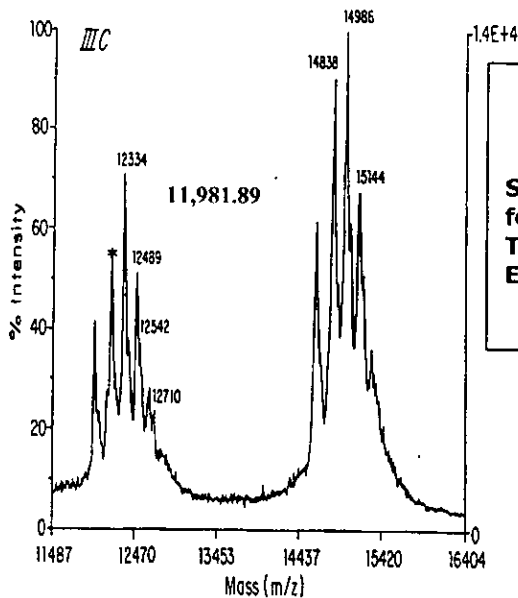
Las cadenas pequeñas de las dos familias de fosfolipasas son iguales.

Se propone la existencia de glicosilaciones, y que las variaciones entre las isoformas se deben a la presencia de azúcares.

5.12.2 Espectros del Análisis de Masas por MALDI-TOF.



Voyager Spec#1->MC[BP=2663.1, 39009]

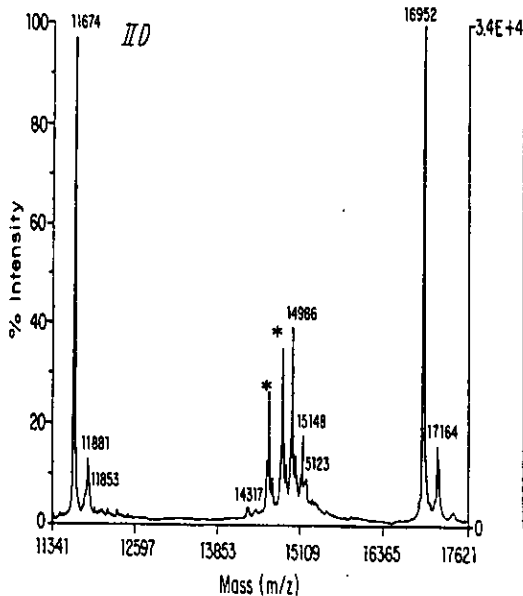
**Espectro III-C**

Subunidad larga de
fosfolipasa hadrura

Teórico = 11,981.00 Da

Exp. = 11,981.89 Da

Voyager Spec#1->MC->MC[BP=16953.4, 34338]

**Espectro II-D**

Al efectuar la suma de la masa de la subunidad larga obtenida por secuencia con las masas experimentales obtenidas por MALDI-TOF de las subunidades pequeñas se tiene lo siguiente:

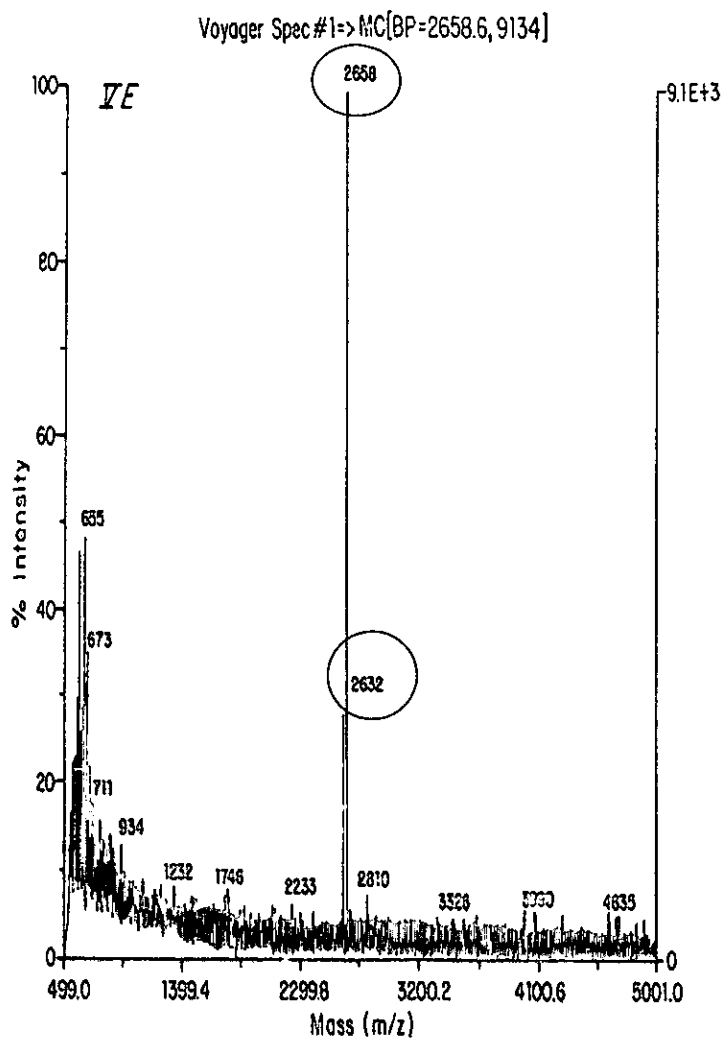
$11,983 + 2657.0 = 14,640.0$ Da

* $14,639.0$ Da

$11,983 + 2631.6 = 14,614.6$ Da

* $14,613.6$ Da

de acuerdo con MALDI-TOF, son valores consistentes con las masas observadas en los péptidos sin reducir.



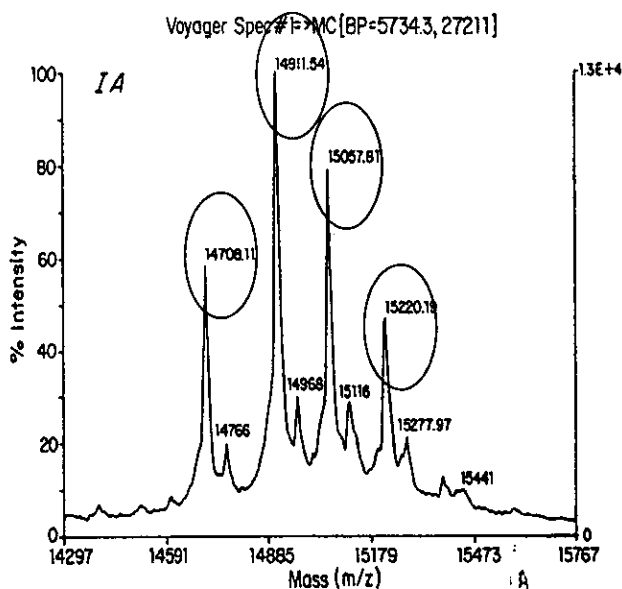
Espectro V-E

Después de la reducción de la fosfolipasa hadrura, s observan dos péptidos que consideramos son las cadena pequeñas. Sus masas son:

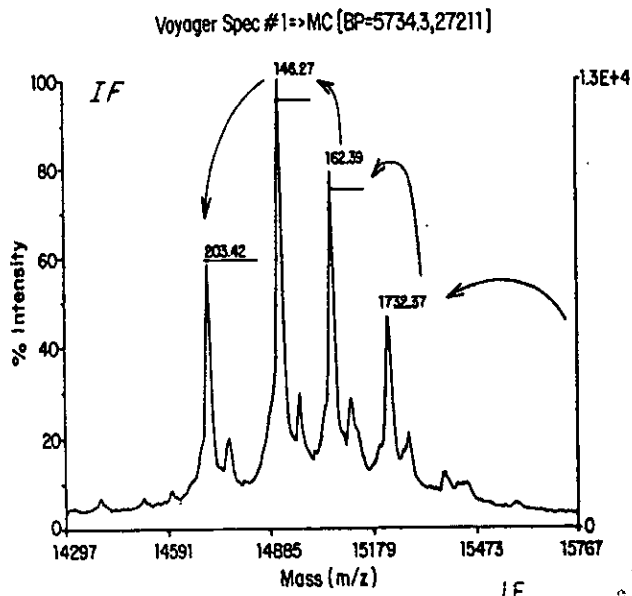
2631m/z

2657m/z

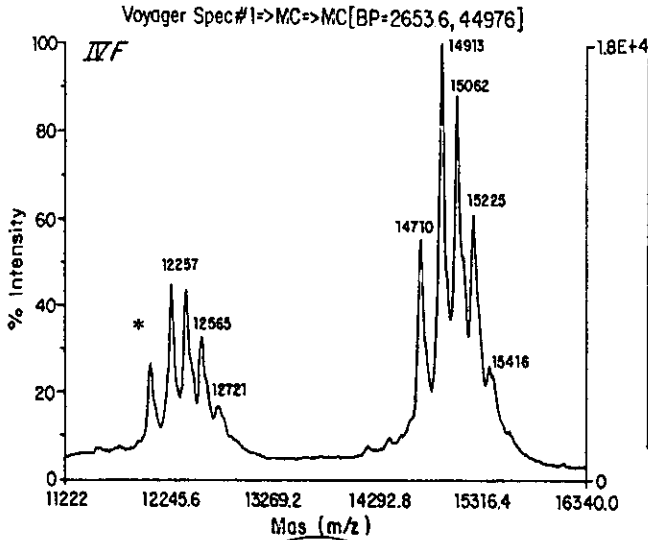
La masa obtenida por secuencia no esta completa.



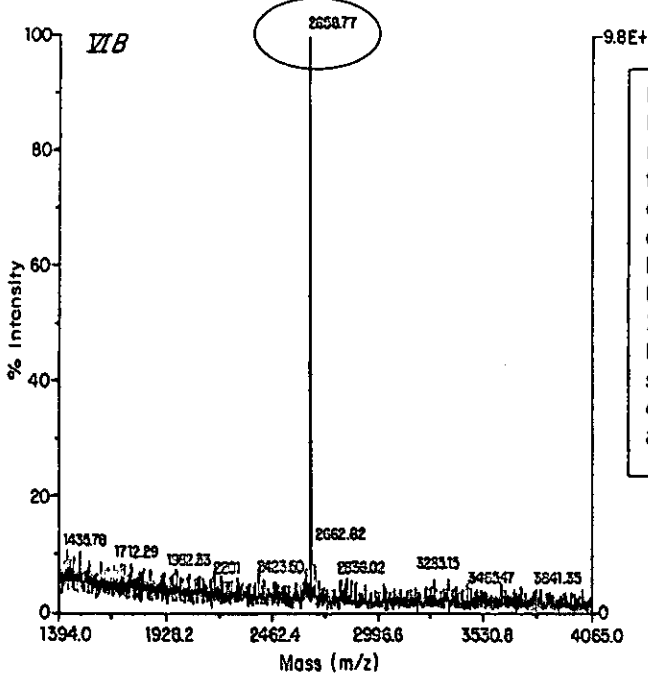
Espectro I-A
Fosfolipasa Azteca
Familia de cuatro
isoformas diferentes
todas ellas.
De peso molecular
promedio de
14,708.00 Da



Espectro I-F
La diferencia entre
las isoformas arrojan
los siguientes
valores:
162.3- Hexosa
146.26-Deoxihexosa
203.40- N-acetil-
hexosamina



Espectro IV-F
MALDI-TOF arroja un valor de *12,055.37 Da y el valor teórico obtenido por secuencia de la subunidad larga es de 11, 827.0 Da. Se especula falte algún aminoácido o algún carbohidrato.



Espectro VI-B
Después de la reducción de la fosfolipasa Azteca, se observan un péptido que consideramos es la cadena pequeña. De masa : 2657m/z. La masa obtenida por secuencia no esta completa, hacen falta aminoácidos.

5.13Alineamiento de secuencias reportadas en la literatura con las encontradas en este trabajo, exclusivamente la subunidad grande mediante el programa FASTA(Wisconsin package versión 10.1, Genetics Computer Group (GCG) Madison , Wisc.) .

El hacer la comparación de las secuencias de fosfolipas encontradas en este trabajo con las encontradas en otros animales, y reportadas en la literatura, nos permite descubrir que tan parecidas son sus estructuras primarias.

1	50	51	100		
PA22_BOTAS	-----SL PELGDMIL.Q	ETGKNPAKSY GAYG...CN	CGVLG.RGPK KDAT.....DRCQVVEKCC	YK...KLTCG.....NPKKD...RYSYSW.	
PA2H_AKPI	-----SV LELGDMIL.Q	ETGKNATSY GSYG...CN	CG.WGRGQP KDAT.....DRCQVVEKCC	YK...KHTDC.....NPKTD...RYSYSW.	
PA2B_TRIMU	-----SL ISLGRMIF.Q	ETGDMPVQNY GLYL...CN	CGV.GNRGKP VDAT.....DRCQVVEKCC	YK...KVTG...DPKKD...RYSYSF.	
PA22_BITNA	-----DL TOPGRMIN.K	M.GQ.SVDPY IYYG...CY	CG.WGGGKP RDAT.....DRCQVVEKCC	YG...KMGTY...DTKWT...SVYKFP.	
PA2_BITGA	-----DL TOPGRMIN.K	M.GQ.SVDPY IYYG...CY	CG.WGGGKP IDAT.....DRCQVVEKCC	YG...KMGTY...DTKWT...SYNYEI.	
PA21_VIPAA	-----NL PQPARMIN.G	KLGAFSVMY ISYG...CY	CG.WGGGTP KDAT.....DRCQVVEKCC	YG...RVRG...NPKLA...IYSYSF.	
PA22_VIPAZ	-----NL PQPARMIN.G	KLGAFSVMY ISYG...CY	CG.WGGGTP KDAT.....DRCQVVEKCC	YG...RVRG...NPKLA...IYSYSF.	
PA2_VIPBZ	-----NL PQGRMIN.H	MVKGHVMYS LSYG...CY	CG.WGGGKP QDAT.....DRCQVVEKCC	YG...RANGC...DPKLS...TYSYMF.	
PA21_VIPAZ	-----NL PQGRMIN.Q	KTGRVAVSHY AIYG...CY	CG.WGGGRR QDAT.....DRCQVVEKCC	YG...RVNDC...NPKNA...TYSYSF.	
PA21_ERIMA	-----NL YQGRMIF.K	MTGKSALLSY SDYG...CY	CG.WGGGKP LDAT.....DRCQVVEKCC	YG...RVNCG...NPKTA...TYSYSF.	
PA22_CERCA	-----NL YQGRMIF.K	MTGKSALLSY SDYG...CY	CG.WGGGTP VDAT.....DRCQVVEKCC	YG...RVNCS...NPKRS...TYSYSF.	
PA22_ERIMA	-----NL YQGRMIS.K	MTGKPLFSY VYVG...CY	CG.WGGGKP LDAT.....DRCQVVEKCC	YG...RVNCG...NPKLS...TYSYSF.	
PA22_BITCA	-----NL YQGRMIS.A	MTGKSSL.AY ASYG...CY	CG.WGGGQP KDDT.....DRCQVVEKCC	YG...KADIC...SPKMI...LYSYKF.	
PA21_TRIGA	-----HL WQFETLM.K	VAGRSQWVY GSYG...CF	CG.AGGGRP QDAS.....DRCQVVEKCC	YG...KVNCG...DPKKD...PTYYSF.	
PA22_AKHA	-----SL WQFETLM.K	VAGRSQWVY GSYG...CF	CG.AGGGRP QDAS.....DRCQVVEKCC	YG...KVTG...DPKLD...VITYYE.	
PA21_AKHP	-----SL WQFETLM.K	VAGRSQWVY SNYG...CF	CG.WGGGQP QDAT.....DRCQVVEKCC	YG...KVTG...DPKND...VYSFBE.	
PA2_CROAD	-----SL WQFETLM.K	VAGRSQWVY SNYG...CF	CG.WGGGQP QDAT.....DRCQVVEKCC	YG...KVTG...DPKTV...SVTYSF.	
PA21_AKHA	-----HL LQPRMIF.K	MTGKRPVSY APYG...CY	CG.SGGGKP KDAT.....DRCQVVEKCC	YE...KVTG...KPKMD...DVTYSW.	
PA2X_TRIPAL	-----HL LQPRMIF.K	MTGKRPVSY APYG...CY	CG.KGGGKP KDAT.....DRCQVVEKCC	YE...KVTG...DPKMS...VITYSL.	
PA21_BOTAS	-----SL IEPARMIL.E	ETRLRPPVY TTYG...CY	CG.WGGGQP KDAT.....DRCQVVEKCC	YG...KLSNC...KPKTD...RYSYSR.	
PA2N_CROS	-----HL LQPRMIF.K	ETRENAIPPY APYG...CY	CG.WGGGQP KDAT.....DRCQVVEKCC	YG...KLAIC...NPKND...IYPSYL.	
PA22_OXYSC	-----NL YQGRMIEA	IRNRFPALDF MYG...CY	CG.K.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YABAEN.HGC...YPSL...GTYTWS.	
PA2C_PSPFO	-----NL YQGRMIEA	IPGSGPLLDY AMYG...CY	CG.GNNGTP VDDV.....DRCQVVEKCC	YDRAEN.HGC...YFEL...TLNYYI.	
PA22_NOTSC	-----NL WQFYLQGA	MKGRASLHY MDYG...CY	CGA.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.GC...FFDM...SAYDYY.	
PA2_ENHSC	-----NL WQFYSVTA	MKRRASLDY ADYG...CY	CGA.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.GC...YPMK...LMDYYI.	
PA21_LATSE	-----NL WQFYLQGA	MKGRASLHY ADYG...CY	CGA.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.GC...YFEL...TMNYYI.	
PA2H_LATCO	-----NL YQPSOLIG	NEKGRPLHY MDYG...CY	CGP.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YQDAEK.GC...SFLS...TMNYYI.	
PA20_PSBAD	-----NL YQPSNIOGA	MKGRASLHY ADYG...CY	CGW.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDQAEK.GC...FFPK...TLYSWD.	
PA2A_PSBFO	-----NL YQPSNIOGA	MKGRASLHY VAYG...CY	CGW.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDQAEK.GC...FFPK...TLYSWK.	
PA21_NOTSC	-----NL YQPSNIOGA	MKGRASLHY ADYG...CY	CGA.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.GC...TPYM...TLYSWD.	
PA21_OXYSC	-----NL LQPGFMIR	IRNRSPVHY MYG...CY	CGK.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.GC...APYM...TLYSWD.	
PA2A_PSBTE	-----NL WQFYSVTA	NYKRPVHY AMYG...CY	CGS.GSGTTP VDDV.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...YPMK...TYMYYI.	
PA23_OXYSC	SELPPQSPID	YQPSNIOGA	YPCGSRECLAY MDYG...CY	CGP.GSGTTP IDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.
PA2D_PSBTE	ASIPRPSLNI	MLPGRMIF	YPCGSRECLAY LDYG...CY	CGS.GSGTTP VDDV.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.
PA22_PIG	-----AL WQPSNIOGA	IPGSGPLLDY MYG...CY	CGL.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA2_SHEEP	-----NL WQPSNIOGA	IPGSGPLLDY MYG...CY	CGL.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA2_HORSE	-----ENGISPRAV	WQPSNIOGA	IPGSGPLLDY MYG...CY	CGL.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.
PA22_NAJNO	-----NL YQPSNIOGA	VP.SRPMWHP ADYG...CY	CGR.GGKGA VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA23_NAJNO	-----NL YQPSNIOGA	VP.SRPMWHP ADYG...CY	CGR.GGKGA VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA2_NAJPA	-----NL YQPSNIOGA	VP.SRPMWHP ADYG...CY	CGR.GGKGA VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA22_NAJRA	-----NL YQPSNIOGA	VP.NRSWDF ADYG...CY	CGR.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA2_NAJNA	-----NL YQPSNIOGA	VP.NRSWDF ADYG...CY	CGR.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA21_NAJOX	-----NL YQPSNIOGA	VP.NRSWDF ADYG...CY	CGR.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA22_NAJME	-----NL YQPSNIOGA	VP.NRSWDF ADYG...CY	CGR.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA21_HEMIA	-----NL YQPSNIOGA	VP.SRPMWHP ADYG...CY	CGR.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA22_ASPFC	-----NL YQPSNIOGA	VP.SRPMWHP ADYG...CY	CGY.GSGTTP VDEL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA2X_BUNPA	-----NL YQPSNIOGA	AC.TRLVAVY VNYG...CY	CGK.GSGTTP VDDL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA21_BURMU	-----NL INPKMIRY	TPCETWVSY ADYG...CY	CGA.GSGRP IDAL.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA2H_XENLA	-----TP AQDFEMIKV	TIYGLAN SDYG...CH	CG.LNNQMP VDDI.....DRCQVVEKCC	YDRAEK.LGC...SVLSEPN...NDTYSYE.	
PA2-melan1	-----GI TVPGTK.W	-----GI TVPGTK.W	-----GI TVPGTK.W	-----GI TVPGTK.W	
PA2-melan2	-----SI TVPGTK.W	-----SI TVPGTK.W	-----SI TVPGTK.W	-----SI TVPGTK.W	
PA2_APIME	-----GSLFLLLS	YSHGWIDR	ICDNLEKRI	IYPTGL.W	
apimescott	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	
apiscerana	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	
PA2Apidor	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	
apimeBambu	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	-----I IYPTGL.W	
PA2RHO	-----GLIKPGL.W	-----GLIKPGL.W	-----GLIKPGL.W	-----GLIKPGL.W	
P1	-----TMWTK.W	-----TMWTK.W	-----TMWTK.W	-----TMWTK.W	
PA2HGU	-----TVLGTK.W	-----TVLGTK.W	-----TVLGTK.W	-----TVLGTK.W	
PA22_HELBU	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	
PA2_HELBO	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	
PA23_HELBU	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	-----GAP IMPGTL.W	
PA2Homoesp	-----MPGTL.W	-----MPGTL.W	-----MPGTL.W	-----MPGTL.W	
P3	-----FL MBWTK.W	-----FL MBWTK.W	-----FL MBWTK.W	-----FL MBWTK.W	

Resultados :- PA2 Hadrura y PA2 Azteca las fosfolipas encontradas en este trabajo.

El alineamiento es sólo de la cadena grande. Resaltado también el patrón de cisteína C conservado, los: a.a involucrados en el sitio de catálisis, y el sitio putativo de acomplejamiento con calcio.

	101		150		151		199
PA22_BOTAS	K. DKTI. VEG	E. NN. SCLKH	LCB. EDKAVA	ICLRENLNTY	.NKKYRY Y L	KPLG. .KKAD	AD-----
PA2H_AGKPI	K. NKAI. ICR	E. KN. PLELE	WCB. EDKAVA	ICLRENLNTY	.NKKYRY Y P	KLKJ. .KKPD	TU-----
PA2B_TRIMU	E. NKAI. VEG	E. KN. PLELE	WCB. EDKAVA	ICLRENLNTY	.NKKYRY Y V	KPLC. .KAPB	SU-----
PA22_BITNA	Q. DGGI. DG.	.GDNDPOKKE	LCE. HDRVAA	ICPANNRNTY	.NSKYPOY. S	SSKQ. TE. TE	QU-----
PA22_BITGA	Q. NGGI. DG.	.DEDDPOKKE	LCE. HDRVAA	ICPANNRNTY	.NSKYPOH. S	SSKQ. TO. TE	QU-----
PA21_VIPAA	K. KGNL. VC.	.GDNDQCLRD	ICE. HDRVAA	ICPANNRNTY	.NKYKPL. S	SSRQ. ROTSE	QH-----
PA22_VIPAZ	K. KGNL. VC.	.GKNDQCLRD	ICE. HDRVAA	ICPANNRNTY	.NKYRFX. S	SSRF. ROTSE	QH-----
PA2_VIPBZ	Q. NGNI. VM	.GNKYCLRH	IFB. HDRVAA	ICPANNRNTY	.NKYKRY. S	SSNF. ORNSN	KM-----
PA21_VIPAZ	E. NGDI. VC.	.GDNDLCLRA	VCE. HDRAAA	ICLGHENVTY	.DKNYEY. S	ISHE. TEBSE	QH-----
PA21_VIPAA	E. NGDI. VC.	.GDNDLCLRA	VCE. HDRAAA	ICLGHENVTY	.DKNYEY. S	ISHE. TEBSE	QH-----
PA21_VIPAA	E. NGDI. VC.	.GDNDLCLRA	VCE. HDRAAA	ICLGHENVTY	.DKNYEY. S	ISHE. TEBSE	QH-----
PA22_CERCB	Q. NGGI. VJ.	.DDNDLCLRA	VCE. HDRVAA	ICPANNRNTY	.DKKYKDY. P	TSQC. T. ETE	QU-----
PA22_ERIHA	Q. NGDI. VJ.	.DDEEDCLRD	VCE. HDRVAA	ICPANNRNTY	.NKYKVLV. S	FKEC. N. ESD	QH-----
PA22_BITCA	H. KGNL. VJ.	.GDNDQKRRK	VCE. HDRVAA	ICPANNRNTY	.NKYKVLV. S	SSKQ. TGTAR	KJ-----
PA21_TRIGA	E. NSAI. VEG	.GDDP. HKKB	ICE. HDRDAA	ICPANNRNTY	.DKNYWFP. P	AKNF. QZBSE	PH-----
PA22_AGHGA	E. NSAI. VEG	.GDDP. HKKB	ICE. HDRDAA	ICPANNRNTY	.DKNYWFP. P	AKNF. QZBSE	PH-----
PA22_AGKHP	E. NSAI. VEG	.GDDP. HKKB	ICE. HDRDAA	ICPANNRNTY	.DKNYWFP. P	AKNF. QZBSE	PH-----
PA22_CROAD	E. NSAI. VEG	.GDDP. HKKB	ICE. HDRDAA	ICPANNRNTY	.DKNYWFP. P	AKNF. QZBSE	PH-----
PA21_AGHGA	X. NGDI. VEG	.GDDP. HKKB	ICE. HDRDAA	ICPANNRNTY	.DKNYWFP. P	AKNF. QZBSE	PH-----
PA2X_TRIFL	E. NGDI. VEG	.G. DDPYTKV	KCB. HDRDAA	ICPANNRNTY	.K. KRYMAY. P	DITP. TDPTB	GH-----
PA22_BOTAS	K. SGVL. ICG	.SGT. .PBRKO	ICE. HDRDAA	ICPANNRNTY	.K. KRYMAY. P	DILC. KKPAB	NJ-----
PA2H_CROSA	K. SGVL. TJC	.XGT. .WCBRO	ICE. HDRDAA	ICPANNRNTY	.K. YGYMPY. P	DSRQ. RQPSB	TH-----
PA22_OXVCE	R. QVG. PYJ.	.NSK. TQCEVP	VIA. HDRDAA	ICPANNRNTY	.DY. NPAHNS	INT	GBRFX-----
PA2C_PIBPO	. .DTGVPHY.	.KAR. TQCEVP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .TY	NDEHNO	ICP	GERFO-----
PA22_HOTGC	G. ENG. PTKR	.NIK. KKLRF	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KBKJQ-----
PA22_ERIHA	G. SNG. PYCR	.NVK. KKRKR	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KERKQ-----
PA23_LATSE	G. TGS. PTKD	.D. K. TGCORV	VIA. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	SEKFX-----
PA2H_LATCO	P. PGG. POCQ	. .KGTTCORP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KRFX-----
PA20_PBIAN	T. GNV. PTD.	.NFK. SKKIDP	VIA. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA2A_PBEFO	T. GNV. PTD.	.NSK. SGGKIDP	VIA. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA21_HOTCC	I. EKT. PTH.	.DSK. TGCORP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA21_OXVCE	Y. OKA. PTH.	.NFK. TGCORP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA2A_PSETE	G. ANG. PYCK	T. .RTKIDRP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA23_OXVCE	N. BQGLT. CN	.DDMS. EKAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA2D_PSETE	N. BQGLT. CN	.DDMS. EKAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA22_PIG	S. NTBIT. CN	.SKNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA2_SHEEP	S. NKQIT. CN	.SENN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA2_HORSE	S. GTEVT. KS	.GDNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA22_NAJMO	S. QGKLT. ES	.GDNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA23_NAJNG	S. QGKLT. ES	.GDNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA2_NAJPA	S. QGTLT. EK	.GDNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA22_NAJKA	S. QGTLT. EK	.GDNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA2_NAJNA	S. QGTLT. EK	.GDNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA21_NAJOX	S. QGTLT. EK	.GDNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA22_NAJMI	. .QGTLSGJ.	.GANN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA21_HDHPA	T. EGKLT. EK	.BGNN. ACEAP	VJG. HDLAVA	KILLAGA. .PY	NPAHNS	INT	KTRFX-----
PA22_ASPBC	S. QGKLT. H.	.SGNDQKAAAP	VJG. HDRVAA	ICPANNRNTY	.PY	ICDNYG. VDL	MDRQ-----
PA2K_BURFU	N. KPNLT. IFR	.DAKGT. HIRP	VJG. HDRVAA	ICPANNRNTY	.PY	HLGNFG. IJK	KTRFX-----
PA2H_XBNLA	T. KRTI. IFR	.GAGT. HIRI	VJG. HDRVAA	ICPANNRNTY	.DY	IEGHGN. IKT	ARJQ-----
PA2-melan1	TEQQPFINL	Q. .AVNSI	FAKT.	LG	RIV. .VGS.	RSCPCANGHP	TTOQXQYQCG
PA2-mel CG	MESAFRNL	Q. .ALRNG	HSLA.	LG	RIV. .PNT.	KVCPGYGHP	IVGQKQKQAD
PA2_APIME	DEDDKPYDHL	KN. .SADTI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	VTOHJ. ER. .
apime-scott	DEDDKPYDHL	KN. .SADTI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	VTOHJ. ER. .
Apioacerana	DEDDKPYDHL	KN. .SGBKI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	VTOHJ. ER. .
PA2Apiodor	DEDDKPYDHL	KN. .SSDTI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	VTOHJ. ER. .
ApimeBomb	EQDBEPHJL	HN. .SGDAV	SAAP.	VG	RTY. .PTIL	GTOCFRLDYP	IVNFKVES. .
AP2Rhono							
P1	KREAFBQEL	RNVTCMBGP	AAGP.	VR	KTY.	FDLY	GNOCYNOCP
PA2Medra	KREAFBQEL	SDIAGKTPG	ABNKFLSDIK	PTY	PTLY	ENOCYNVK	
PA2Medra	KREAFBQEL	SDIAGKTPG	ABNKFLSDIK	PTY	PTLY	ENOCYNVK	
PA22_HELJU	DEDDKPYDHL	KN. .SADTI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	DEGJVDNI. .
PA2_HELJO	DEDDKPYDHL	KN. .SADTI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	DEGJVDNI. .
PA22_HELJU	DEDDKPYDHL	KN. .SADTI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	DEGJVDNI. .
PA22_HELJU	DEDDKPYDHL	KN. .SADTI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	DEGJVDNI. .
PA2Hococap	DEDDKPYDHL	KN. .SADTI	SSYP.	VG	EMY. .FNLI	DTKCYLEHP	DEGJVDNI. .
P3	KREAFBQEL	TRAYKKEBE	SAKESTKRLQ	NFY.	PQTY	SFBCY.	VVTGNS-----

Se observa el patrón de cistinas C, conservado.

Bibliografía de la alineación

1. **PAZ2-BOTAS**: Homólogo de FLA2, myotoxin II de *Bothrops asper*. (Francis, B. et al. 1991);
2. **PAZ2-AGKPI** FLA2 de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. (Welches, W. et al., 1993);
3. **PAZ2-VIPAA** Mancheva, I., Kleinschmidt, T., Aleksiev, B. and Braunitzer, G. 29.33% identidad. Sequence homology between phospholipase and its inhibitor in snake venom. The primary structure of the inhibitor of vipoxin from the venom of the Bulgarian viper (*Vipera ammodytes ammodytes*, Serpentes) Hoppe-Seyler's Z. (1984) *Physiol. Chem.* 365 (8), 885-894
4. **PAZ2-VPAZ**: FLA2, cadena B de *Vipera aspis zinnikeri*. (Komori, Y. et al., 1996);
5. **PAZ2-VPAZ** FLA2, cadena A de *Vipera aspis zinnikeri*. (Komori, Y., et al., 1996);
6. **PAZ2-VIPPA** FLA2, precursor Ácido de *Vipera ammodytes ammodytes*. (Pungercar, J.
7. **PAZ2-ERIMA**: FLA2 isoenzima pla-1 de *Eristocophis macmahonii*. (Siddiqi, A.R., et al., 1991)
8. **PAZ2-ERIMA** FLA2 isoenzima de *Eristocophis macmahonii*. (Siddiqi, A.R. et al., 1991)
9. **PAZ2-TRIGA** phospholipase a2 isozyme i precursor (138 aa) 27.957% identidad Nakashima, k., Nobuhisa, i., et al., (1995) Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (12), 5605-5609
10. **PAZ2-AGKHA**: FLA2, cadena acidica *Gloydius halys blomhoffi*. (Tomoo, K. et al., 1989);
11. **PAZ2-AGKHP** FLA2 acidica de *Gloydius halys pallas*. (Chen, Y.C. et al., 1987);
12. **PAZ2-BOTAS**: FLA2 (myotoxin I) de *Bothrops asper*. (Kaiser, I.I. et al., 1990);
13. **PAZ2-OXYSC** Fosfolipasa A2 homóloga a la beta taipoxina (118 a.a) 28.947% identidad Lind, P. et al., (1982) Amino-acid sequence of the beta 1 isosubunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*) *Eur. J. Biochem.* 128 (1), 71-75
14. **PAZ2-PSEFO** 29.688% identidad (residues 1 to 118) Pearson, J.A., Tyler, M.L., Retson, K.V. and Howden, M.E. (1993). Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). The complete amino-acid sequences of all the subunits *Biochim. Biophys. Acta* 1161 (2-3), 223-229
15. **PAZ2-notsc** FLA2 (notexin) de *Notechis scutatus scutatus*. (Halpert, J. and Eaker, 1975)
16. **PAZ2-LNHSC** phospholipase a2 (myotoxin) (TOXIN VI:5) (119 aa) 27.586% Identidad
Amino acid sequence of a lethal myotoxic phospholipase A2 from the venom of the common sea snake *Enhydrina schistosa* (1981) *Toxicon* 19 (1), 11-24
17. **PAZ2-LNSE** PHOSPHOLIPASE A2 ISOZYME III (PHOSPHATIDYL (118 aa) 26.53% identidad Nishida, S., Kim, H.S. and Tamiya, N. (1982). Amino acid sequences of three phospholipases A I, III and IV from the venom of the sea snake, *Laticauda semifasciata*. *Biochem. J.* 207:3, 589-594
18. **PAZ2-PSEAU** 30.66% identidad Takasaki, C., Yutani, F. and Kajiyashiki, T. (1990) Amino acid sequences of eight phospholipases A2 from the venom of Australian king brown snake, *Pseudechis australis* *Toxicon* 28 :3, 329-339
19. **PAZ2-PSEPO**: FLA2 (pseudexin A) de *Pseudechis porphyriacus*. Schmidt, J.J. and Middlebrook, J.

20. **FLA2**: FLA2 homóloga, notechis II-I de *Notechis scutatus scutatus* 1980
Lind, P. and Eaker, D.
21. **phospholipase A2** homolog, taipoxin beta ch (118 a.a.) **28.947% identidad** Lind, P. (1982) Amino-acid sequence of the beta 1 isosubunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake taipan, *Oxyuranus s. Scutellatus*. *Eur. J. Biochem.* **128** (1), 71-75
22. **phospholipase A2** homolog, textilotoxin a c (118 aa) **27.027% identidad** Pearson, J.A., Tyler, M.I., Retson, K.V. and Howden, M.E. (1993) Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake, *Pseudonaja textilis* The complete amino-acid sequences of all the subunits *Biochim. Biophys. Acta* **1161** (2-3), 223-229
23. **Fosfolipasa A2** **28.986% identidad** Lind, P. and Eaker, D., (1982); Taipoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin Elucidation of the primary structure of the acidic carbohydrate-containing taipoxin-subunit, a phospholipase homolog. *Eur. J. Biochem.* **128** :71-75
24. **26.744% identidad.** Pearson, J.A., Tyler, M.I., Retson, K.V. and Howden, M.E. (1991) Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake, *Pseudonaja textilis*. The amino acid sequence and toxicity studies of subunit D. *Biochim. Biophys. Acta* **1077** (2), 147-150
25. **A2, 24.528% identidad** Puijk, W.C., Verheij, H.M., Wietzes, P. and de Haas, G.H. (1979) The amino acid sequence of the phospholipase A2 isoenzyme from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* **580** (2), 411-415
26. **25.000% identidad** The primary structure and some kinetic properties of phospholipase A2 from sheep pancreas (1988) *Journal Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **107**, 203-207
27. **Phospholipase A2 ISOZYME 27.586% identidad** 118aa Joubert, F.J., (1977) Purification, some properties and the amino acid sequences of three phospholipases A (CM-I, CM-II and CM-III) *Naja mossambica mossambica* venom. *Biochim. Biophys. Acta* **493** (1), 216-227
28. **28.736% identidad** Phospholipase A2 isozyme III phosphatidyl Walter, R. and Meiehofer, J. (Eds.) (1975) Structure and function of snake venom toxins peptides: chemistry, structure and function *J. Ann Arbor Science, Ann Arbor*: 17-30;
29. **Phospholipase A2 33.333% identidad** Chwetzoff, S., Tsunasawa, S., Sakiyama, F. and Menez, A. (1989) Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties *J. Biol. Chem.* **264** (22), 13289-13297
30. **Phospholipase a2 isozyme cm-ii (phosphatid) 29.293% identidad** Joubert, F.J. and Taljaard, N., (1980) Purification, some properties and amino-acid sequences of two phospholipases A (CM-II and CM-III) from *Naja naja kaouthia* venom *Eur. J. Biochem.* **112** (3), 493-499
31. **A2, 28.283% identidad** (Joubert, F.J. et al.,) (1990) Amino acid sequence and circular dichroism of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom acidic phospholipase A2 *Biochim. Biophys. Acta* **1037** (1), 7-15
32. **Phospholipase A2 27.16% identidad** Ovchinniko, V., Y.A., Miroshniko, V., A.I., and Soldatova, L.N. (1979) Complete amino acid sequence

of phospholipase A2 (isozyme E3) from the venom of middle Asian cobra *Naja naja oxiana* *Bioorg. Khim.* 5, 805-813

33. **PA22NAJME** PHOSPHOLIPASE A2 ISOZYME DE-II (PHOSPHATID (119 aa) **32.000% identidad** Joubert, F.J. (1975).The amino acid sequence of phospholipase A, fractions DE-I and DE-II *Biochim. Biophys. Acta* 379 (2), 345-359
34. **PA21HEMHA** Phospholipase a **26.316% identidad** Joubert,F.J. (1975)*Hemachatus haemachatus* (Ringhals) venom. Purification, some properties and amino-acid sequence of phospholipase A (fraction DE-I) *Eur. J. Biochem.* 52 (3), 539-544
35. **PA22ASPSG**: FLA2 isoenzima CM-II de *Aspidelaps scutatus*.(Joubert, F.J. , 1987);
36. **PA2X HUNFA** (118 aa) **28.395%** (1988) Phospholipase A2 Isozyme x, basic (phospha identity)The complete amino-acid sequence of a basic phospholipase A2 in the venom of *Bungarus fasciatus* *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369 (11), 1227-1233 ; (1994) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 33 (1), 187-194
37. **PA21HUNMI** cadena AI de la beta bungarotoxina de *Bungarus multicinctus*. (Kondo, K. *et al.*, 1978);
38. **PA2Drosophila melanogaster** **45.238% identidad** 1 (residues 1 to 186) Adams,M.D., Celniker,S.E., Direct Submission Submitted (21-MAR-2000) Celera Genomics, 45 West Gude Drive, The genome sequence of *Drosophila melanogaster* *Science* 287 (5461), 2185-2195 (2000) 2 (residues 1 to 186)Adams,M.D., Celniker,S.E., Gibbs,R.A., Rubin,G.M. and Venter,C.J.
39. **PA2melanogaste** CG1672 **43.158% identidad** 1 (residues 1 to 173) Adams,M.D., Celniker, S.E., and Holt, R.A., (2000) Genome sequence of *Drosophila melanogaster* *Science* 287 (5461), 2185-2195 (residues 1 to 173) Submitted (21-MAR-2000) Celera Genomics, 45 West Gude Drive, Rockville, MD, USA
40. **PA2ASIME-PI-SPRO-FAS-2-PRECURSOR** (PHOSPHATIDYLCHO (162 aa) **34.314% identity** Phospholipase A [*Apis mellifera*] **32.353% identidad** Scott, D.L., *et al.*,(1989) Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur. J. Biochem.* 184 (1), 249-254
41. **Abismes of the**Phospholipase A2 **34.314% identidad** Otwinowski, Z., Gelb, M.H. and Sigler,P.B. (1990) Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue *Science* 250 (4987), 1563-1566
42. **Amiceana** **34.314% identidad** Direct Submission Submitted (14-NOV-2000) Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, 268 Kaixuan Road, Hangzhou, China, Hangzhou, Zhejiang 310029, China
43. **Ami D. de** **32.353% identidad** Hoffman,D.R. and Schmidt,J.O. (?-JUL-1999) Protein Sequence Database
44. **Amismenombis** Phospholipase A2 **34.314% identidad** Scott,D.L., Otwinowski,Z., Gelb,M.H. and Sigler,P.B. (1990) Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue *Science* 250 (4987), 1563-1566
45. **Amimre** FOSFOLIPASA A2 **61.8% identidad** (Zamudio, Z.F.,*et al.*),(1997)

46. [REDACTED] y [REDACTED] La presente tesis
47. [REDACTED] PHOSPHOLIPASE A2 ISOZYMES PA2/PA4(142 aa)
37.864% **identidad** Differences in primary structure among five phospholipases A2 from *Heloderma suspectum* *Eur. J. Biochem.* 196 (3), 537-544 (1991)
48. [REDACTED] PHOSPHATIDYLCHOLINE 2-ACY (39 aa) 63.636% **identidad** Sosa, B.P., Alagon, A.C., Martin, B.M. and Possani, L.D. (1986)
Biochemical characterization of the phospholipase A2 purified from the venom of the Mexican beaded lizard (*Heloderma horridum horridum*Wiegmann)*Biochemistry* 25 (10), 2927-2933
49. [REDACTED] PA3A/PA3B/PA5 (143 aa) 39.806% **identidad**
50. [REDACTED] group III secreted phospholipase A2 36.538% **identidad** NCBI Annotation Project.Direct Submission Submitted (17-APR-2001) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. On Apr 16, 2001 this sequence version replaced gi:11417984.
51. [REDACTED] Conde, Renaud *et al.*,(1999)
52. [REDACTED] TOXIC PHOSPHOLIPASE A2 (PHOSPHATIDYLCHOLIN (fragmento)
53.846% **identidad** Delivery of a nematocyst toxin. (1995) Lotan, A., Fishman, L. *et al.*, *Nature* 375 (6531), 456.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

5.14 Comparación y homología de secuencias con fosfolipasas reportadas del grupo III.

La alineación es exclusivamente con las fosfolipasas del grupo III, y permite ver la homología de secuencia de estas fosfolipasas, con las fosfolipasas encontradas en el presente trabajo del veneno del alacrán alacrán *Hadrurus aztecus*. A continuación se presenta la alineación de secuencia de aminoácidos de la subunidad larga de las fosfolipasas PA2 Hadrura y PA2 Azteca con las PLA₂ fosfolipasas del grupo III.

	1				50
1 PA2Hadrú	NVLGTRK.WQ.	.GA.GNEAAW	YSDLGYFYNV	DRCCREHDHQ	DNIPA TDYETK YGLK
2 PA2Aztec	TVLGTRK WC	GA GNEAAW	YSDLGYFNNV	DRCCREHDHQ	DNIPAGETDYETK YGLK
3 Apimo	I IYPGTL.WQ.	.GH.GNKSSG	PNELGRFKHT	DACCRTDHDQ	PDVMS.AG.ESK. HGLT
4 P3 hel	HGAFIMPRTL.WQ.	.GA.GNEASD	YSQLGTEKDT	DMCCRDHDHQ	ENWIS.AL.EYK. HGMR
5 Iptxi	TMWGTRK.WQ.	.GS.GNEATD	ISELVYMSNG	DSQCRTHDRQ	DNIQS.G..QTK. YGLT
6 P3	FLMWEETK.WQ.	.GP.GFNAAK	ESDLGPL.EA	DKCCRTDHRQ	DYIA. SG.ETK..YGIT
7 PA2Homo	MPGTL.WQ.	.GV.GDSAGN	SSELGVFQGP	DLCCREHDHQ	PQNIS.PL.QYN..YGIR
	60			90	100
1 Hadru	NEGTYTMMN	CKCEKAFDKQL	SDIAGKTPG.	AENKFLS.DI	RFTY..FTLY ENGRY
2 Aztec	NEGTYTMMN	CKCEKAFDKFL	SDISGYFTR	KAVSAV	KFTY FTLY GNGGY
3 Api	NTASHTRLS	KDCKDKFYDQL	KN...SADTI	SSYP...VG	KMY...FNLI DTKDY
4 P23helo	NYPSTISH	EDCDNQFRSCL	MKLDG...	TADY...VG	QTY...FNVL KIPKF
5 Iptxi	NEGTYTMMN	CKCETAPEQCL	RNVTGGMEGP	AAGF...VR	KTY...FDLY GNGGY
6 P3	NYAFFTKLN	CKCEBAFDRCL	TEAYNKBEKE	SAKSSTKRLQ	NFY...FGTY SPEGY
7 Pa2homo	NYRFHTISH	EDCDTRFOOCL	QNQHDS....	ISDI...VG	VAF...FNVL EIPKF
	105			140	
1 Hadru	NVK-	-----	-----	-----	-----
2 Aztec	NVK	-----	-----	-----	-----
3 Api	KLEHP.VTG	DG.ER. TEGR.	CLHYT VDKSKPKVYQ	WFDLRKY	-----
4 P23helo	ELEEG..EG	LVDWN..FNLECTESKI	MPVAKLVSA	PYQAQAEQTS	GEGR-----
5 Iptxi	NVQCP.SQ	-----	-----	-----	-----
6 P3VVT	CNS-----	-----	-----	-----
7 Pa2homo	VLEEQ..EA	EVAVY-----	-----	-----	-----

Se encuentra resaltado lo siguiente: las cisteínas conservadas; el sitio de catálisis, en este caso el par histidina-aspártico, y el sitio putativo de unión a calcio. (Arni R.K., Ward R.J. 1996)

1 PA2(Hadrura) y 2 PA2 Azteca del alacrán *Hadrurus aztecus* ahora *Hadrurus gertschi*, fosfolipasas que se proponen en ésta tesis.

3 (Apismescot-Bee) fosfolipasa de abeja (Shipolini, R.A. *et al.*, 1982 a)

4 pa23-helsu: Mounstruo de Gila. FLA2, isoenzimas pa2/pa4 de *Heloderma suspectum*. (Vandermeers, A.*et al.*, 1991); FLA2 de *Heloderma horridum horridum*. (Sosa, B.P. *et al.*, 1986);

5 p1 fosfolipina del alacrán *Pandinus imperator* (Renaud, C. *et al.*, 1999)

6 p3 Imperatoxina I aislada del alacrán *Pandinus imperator* (Zamudio Z.F. *et al.*, 1997)

7 pa2homo clonada de pulmón de humano (Valentin, E., *et al.*, 2000)

5.15 Alineación con fosfolipasas de venenos de serpientes, sólo del fragmento del sitio de catálisis.

Este alineamiento se hace con la intención de mostrar que las fosfolipasas encontradas en este trabajo, además del par histidina-aspártico como sitio catalítico conservado, presenta conservada también el par conformado por los aminoácidos arginina-y aspártico (R. D.) que está presente en las fosfolipasas de venenos de serpientes que presentan múltiples isoformas, y que no esta presente en las fosfolipasas aisladas del veneno del alacrán *Pandinus imperator*. Sólo se muestra un fragmento de la proteína.

```

PA2_Hadru          TVLGTK.WCGAG.NE AAW YSDLGYFYNV DRCCREHDH
PA2_Aztec          .....TVLGTK WCGAG NE AAW YSDLGYFNNV DRCCREHDH
PA22_NAJME NL YQFKNMIQCT VP.NRSWWHF ANYGCV CGR.GGSGTP VDDLDRCCQIHDN
PA22_BOTAS SL FELGKMIL.Q ETGKNPAKSY GAYGCN CGVLG.RGKP KDATDRCCYVHKC
PA21_NOTSC NL VQFSNMIQCA NHGSRPSLAY ADYGCV CSA.GGSGTP VDELDRCCKTEDD
PA21_OXYSC NL LQFGFMIRCA NRRSRPVVWHY MDYGCV CGK.GGSGTP VDDLDRCCQVEDE
  
```

pa22-najme: FLA2 isoenzima de-II de *Naja melanoleuca*. (Joubert, F.J., 1975);
pa11-botas: FLA2 (myotoxin I) de *Bothrops asper*. (Kaiser, I.I. et al, 1990);

pa21-notsc: FLA2 homologa, notechis II-I de *Notechis scutatus scutatus* (Lind,P. and Eaker,D., 1980);
scutellatus (Lind,P. and Eaker,D.)

pa21-oxysc: FLA2, taipoxin cadena a de *Oxyuranus scutellatus*, Lind,P. and Eaker,D., (1982); *Eur. J. Biochem.* 128 (1), 71-75

Se encuentra resaltado lo siguiente: las cisteínas conservadas, el sitio de catálisis y el sitio putativo de unión a calcio. (Armi R.K., Ward R.J, et al. 1996)

5.16 Alineación con la fosfolipasa PA2 RHONO TOXIC.

Fosfolipasa tipo A₂ tóxica, aislada del tentáculo del organismo *Rhopilema nomadica* fosfolipasa, cuya secuencia presenta un 53.85% de identidad con la fosfolipasa hadrura encontrada en el presente trabajo. Comparten 12 aminoácidos idénticos en la misma posición. Sólo se muestran los fragmentos de las secuencias y el alineamiento está hecho únicamente con la cadena larga de la fosfolipasa Hadrura..

Nature 375(6531), 456 (1995)

```

          **  ***  * * *  *  **  *
PA2 Hadru  TVLGTK WCGAG NEAAW YSDLG YFYND DRCCREHDHCD.....
PA2 Rhono  GLIKPGTL WCGMG NNAET YDQLG FADVD  SCK
          10          20          30
  
```

Tejido=tentáculo de *Rhopilema nomadica*.

5.17 Subunidad pequeña o cadena pequeña

Se hizo el alineamiento de la cadena pequeña encontrada en las dos fosfolipasas de este trabajo, con las cadenas pequeñas de las dos fosfolipasas heterodiméricas aisladas del veneno del alacrán *Pandinus imperator*, ésto es con la fosfolipina y la imperatoxina i.

Después de añadir los espacios para alinear con el primer residuo de cisteína, se encuentra que existe alta identidad con la IpTx1 ya que comparten **14 aminoácidos** residuales idénticos en la misma posición

```

* *** *** ***** * **
----SSECPDGVVA TYTGEA HYGAWAINKLNG      .(IpTx1) 27aa
----STNECPNGVA EYTGET GLGA                Hadrura y Azteca
                                           subunidad pequeña
                                           21aa

```

Con la fosfolipina aislada del alacrán *Pandinus imperator* existe poca identidad ya que solamente, comparte **5 aminoácidos** residuales idénticos en la misma posición

```

* ****                                     fosfolipina Hadrura
----STNECPNGVA EYTGET GLGA                fragmento subunidad pequeña
-----DAGCENGVA TWKKS Y KD                fosfolipina

```

De la alineación de las cadenas pequeñas se puede observa una mayor homología con la imperatoxina (IpTx1).

También se hizo el alineamiento de la cadena pequeña con fosfolipasas reportadas en la literatura y se encontró que alineaba con las siguientes fosfolipasas, isoformas que constituyen una familia de neurotoxinas aisladas de veneno de la cobra de la India naja naja **nueve aminoácidos** idénticos en la misma posición.

```

** **** ** *
Fosf hadrura  STNECPNGVA EYTGET GLGA                21 aa
ANXLI  IRCFITPDIETKDCFPNCHVCEYTKIWCDAFCPSIRGRVLDLCAATCPTVKTGVDIQCCSTDDCDPPPTRKRP  71aa
CNAJN  IRCFITPDIETKDCFPNCHVCEYTKIWCDAFCPSIRGRVLDLCAATCPTVKTGVDIQCCSTDDCDPPPTRKRP  71aa
ENAJA  IRCFITPDIETKDCFPNCHVCEYTKIWCDAFCPSRRGERVLDLCAATCPTVKTGVDIQCCSTDDCDPPPTRKRP  71aa
BNAJA  IRCFITPDIETKDCFPNCHVCEYTKIWCDAFCPSRRGERVLDLCAATCPTVKTGVDIQCCSTDDCDPPPTRKRP  71aa
3NAJA  IRCFITPDIETKDCFPNCHVCEYTKIWCDAFCPSIRGRVLDLCAATCPTVKTGVDIQCCSTDNCNPPPTRKRP  71aa
DNAJA  IRCFITPDIETKDCFPNCHVCEYTKIWCDAFCRIRGERVLDLCAATCPTVKTGVDIQCCSTDDCDPPPTRKRP  71aa
1      10      20.....30.....40.....50.....60.....70

```

El patrón de cisteínas está conservado y en gris se resaltan los sitios que se alinean.

Con asterisco, los sitios alineados en posición idéntica.

Bibliografía del alineamiento con las fosfolipasas isoformas de la familia de neurotoxinas.

NXL1_NAJNA LONG NEUROTOXIN 1 (TOXIN A)

A Nakai,K., Sasaki,T. and Hayashi,K. (1971)

Amino acid sequence of toxin A from the venom of the Indian cobra(Naja naja)Biochem. Biophys. Res. Commun. 44 (4), 893-897

NAJNA LONG NEUROTOXIN 3 (TOXIN C)

C OHTA,M., SASAKI,T. and HAYASHI,K. (1981)

The primary structure of toxin C from the venom of the Indian cobra (Naja naja)Chem. Pharm. Bull. 29, 1458-1475

NXL5_NAJNA LONG NEUROTOXIN 5 (TOXIN E)

E Endo,T. and Tamiya,N. (1987)

Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms
Pharmacol. Ther. 34 (3), 403-451

NXL2_NAJNA LONG NEUROTOXIN 2 (TOXIN B)

B The primary structure of toxin B from the venom of the Indian cobra Naja naja
FEBS Lett. 72 (1), 161-166 (1976)

3 NXL1_NAJKA LONG NEUROTOXIN 1 (NEUROTOXIN 3)

Le Goas,R., LaPlante,S.R., Delsuc,M.A., Guittet,E.,

Robin,M., Charpentier,I. and Lallemand, J.Y. (1992)

Alpha-cobratoxin: proton NMR assignments and solution structure
Biochemistry 31 (20), 4867-4875

NXL4_NAJNA LONG NEUROTOXIN 4 (TOXIN D)

D Ohta, M., Sasaki, T. and Hayashi, K. (1981)

The amino acid sequence of toxin D isolated from the venom of Indian cobra (Naja naja)
Biochim. Biophys. Acta 671 (2), 123-128

VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

En este trabajo se describe el aislamiento y la caracterización de fosfolipasas que se encuentran en el veneno del alacrán *Hadrurus aztecus*, específicamente la fracción II. Se reportan dos fosfolipasas heterodiméricas, así como también, el amino terminal de cuatro componentes que parecen ser variantes en ésta región, con actividad fosfolipasa encontrados en el veneno.

A partir de la purificación del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* se lograron aislar dos componentes homogéneos con actividad fosfolipasa. Al determinar la estructura primaria de las proteínas se encontró que ambas eran fosfolipasas heterodiméricas.

Constituidas por dos cadenas de aminoácidos, unidas por puentes disulfuro.

Se logró obtener la secuencia de la cadena larga de la fosfolipasa hadrura que está constituida por 105 aminoácidos. y además se secuenciaron 21 aminoácidos de la subunidad pequeña.

Se secuenciaron 104 aminoácidos de la cadena larga de la fosfolipasa azteca, y además se secuenciaron 21 aminoácidos de la subunidad pequeña.

Las masas teóricas de la secuencias obtenidas en este trabajo para la fosfolipasa Hadrura concuerdan de manera muy similar, con la masa experimental determinada por MALDI. Se puede concluir que se logró elucidar una isoforma de la familia de fosfolipasas encontradas en la fosfolipasa hadrura y una isoforma de la familia de la fosfolipasa azteca.

Experimentalmente MALDI-TOF reporta un peso molecular promedio de 14, 637 Da para la familia de isoformas de la fosfolipasa Hadrura, en donde la cadena corta presenta dos masas promedio de ~2, 631 y 2 657 es decir dos isoformas.

Con respecto a la fosfolipasa Azteca se reporta un peso molecular promedio para la familia de isoformas de 14, 708 Da, en donde la cadena corta tiene una masa promedio de ~2,651 y sólo existe una isoforma.

Las masas teóricas determinadas en este trabajo están dentro del promedio de peso molecular reportado por MALDI-TOF.

También se descubrió que cada componente, constituye una familia de cuatro isoformas, que también son isoformas entre ellas mismas.

Los dos componentes aislados con actividad fosfolipasa, son familias de fosfolipasas, al parecer todas heterodiméricas.

En la fosfolipasa azteca la cadena larga de las cuatro isoformas presenta modificaciones postraduccionales. La cadena pequeña es idéntica en las cuatro isoformas.

En el componente fosfolipasa hadrura, la cadena larga de las cuatro isoformas presenta modificaciones postraduccionales. Existen dos isoformas en la cadena pequeña que presentan un delta o una diferencia de 25 unidades.

Los cambios se encuentran en la cadena larga en ambos componentes. Se propone la existencia de glicosilaciones y que las variantes se deban a la presencia de azúcares.

Al efectuar un alineamiento con las fosfolipasas tipo A₂ reportadas en la literatura, se observa que los sitios catalíticos están conservados, así como el patrón de cisteínas, lo que confirma su identidad de fosfolipasas. El peso molecular encontrado corresponde a lo reportado para fosfolipasas 14-18 kDa según (Dennis 1997; Lambeau y Lazdunski, 1999)

En el alineamiento se observó una mayor similitud con las fosfolipasas encontradas en abeja, abejorro, monstruo de Cuentas, fosfolipasa de humano, las reportadas de alacranes y con fosfolipasas de abejas, lo que confirma la pertenencia al grupo de fosfolipasas tipo A₂ del grupo III, que siguen el arquetipo de la fosfolipasa de abeja (*Apis Melifera*), lo que coincide con lo reportado en la literatura ya que todas ellas pertenecen al Grupo III según (Six, D.A. y Dennis, E.A 2000).

Al hacer el alineamiento se observa que la parte amino terminal se encuentra recortada en comparación con las demás fosfolipasas; serpientes, mamíferos e insectos; pero la parte carboxilo terminal se extiende, como en la fosfolipasa Imperatoxina i del alacrán *Pandinus imperator*.

Los aminoácidos que conforman el sitio catalítico están conservados, ésto es, la región del aminoácido 41-51 (-CCxxHDxC-), así como también el asa de unión a calcio Ca²⁺, también llamado "loop"; aunque en menor proporción; en la región del aminoácido número 10-14 (-W/YCGxG-); como lo señala (Scott et al., 1990b).

Debido a que también existe similitud con las fosfolipasas obtenidas a partir de venenos de diferentes serpientes y con algunas fosfolipasas de mamíferos e insectos, conlleva a pensar en una relación estructural constante de las fosfolipasas de las especies comparadas.

El descubrimiento de nuevas fosfolipasas que además presentan múltiples isoformas en el veneno de alacranes es totalmente nuevo, han sido reportadas isoformas en el veneno

de abejas y serpientes, pero no en alacranes, esto nos plantea muchas incógnitas y nos conduce necesariamente a profundizar nuestro conocimiento acerca de la estructura y función de estas enzimas. La presente tesis constituye un aporte al conocimiento de la presencia de isoformas en el veneno de alacranes.

En la homología de secuencia realizada entre fosfolipasas heterodiméricas de sólo las cadenas cortas de las fosfolipasas encontradas en la presente tesis, con sólo las cadenas cortas de las fosfolipasas neurotóxicas, también de múltiples isoformas aisladas del veneno de la cobra de la India *naja naja* se distinguieron nueve aminoácidos en idéntica posición, lo que resulta novedoso y constituye un precedente para posteriores estudios.

Es necesario determinar las modificaciones postraduccionales de las cadenas largas de las isoformas en la fosfolipasa azteca y en la hadrura, así como determinar el aminoácido diferente en las dos isoformas presentes en la cadena pequeña de la fosfolipasa hadrura..

Se propone la purificación de muestra del componente fosfolipasa Azteca y fosfolipasa Hadrura con el fin de:

a) Diseñar rompimientos proteolíticos inteligentes que por secuencia de aminoácidos, como por espectrometría de masas nos permita encontrar las diferencias entre las isoformas de la cadena larga.

En el caso de las cadenas pequeñas de la fosfolipasa hadrura el rompimiento con Lys -C y el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Dado que las fosfolipasas encontradas en el presente trabajo presentan

Alta identidad 61.8% en la cadena larga y 73.7% en la cadena pequeña con la fosfolipasa IpTxi aislada del alacrán *Pandinus imperator*, fosfolipasa reportada como inhibidora del pegado de la ryanodina al canal iónico sensible, cuya reacción se ve favorecida por concentraciones milimolares de calcio, se hace necesario continuar con los estudios para hacer la caracterización electrofisiológica de las fosfolipasas encontradas.

Debido a la homología de secuencia e identidad del 53.85% con la fosfolipasa aislada del tentáculo de *Rhopilema nomádica* altamente tóxica, es necesario hacer los ensayos

biológicos para una mejor caracterización de las fosfolipasas encontradas en este trabajo.

VIII.-Bibliografía

1. **Alagón, A.C., Guzmán, H.S., y col., (1988).** Aislamiento y caracterización de dos toxinas del alacrán mexicano *Centruroides limpidus limpidus*. Karsh. comp. *Biochem.Physiol.* 89B:153-161; (1988)
2. **Ali S.A., Stoeva S, Grossmann JG, Abbasi A, Voelter W. (2001).** Purification, characterization, and primary structure of four depressant insect-selective neurotoxin analogs from scorpion (*Buthus sindicus*) venom. *Arch Biochem Biophys* Jul 15;391(2):197-206
3. **Arni, R.K. and Ward, R.J (1996).** Phospholipase A₂-A structural review. *Toxicon*, 34: 8. 827-841.
4. **Balderas, A.C. (1988)** Aislamiento y caracterización de toxinas del veneno del alacrán de Morelos *Centruroides limpidus limpidus*.. Tesis de licenciatura. Escuela de Ciencias Biológicas..Universidad del Estado de Morelos.
5. **Balozet, L., (1971)** "Scorpionism in the old world", in venomous animals and their venoms. Eds.W. Bucherl and E. Bucherl and E. Buckley, E.E. Academic Press, New York. 317-347.
6. **Becerril, B., (1996).** Toxic peptides and genes encoding toxin γ of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochem. J.*, 313 : 753- 760. (Printed in Great Britain).
7. **Betzel, C., et al., 1999).**Review. Modulation of phospholipase A₂ activity generated by molecular evolution. *CMLS Cell Mol. Life. Sci.* 56 : 384-397
8. **Britannica enciclopediae (1994) Knowledge in Deeph.**
9. **Bücherl, W., (1971).** Classification, biology and venom extraction of scorpions. Pages 317-347. In: *Venomous animals and their Venoms. Volume 3. Venomous Invertebrates (W. Bücherl & E. E. Buckley, eds.). Academic, New York.*
10. **Bush, S.P., (2001).** Scorpion Envenomations from Emergency/Medicine/Environmental. *Medicine Journal* May 16 2 :5

11. Calderon-Aranda , Emma S., Riviere, Gilles; (1999) Pharmacokinetics of the toxic fraction of *Centruroides limpidus limpidus* venom in experimentally envenomed rabbits and effects of immunotherapy with specific F(ab₂). *Toxicon* 37:771-782
12. Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., Maelicke, A., (1982) Selective blockage of voltage-dependant potassium channels by a novel scorpion toxin. *Nature* (Lond) 296:90-91
13. Caterall, W.A., (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels, *Annu. Rev. P. Biochem.*, 55: 953-985.
14. Cevallos, M.A., Navarro, Duque, C., Varela-Julia M.A., Alagón A., (1992) Molecular Mass determination and assay of venom hialuronidases by sodium dodecylsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Toxicon* 30:925-930.
15. Clelands H., (1964). *Biochem.* 3,480.
16. Conde, R., F.Z. Zamudio, B. Becerril, L.D. Possani, (1999). Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom *FEBS Letters.* 460: 447-450(1999)
17. Cossio, V.R. Tesis (1993) Aislamiento y Caracterización de fosfolipasas del alacrán *Hadrurus concolourus*. Instituto de Ciencias Biomédicas.
18. Chatwal, 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.(1981).
19. Cupillard, L., Koumanov, K., Mattéi, M. G., Lazdunski, M., y Lambeau, G. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 15745-15752
20. Debin, J. A., Maggio, J.E., and Strichartz, G.R., (1993).Purification and characterization of choleroxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpions. *Am. J. Physiol. (Cell physiol. 33)* 264:361-369.
21. Dehesa-Dávila M., Ramírez A.N., Zamudio F.Z., y col. (1996). Comparación estructural y funcional de toxinas de veneno de los alacranes *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus*, y *Centruroides noxius*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 113B:331-339 (1996) Tomo 4:188-196.
ELSEVIER.

22. Dehesa-Dávila, M., and Possani, L. D. (1994). Scorpionism and Serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 32, No. 9 p.p. 1015-1018.
23. Dennis, E.A., The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes TIBS 22 January 1997. *Elsevier Science Ltd*.
24. Dent, M.A.E., Possani L.D. y col., (1980). Purificación y caracterización de dos toxinas tóxicas a mamíferos del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 18:343-350.(1980) Tomo 1:102-108.
25. *El Universal*, 30-Oct-2001. Andrés Romero Pérez, Jefe del Departamento de Vectores de la Secretaría de Salud de Nayarit (SSN).
26. **Enciclopedia Encarta 2000**
27. Ewin, H.E., (1928). Scorpions of the western part of the United States, with notes on those occurring in northern México. *Proceedings of the U.S. National Museum*, 73:1-24
28. Faroqui, A.A., Yang H.C., and Horrocks L., (1997) Involvement of phospholipase A₂ in neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 30:6 517-522.
29. Fernand, D., Lambeau G., Valentín. E., Lefebvre J.C., Lazdunski M., Doglio A., (1999). Secreted phospholipases A₂ a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J.Clin. Invest.* 104 (2346 -2353)
30. Fet, *et al.*, (2000) *Catalogue of the scorpions of the world (1758-1998)* The New York Entomological Society. ISBN 0913424242
31. Fuchs, S., *et al.* (1998), Neurogenic bladder dysfunction after scorpion sting. *Journal Biochimie et Biophysica Acta*. Reports and Abstracts PII:SOO41-0101(98)00019-1.
32. Glazer, A.N., Delange, R.G. and Sigman, D.S. (1975). Chemical Modification of proteins, in :Laboratory techniques in Biochemistry and molecular biology (Work T.S. and Work, E., eds.), North-Holland/American Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
33. Goodnigh, M.L. (1994) General zoology. *The New Enciclopedia Britannica, Macropaedia* vol. 13:869

34. Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., and Ziin-Justin, S. (1998) Neurotoxins that act on voltaje sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 15-43.
35. Gross, E. (1967). "The Cyanogen Bromide Reaction, " *Methods Enzimol.* 11, 238 . (1967).
36. Haberman, E., Horkkt K.L., (1972). *Anal. Biochem.* 50 pp. 163 (1972).
37. Hall, Z.W. (1992), Ion channels. In molecular Neurobiology. Ed Hall, Z.W. Sinauer Assoc. Inc. N.Y.
38. Hassan, F. 1984. Production of Scorpion Antivenom. Pages 577-605. In: Handbook of Natural Toxins. Volume 2. Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms (A. T. Tu, ed.). Marcel Dekker, Inc., New York.
39. Houmard, J., Drapeau G.R. (1972) "Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme specific for Glutamoyl Bonds", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3506 (1972).
40. Hutt, M.J., Houghton, (1998) A survey from the literature of plants used to treta scorpion stings. *Journal of Ethnopharmacology* 60 97-110. ELSEVIER.
41. Ismail, M. and ABD-Elsalam, A.(1988) Are the toxicological effects of the scorpion envenoming related to tissue venom concentration? *Toxicon* 26, 233-256.
42. Ismail, M., O. H. Osman, K. A. Gumaa, and M. A. Karrar. 1974. Some pharmacological studies with scorpion (*Pandinus exitialis*) venom. *Toxicon*, 12:209.
43. Jekel, P., Weijer, W., Beintema, J., (1983). "Use of Endoproteinase Lys-C from *Lysobacter enzymogenes* in Protein Séquense Análisis, " *Anal. Biochem.* 134, 347 .
44. Johnson, B. D., Tullar J. C., and Stahnke H. L., 1966. A quantitative protozoan bioassay method for determining venom potencies. *Toxicon*, 2:297.
45. Kar, P.K., Saarang, B., Datta A., Gomes, A., Lahiri S.C. (1986) Ocurrancee of phospholipase in the venom of the scorpion (*Heterometrus bengalensis*). *Indian Journal Medical Research.* 83:332-337.
46. Kini, R.M. , Evans, H.J., (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon* 227 (613-685)

47. Kini, R.M.,(1997). Phospholipase A2—A complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R.M., (Ed) Venom phospholipase A2 enzymes : Structure. Function and Mechanism . John Wiley & Sons, Chichester UK. 1997 p.p. 1-28
48. Kondo, K. , Narita K., *et al.*, (1978) Aminoacid sequences of the two polypeptide chains in β 1 bungarotoxin from the venom of *Bungarus multicinctus* *J. Biochem.* 83(1):101-115
49. Kondo, K. , Toda, H., Narita K., *et al.*, (1982a) Aminoacid sequences of β bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* venom. The aminoacids substitutions in the β chains *J. Biochem.* 91:1519-1530
50. Kondo, K., Toda, H., Narita K., *et al.* , (1982b) Aminoacid sequences of the three β bungarotoxins (β 3- β 5bungarotoxin) from the *Bungarus multicinctus* venom. Aminoacids substitutions in the A chains *J. Biochem.* 91:1531-1548
51. Kristal, C. *et al.*, (1998) Cardiac failure following sting of yellow scorpion in an adult. *Harefuah* 15;134(6):452-454. PMID: 10909575 [PubMed - indexed for MEDLINE]
52. Lazar, N., Ghalim, N., (1998). Purification and characterization of from venom of scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. (Reports and abstracts – 0049X *Toxicon* (1998) (PII:SOO41 01011)
53. Lehninger, A.L., (1985) *Bioquímica. Segunda edición. Editorial Omega.*
54. MacIntosh, J.M., and Olivera, B.M. (1999) Conus peptides as probes for ion channels. *Methods enzymol.* 294, 605-624
55. Marinkelle, C. J. and Stahnke, H. L., 1965. Toxicological and clinical studies on *Centruroides margaritatus* (Gervais), a common scorpion in western Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 2(2):197-199.
56. Paramo, L., Lomonte, B., Pizarro-Cerda J., Bengoechea, J.A., Gorvel, J.P., Moreno, E., (1998) Bactericidal activitie of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom synthetic Lys49 myotoxin 11-(115—129)- peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253 (1998) 452-461.
57. Pete, J.M., Canton, J.M., Murphy, R. F., (1992). Isolation and primary structure of a potent toxin from the venom of scorpion *Centruroides sculpturatus*. *Intr. J. Pr.Res.* 40:582-586.

58. Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, Arantes, EC. , *et al.*,(2001) A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 2001 Oct;39(10):1495-1504
59. Pisciotto M, Coronas FI, Possani LD, Prestipino G. , *et al.*,(1998). The *Androctonus australis garzoni* scorpion venom contains toxins that selectively affect voltage-dependent K(+)-channels in cerebellum granular cells. *Eur. Biophys. J.*; 27(1):69-73
60. Polis, G.A., *et al.*,(1994) Biology of scorpions, University of Nashville, publications, Tennessee and Stanford University Press (1990).
61. Possani, L.D., Becerril B., Delepierre M., and Tytgat J. (2001). Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* **264**, 287-300.
62. Possani, L.D., Calderón E.S.A., Olamendi T.P., Dávila M.D., Gurrola G.B., (1992). Protección contra el alacranismo. En Vacunas Ciencia y Salud. (Editado por Gutiérrez A.E. y Gómez, J.L.V.) p.p. 533-544. Secretaría de Salud.
63. Possani, L.D., Coronas F.I., *et al* (1993). Isolation and Characterization of toxins from the venom of the scorpion *Tityus bahiensis*. *Toxicon* **31**:160 (abstract).
64. Possani, L.D., Fletcher P.L. Jr., y *col.*, (1980). Purificación y caracterización de toxinas que afectan a mamíferos del alacrán mexicano *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* **18**:175-183 (1980) Tomo 1:93-101
65. Possani, L.D., (1983). Las toxinas del veneno de alacranes: Estructura y función. *Bol. Ins.Med. Biol. Méx.* **32**:285-297.
66. Possani, L.D., Fletcher, P.L., *et al.*, (1992). "Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello " *Memorias do Instituto Butanan* **54**(2) :35-52 (1992).
67. Possani, L.D. and Martín B.M. (1981). Purification and characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Melo. *Carlsberg Res. Commun.* **46**:195-205 (1981).
68. Possani, L.D., Ramírez, A.G., *et al.*,(1978) Isolation of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion *Centruroides elegans* (Thorell). *FEBS Lett.* **91**:261-264 (1978).

69. Radmanesh, M. (1990) Clinical study of *Hemiscorpion lepturus* in Iran. *Journal of tropical Medicine and Hygiene*, 93:327-332.
70. Radmanesh M. (1998) Cutaneous manifestations of the *Hemiscorpius lepturus* sting: a clinical study. *Int. J. Dermatol.* 37(7): 500-507
71. Ramanaiah M, Parthasarathy PR, Venkaiah B., *et al.*, (1990). Purification and properties of phospholipase A₂ from the venom of scorpion, (*Heterometrus fulvipes*). *Biochem Int*;20(5):931-940
72. Rosenberg, (1990) In *Handbook of Toxinology*, (Ed. Thomas Shier and Dietrich Mebs) Marcel Decker, Inc, N.Y.)
73. Rubio M., (2000). *Scorpions: A complete pet owner's manual. Scorpions as pets*. I. Barron's Educational Series, Inc. N.Y.
74. Scott, D.L., Otwinowski, Z. Gelb, M.H. *et al.* (1990). Crystal structure of bee venom phospholipase A₂ in a complex with a transition state analogue. *Science* 250: 1563-1566.
75. Shipolini, R.A., Callewaert G.L., *et al.*, (1974) The amino acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A₂ from bee venom. *Eur. J. Biochem.* 48:465-476.
76. Simard and Watt., (1990) *The Biology of Scorpions. Chapter :Venoms and toxins*. Stanford University Press, Stanford, California. (G. Polis, ed.)
77. Smith, R.L., (1992) *Venomous Animal of Arizona. Cooperative extension, of agriculture. The University of Arizona.* Tucson, A 285. 741.
78. Six, A.D., and Dennis, A. E. , (2000) The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes : classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1488 1-19(2000) ELSEVIER.
79. Sosa, B.P., Alagón, A.C., *et al.*, (1986), Biochemical Characterization of the Phospholipase A₂ , Purified from the venom of the Mexican Beaded Lizard (*Heloderma horridum horridum* Wiegmann), *Biochemistry*, 25:2927-2933 .
80. Stabnke, H. L. 1963. Some pharmacological and biochemical characteristics of *Centruroides sculpturatus* Ewing scorpion venom. Second International Pharmacology of toxins. Proc. 2nd. Int. Pharmacol. Meet. Prague, pp. 64-70;1963.

81. Stahnke, H.L. (1978) The genus *Centruroides* (Buthidae) and its venom. In arthropod venoms. Ed. Bettini. S. (Springer Verlag, Berlin) vol. 48. Chapter 12:277-307.
82. Stahnke, H.L. (1966) Some aspects of scorpions behavior. *Bull. So. Calif. Acad. Sci.* 65:65-80
83. Stockwell, S. A. (1989) Revision of the phylogeny and higher classification of scorpions (Chelicerata). Ph.D. dissertation, University of California, Berkeley.
84. Suze, D. G., Coronas, F., *et al.* (1996), High performan liquid chromatography purification and amioacid sequence of toxins from MUSCARINING fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 34 :5 591-598.
85. Tan NH, Ponnudurai G. (1992), Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp Biochem Physiol C.* Oct;103(2):299-302.
86. Tallarovic, S.K., Melville, J.M., and Broownell, P.H., (2000), Courtship and Mating in the Giant Hairy Desert Scorpion, *Hadrurus arizonensis* *Journal of Insect Behavior*, 13:6.
87. Torres-Landa, A., Gurrola, G.B. *et al.* , 2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 1-10 © FEBS 2000.
88. Valdivia, H.H., Jeffrey S.S., Brian, M. Coronado, R. and Possani L.D (1988). Vahrybdtoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitor of the K^+ (Ca^{2+}) channel. *FEBS letter.* 2:280-284.
89. Universidad de Guadalajara,(2001)
(http://www.cucba.udg.mx/es/paginter/anel/alacranes_venenosos_de_jalisco.html).
90. Valentín E., Ghomashchi F., Gelb M.H., Lazdunski M., Lambeau G.,(2000) Novel human secreted phospholipase A₂ with homology to the group III bee venom enzyme. *J.Biol. Chem.* 275:7492-7496
91. Valentín, E. and Lambeau, G.(2000). What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? *Biochimie* 82:815-831.
92. Watt, D. D., *et al.*, 1964. Biochemical studies of the venom from the scorpion *Centruroides sculpturatus*. *Toxicon*, 2:171.

93. **Whittemore, F. W. and H. L. Keegan.** 1963. Medically important scorpions in the Pacific area. Pages 107-110. In: *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region* (H. L. Keegan & W. V. MacFarlane, eds.). The Macmillan Company, New York. –
94. **Xiong Y. M., Ling, M.H., Zhao, T., Wang, D.C. , Chi, C.W. ,** (1999) .The cDNA sequence of an excitatory insect selective neurotoxin from the scorpion *Buthus martenssi* Karsch. *Toxicon* **37**:335-341.
95. **Xiong, Y. M., Ling, M.H., et al.,** (1997). cDNA sequences of two antimammal neurotoxins from scorpion *Buthus martenssi* (in Chinese). *Acta Biochimica et Biophysica Clinica* **29**:200-205.
96. **Zamudio, F.Z., Conde R., Arévalo, C., Becerril, B.,** (1997). The mechanism of inhibition of Ryanodine Receptor Channels by Imperatoxin I, a Heterodimeric Protein from Scorpion *Pandinus Imperator*. *J. Biol. Chem.* **272**, 11886-11894.
97. **Zamudio, Z. F. , Gurrola B.G., Arévalo, C., Raghava, Strekumar.,** (1997). Primary structure and synthesis of Imperatoxine A (IPTx_A), a peptide activator of Ca²⁺ release channels/ryanodine receptors. *FEBS. letters* **405** 385-389.
98. **Zhu, S.Y. et al** (2000) Nine novel precursors of (*Bmk*) scorpion alfa toxin homologues *Toxicon* **38** 1653-1661
99. **Zlotkin, E., Fraenkel G., Miranda F. et al,** (1971). The effect of scorpion venom on the blowfly larvae: a new method for the evaluation of scorpion venom potency. *Toxicon* **9**:1-8
100. **Zlotkin, E., F. Miranda, and H. Rochat.** 1976. Venoms of Buthidae. C, Chemistry and pharmacology of Buthidae scorpion venoms. Pages 317-369. In: *Arthropod Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. **48**. Springer-Verlag, Berlin.