



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS**

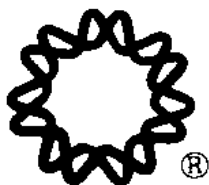
**“Búsqueda y evaluación de un marcador
molecular para el estudio de los canales de
potasio tipo hERG3 a partir del veneno del
alacrán *Centruroides gracilis*.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. VERNA CÁZARES ORDÓÑEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. GEORGINA GURROLA BRIONES



CUERNAVACA, MORELOS NOVIEMBRE DE 2009



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.

ESTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DEL DR. LOURIVAL D. POSSANI POSTAY DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. GEORGINA GURROLA BRIONES Y FINANCIADO POR CONACYT FONDO SALUD 014109, DGAPA-UNAM IN227507 E INSTITUTO BIOCLÓN S.A. de C.V.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mis padres: Guadalupe y Abel, pues gracias al apoyo incondicional que han dedicado hacia mi persona hoy concluyo un trecho del camino de mi superación profesional; del cual, quiero que se sientan orgullosos y honrados. Estoy convencida de que los preceptos en que se basa mi vida los aprendí de ellos.

También dedico este trabajo a mis queridas hermanas: Yael y Tané, pues nos hemos apoyado siempre para resolver problemas a lo largo de nuestra vida, hemos compartido tareas y hermosas experiencias. No sólo son mis hermanas sino también mis mejores amigas.

También dedico este trabajo a alguien muy especial: mi Ramiro, La ciencia junto a ti sabe a café!

"If one concentrates too much on major points of a matter he will overlook small details. Small details are of very great important. You should commit to thoroughly understanding every aspect of very matter you are involved in, even the smallest trifles".

Tomado del libro de Yamamoto Tsunetomo: The Hagakure.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle al Dr. Lourival D. Possani por haberme permitido ser parte de su importante grupo de investigación. La dedicación que siempre mostró al trabajo del laboratorio y a sus estudiantes fue para mí una motivación para adentrarme en el mundo de la ciencia.

A mi tutora, la Dra. Georgina Gurrola le agradezco por los conocimientos que me transmitió, es algo que aprecio mucho y que siempre recordaré con afecto.

Un especial agradecimiento a la Dra. Rita Restano-Cassulini, por ayudarme y explicarme incansablemente en la parte electrofisiológica del proyecto y a la Dra. Martha Pedraza por su ayuda en mis dilemas bioinformáticos.

A Marisol S., Mari, Lidia G., Ginis, Polo y Timo por sus valiosos comentarios y sugerencias que me ayudaron a plantear experimentos del proyecto. También agradezco la amabilidad, amistad y ayuda técnica de Ciprinano, Fredy y el Dr. Fernando.

Reconozco también, con gran aprecio, las útiles recomendaciones de la Dra. Liliana Pardo y del Dr. Omar Pantoja, miembros de mi comité tutorial de maestría. También le agradezco a mi jurado de examen: Dra. Claudia Treviño, Dra. Adriana Valdez, Dra. Elba Villegas y Dr. Ernesto Ortiz por la atención que tuvieron en revisar y corregir mi escrito de tesis.

Gracias a todos mis compañeros del grupo: Rita, Mari, Lulu, Lidia G., Rosby, Dora, Martha, Kenya, Cynthia, Juan Carlos, Omar, Myriam, Elia, Ricardo, Blanca, Linda, Gerardo Corzo, Vero, Pável, Oscar, Lidia R., Rive, Itzel, Marisol S., Gabriel, Citlalli, Rosalba., Ginis, Everardo, Ernesto y Rodolfo. La convivencia hace más alegre el trabajo de laboratorio.

También reconozco la valiosa ayuda de Marisol C., y Carmen en el trabajo diario. Creo que ellas son una parte muy importante para el buen funcionamiento del laboratorio.

A Miriam y Vero por la amabilidad con la que siempre respondieron ante mis peticiones de usar el equipo de la planta piloto.

Finalmente agradezco al CONACyT por la beca No. 207284.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
1. RESUMEN.....	10
1. SUMMARY	11
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 Canales Iónicos.....	12
2.2 Canales Iónicos de Potasio	14
2.3 Canales de K ⁺ dependientes de voltaje.....	16
2.4 Canales Kv tipo ERG	23
2.5 Fuentes naturales de moléculas con actividad en canales iónicos	28
3. ANTECEDENTES	30
4. HIPÓTESIS.....	33
5. OBJETIVO GENERAL.....	33
6. OBJETIVOS PARTICULARES	33
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
8. MATERIALES Y MÉTODOS	35
8.1 Obtención de veneno	35
8.2 Purificación del veneno	35
8.3 Ensayos de toxicidad	36
8.4 Actividad Enzimática (hialuronidasa)	37
8.5 Electroforesis	38
8.6 Secuenciación	38
8.7 Análisis de masa molecular	39
8.8 Electrofisiología.....	39

8.9 Biotinilización	39
8.10 Determinación de la constante de disociación	40
8.11 Reacción de entrecruzamiento	40
8.12 Western Blot.....	41
8.13 Modelado por homología de la toxina CgErgTxI	41
9. RESULTADOS	42
9.1 Purificación del veneno de <i>C. gracilis</i>	42
9.2 Análisis proteómico del veneno de <i>C. gracilis</i>	45
9.3 Toxicidad del veneno de <i>C. gracilis</i>	49
9.4 Caracterización bioquímica del péptido tóxico en acociles.....	50
9.5 Actividad enzimática hialuronidasa	52
9.6 Purificación del péptido con actividad sobre los canales hERG3	52
9.7 Caracterización Bioquímica de CgErgTxI: masa molecular y secuencia de aminoácidos.....	55
9.8 Marcado del péptido con biotina.....	58
9.9 Entrecruzamiento	61
10. DISCUSIÓN	62
10.1 Caracterización bioquímica del veneno.....	62
10.2 Caracterización bioquímica y uso de CgErgTxI como marcador molecular.....	63
10.3 Biotinilización de la toxina CgErgTxI	67
10.4 Proteómica del veneno de <i>C. gracilis</i>	68
11. CONCLUSIONES.....	70
12. PERSPECTIVAS.....	71
13. BIBLIOGRAFÍA.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Avance generado en la última década de la clonación de genes que codifican para los canales de potasio tanto humanos como de otras especies animales.	14
Figura 2.	Clasificación de los canales de K ⁺ de acuerdo al mecanismo que utilizan para transportar potasio.	15
Figura 3.	Estructura del canal <i>Shaker</i> de <i>Streptomyces lividans</i> .	17
Figura 4.	Organización estructural de la subunidad α de un canal Kv de mamífero.	18
Figura 5.	Filtro de selectividad de los canales Kv.	19
Figura 6.	Alineamiento de una región del segmento S4 de diferentes canales Kv.	20
Figura 7.	Esquema del movimiento del sensor de voltaje durante la apertura de los canales Kv.	21
Figura 8.	Inactivación tipo N de los canales Kv.	22
Figura 9.	Inactivación tipo C de los canales Kv.	22
Figura 10.	Ubicación de la subunidad β en los canales Kv.	23
Figura 11.	Árbol filogenético de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje.	24
Figura 12.	Comparación de la secuencia de aminoácidos del segmento S5-P-S6 de diferentes canales de K ⁺ dependientes de voltaje.	25
Figura 13.	Estructura terciaria de la toxina ErgTx.	30
Figura 14.	Efecto de la toxina ErgTx sobre una quimera del canal hERG.	31
Figura 15.	Comparación de la composición de aminoácidos del segmento S5-P y P-S6 de las tres diferentes isoformas de canales hERG y rERG.	31
Figura 16.	Perfil cromatográfico de la purificación de veneno de <i>C. gracilis</i> por exclusión molecular.	43
Figura 17.	Perfil cromatográfico de la purificación de la fracción F.II por cromatografía de intercambio iónico.	45
Figura 18.	Perfil cromatográfico de la separación de veneno de <i>C. gracilis</i> por HPLC de fase reversa.	46
Figura 19.	Clasificación de los componentes del veneno de <i>C. gracilis</i> por su masa molecular.	48
Figura 20.	Perfil cromatográfico de la separación del péptido letal en acociles por HPLC de fase reversa.	51

Figura 21.	Actividad enzimática hialuronidasa del veneno de <i>C. gracilis</i> y de las fracciones F.I, F.II y F.III.	52
Figura 22.	Perfil cromatográfico de la separación de la fracción F.II.13 por HPLC semipreparativo de fase reversa.	53
Figura 23.	Perfil cromatográfico de la repurificación del péptido bloqueador de canales hERG3 por HPLC analítico de fase reversa.	54
Figura 24.	Registro electrofisiológico de la corriente de K ⁺ sobre canales hERG1 y hERG3 en presencia de la toxina CgErgTxI.	55
Figura 25.	Perfil cromatográfico de la digestión del péptido CgErgTxI derivatizado (reducido y carboximetilado).	56
Figura 26.	Secuencia de aminoácidos de la toxina CgErgTxI.	57
Figura 27.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CgErgTxI con otras toxinas erg-like.	57
Figura 28.	Perfil cromatográfico de los productos de reacción de la biotilización del péptido CgErgTxI.	59
Figura 29.	Curva dosis-respuesta del péptido CgErgTxI nativo y biotilizado.	60
Figura 30.	Reacción de entrecruzamiento entre el canal hERG3 y el péptido CgErgTxI biotilizado.	61
Figura 31.	Alineamiento de la secuencia de CgErgTxI con otras toxinas también bloqueadoras de canales de K ⁺ tipo ERG.	64
Figura 32.	Comparación de la anfipaticidad de dos toxinas bloqueadoras de Canals ERG.	65
Figura 33.	Sobreposición de la estructura terciaria de las toxinas ErgTx y CgErgTxI.	66
Figura 34.	Representación de los posibles sitios de biotilización en la toxina CgErgTxI.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Síntesis histórica de las contribuciones que llevaron al conocimiento de los canales iónicos.	13
Tabla 2	Fármacos que prolongan el intervalo QT.	26
Tabla 3	Efecto de la fracción 20-30 minutos de HPLC analítico de fase reversa del veneno de <i>C. gracilis</i> sobre las diferentes formas de canales hERG y rERG.	32
Tabla 4	Curva de calibración para determinar la cantidad de ácido hialurónico.	37
Tabla 5	Recuperación de la purificación de veneno de <i>C. gracilis</i> por cromatografía de exclusión molecular.	42
Tabla 6	Recuperación de la purificación de la fracción F.II por cromatografía de intercambio iónico.	44
Tabla 7	Análisis proteómico de los 38 picos eluidos de la separación de veneno de <i>C. gracilis</i> por HPLC de fase reversa.	47
Tabla 8.	Secuencia N-terminal de algunos péptidos del veneno de <i>C. gracilis</i> .	48
Tabla 9	Efecto tóxico de las fracciones F.I, F.II y F.III en ratones CD1.	49
Tabla 10	Efecto tóxico de las fracciones F.II.1-F.II.15 de carboximetilcelulosa en insectos y crustáceos.	49
Tabla 11	Abundancia en el veneno de <i>C. gracilis</i> del péptido letal en acociles.	50
Tabla 12.	Secuencia N-terminal de la toxina denominada Cg40.42, proveniente de la fracción FII.8	50
Tabla 13	Abundancia del péptido bloqueador de canales hERG3 en el veneno de <i>C. gracilis</i> .	54
Tabla 14	Análisis de los subpéptidos de la toxina CgErgTxI por espectrometría de masas.	57
Tabla 15	Análisis de la secuencia de aminoácidos de la toxina CgErgTxI.	58
Tabla 16	Secuencias de aminoácidos propuestas para la toxina CgErgTxI.	58

ABREVIATURAS

AMPc Adenosin monofosfato cíclico

ASIC canales iónicos sensibles a protones

ATP Adenosin Trifosfato

Ca⁺² calcio

C. Centruroides

CHO Ovario de Hamster Chino

Cl⁻¹ Cloro

CMC Carboximetilcelulosa

Da Daltones

ERG Gene Relacionado con ether a-go-go

CMPc Citidina monofosfato cíclico

H⁺ Protón

HPLC Cromatografía líquida de alta presión

ICC Células intersticiales de Cajal

K⁺ Potasio

KD Constante de Disociación

Kv Canales de potasio dependientes de voltaje

LQTS Síndrome de QT largo

M Molar

Na⁺ Sodio

PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida

PBS Solución amortiguadora de fosfatos

SDS Dodecil sulfato de sodio

SNC Sistema nervioso central

TEA Tetra etil amonio

TR Tiempo de retención

I. RESUMEN

Los canales iónicos son proteínas transmembranales importantes para mantener muchos procesos fisiológicos. El interés por entender cómo trabajan y desarrollar moléculas que modulen su actividad ha sido de gran importancia en los últimos años ya que, el funcionamiento inadecuado de estas proteínas está asociado a patologías conocidas como canalopatías. Al respecto, el estudio del veneno de los alacranes es de especial interés bioquímico y farmacológico debido a la presencia de diversos compuestos, principalmente peptídicos, con actividad específica sobre diferentes canales iónicos.

En este trabajo reportamos los resultados obtenidos con el veneno del alacrán *Centruroides gracilis*, el cual fue separado por diferentes técnicas cromatográficas como: exclusión molecular, intercambio iónico y HPLC ("High Pressure Liquid Chromatography"). En este veneno se encontraron diferentes componentes con actividad tóxica en insectos (grillos), así como, un único componente tóxico en crustáceos (acociles), del que se identificó parte de su secuencia de aminoácidos (VADDYECNDSEGIRG...) y su masa molecular (6,947 Da). En el veneno se identificó una proteína de 45 KDa que corresponde a una enzima hialuronidasa. Por medio del análisis proteómico del veneno de *C. gracilis*, identificamos 60 componentes de naturaleza peptídica, más de la mitad de estos componentes son péptidos de entre 3 y 5 KDa y de algunos de ellos se identificó la secuencia de aminoácidos N-terminal. El hallazgo más importante que se reporta en esta tesis fue la obtención de un componente peptídico que mostró ser modulador de los canales de potasio humano tipo ERG3 (hERG3). Éste péptido fue caracterizado bioquímicamente, tiene una masa molecular de 4,384 Da y una secuencia N-terminal de aminoácidos: GTNSCVNKSG... La secuencia completa se obtuvo por degradación automática de Edman y espectrometría de masas de los sub-péptidos de la hidrólisis enzimática del péptido nativo. El péptido, fue marcado con biotina para ser usado como sonda molecular en el estudio de dichos canales. Los ensayos electrofisiológicos con el péptido nativo y el péptido biotinilado, realizados por la técnica de *patch-clamp* sobre células CHO (*Chinese hamster ovary*) que expresaban heterológicamente canales hERG3, permitieron determinar que la KD del péptido biotinilado es 17 veces menos potente que el péptido nativo. El péptido marcado con biotina mantiene su actividad biológica sobre los canales hERG3, pudiendo ser utilizado como marcador molecular en el estudio de dichos canales.

I. SUMMARY

Ionic channels are membrane-spanning proteins important for maintaining many physiological processes. The interest on understanding their structure and function, as well on developing molecules that modulate their activities has been of great importance in recent years. The inadequate operation of these proteins is associated to pathologies known as channelopathies. Related to this field are the studies conducted with peptides extracted from scorpion venoms, because they contain peptides that affect various types of ion-channels. In this work we report the results obtained with the soluble venom of the scorpion *Centruroides gracilis*, which was separated by different chromatographic techniques as: molecular weight sieving (Sephadex G-50), ion exchange resins and high performance liquid chromatography (HPLC). The venom of *C. gracilis* contains different components toxic to insects (crickets), and only one toxic component to crustaceans (shrimp). The peptide toxic to shrimps was obtained in pure form and its N-terminal sequence was identified: VADDYECNDSEGIRG... Its molecular weight was obtained by mass spectrometry and shown to be 6,947 Da. This venom also has an enzyme with 45 KDa, that shows hyaluronidase activity. Through the proteomic analysis of the soluble venom of *C. gracilis* at least 60 components were identified. More than half of these components are peptides with molecular weights between 3 and 5 KDa. Some of these peptides were sequenced at their N-terminal amino acids. The most relevant finding of this thesis was the isolation and characterization of a short peptide with 4,384 Da of molecular weight and N-terminal sequence GTNSCVNKSG... This peptide was shown to be a specific modulator of the human potassium channels ERG3 (hERG3). The structure of this peptide was determined by Edman degradation and mass spectrometry analysis of sub-peptides obtained from enzymatic hydrolysis of the native peptide. A sample of the peptide was labeled with biotin for using it as a molecular probe for the study of hERG3 channels. The electrophysiology assays conducted with this peptide showed that the labeled peptide is 17 times less powerful than the native one. The labeled peptide maintains its biological activity on the channels hERG3, and can now be used as molecular probe in the study of hERG3 channels.

2. INTRODUCCIÓN

La caracterización funcional y molecular de la gran diversidad de canales iónicos ha sido de valioso interés para la comunidad científica dada la importante función que realizan en la fisiología humana. Numerosas asociaciones han sido establecidas entre disfunción en los canales iónicos y enfermedades. En 1989, se describió la primera enfermedad asociada a un canal iónico, la fibrosis quística, en la que se encuentra mutado el gen que codifica para un canal de cloro (Rodgers *et al.*, 2001). Desde entonces la lista de enfermedades asociadas a la disfunción de estas proteínas de membrana se ha incrementado en forma sorprendente generando así lo que hoy conocemos como “canalopatías”. En los últimos años la industria farmacéutica ha mostrado gran interés por los canales iónicos, postulándolos como blancos atractivos para el desarrollo de fármacos, principalmente porque estas proteínas de membrana, son a menudo los efectores iniciales de las cascadas y los procesos de señalización celular, indispensables en los procesos biológicos. En la última década se han aislado de diferentes fuentes naturales, numerosos compuestos con actividad en canales iónicos; éstos compuestos podrían ser utilizados en el diseño de fármacos dirigidos a enfermedades asociadas a la disfunción de un canal iónico.

2.1 Canales Iónicos

La historia de la biofísica de la membrana celular y el estudio de los canales iónicos se comenzó a trazar hace un siglo. Las aportaciones resultantes revolucionaron el conocimiento en este campo, permitiendo el desarrollo de metodologías que facilitaron la investigación de los canales iónicos (tabla I). Hoy se sabe que la vida de una célula depende de manera importante de la presencia de transportadores específicos en la membrana celular. Estos transportadores permiten a la célula mantener en su citosol ciertos solutos a concentraciones diferentes a las que están en el fluido extracelular y así por ejemplo, la célula puede ingerir nutrientes, excretar los productos residuales del metabolismo y regular las concentraciones intracelulares de iones (Alberts *et al.*, 1996; Karp., 2003).

Las células cuentan con dos clases principales de transportadores: las proteínas transportadoras, las cuales tienen partes móviles que les permiten transportar moléculas específicas a través de la membrana y los canales iónicos, que forman un estrecho poro hidrofílico que fluctúa entre estados abiertos y cerrados y por donde se desplazan iones de forma selectiva y a favor de su gradiente electroquímico. En general todos los canales iónicos están definidos por dos características a saber: selectividad iónica y mecanismo de apertura y cierre (Alberts *et al.*, 1996).

Selectividad iónica

Los canales iónicos permiten que algunos iones puedan pasar y otros no. Esto sugiere que sus poros deben tener una geometría interna y un ambiente químico que limita el tipo de ión que puede pasar, de tal manera que sólo los iones de tamaño y carga adecuados pueden atravesarlos. Para poder pasar a través de la parte más estrecha del canal, los iones tienen que deshacerse de la mayor parte o de todas

las moléculas de agua que llevan asociadas; este hecho limita la velocidad máxima de paso. Así cuando aumenta la concentración de un ión, su flujo a través del canal aumenta proporcionalmente hasta que se alcanzan los niveles de saturación, momento en el que se llega a la velocidad máxima de transporte, la cual en promedio llega a ser de 10^6 iones s^{-1} (Alberts *et al.*, 1996).

Los principales iones que pasan por los canales iónicos son potasio (K^+), sodio (Na^+), calcio (Ca^{+2}) y cloro (Cl^-), sin embargo los protones (H^+) también pueden pasar por algunos canales iónicos como los ASIC (*acid sensing ion channels*). El ión magnesio también puede ser filtrado por el poro de varios tipos de canales iónicos, pero es un caso especial, en parte, porque las fuertes interacciones que mantiene con las moléculas de agua, le impiden permear fácilmente por la mayoría de los poros iónicos.

Dependiendo del tipo de ión que pasa por el poro del canal, los canales iónicos se han nombrado de la siguiente manera: canales iónicos de potasio, canales iónicos de sodio, canales iónicos de calcio, canales iónicos de cloro, etc.

Mecanismo de apertura y cierre

Los canales iónicos no están abiertos continuamente, sino que están fluctuando entre un estado abierto o cerrado. En la mayoría de los casos el estado abierto se da en respuesta a un estímulo específico. Los principales tipos de estímulos que se sabe causan la apertura de los canales iónicos son cambios en el voltaje de la membrana celular, estímulos mecánicos y la unión de ligandos. El ligando puede ser un mediador extracelular (neurotransmisor), o un mediador intracelular como un ión o un nucleótido. Hasta ahora se han descrito más de 100 tipos de canales iónicos, y siguen describiéndose más. Son responsables de la excitabilidad eléctrica del músculo y median la mayoría de formas de señales eléctricas en el sistema nervioso, por ejemplo: una célula nerviosa típica, contiene 10 tipos diferentes o más de canales iónicos localizados en diferentes dominios de su membrana plasmática (Alberts *et al.*, 1996).

Autor	Contribución
Julius Bernstein. (Bernstein, 1912).	La célula esta rodeada de una membrana aislante con una pequeña permeabilidad selectiva a potasio.
Alan Hodgkin y Andrew Huxley. (Hodgkin y Huxley, 1939; Hodgkin y Huxley, 1945; Hodgkin y Huxley, 1949; Hodgkin y Huxley, 1952).	Demuestran la participación del sodio en la excitabilidad celular y publican la descripción cuantitativa de la generación y propagación del impulso nervioso en el axón gigante de calamar.
Erwin Neher y Bert Sakmann. (Neher y Sakmann, 1976; Hamill <i>et al.</i> , 1981).	Desarrollaron la técnica de <i>patch clamp</i> , que les permitió registrar las corrientes totales en células pequeñas y lo más importante registrar la actividad de un canal iónico.
Shosaku Numa. (Noda <i>et al.</i> , 1984).	Identificación del primer ADN codificante de un canal iónico de sodio.
Lily Jan. (Papazian <i>et al.</i> , 1987).	Clonación del primer canal de potasio (<i>Shaker</i>).
Roderick Mackinnon y Peter Agre. (Mackinnon, 1991; Heginbotham <i>et al.</i> , 1994; Doyle <i>et al.</i> , 1998; Kuo <i>et al.</i> , 2003; Zhou <i>et al.</i> , 2001).	Descubrimiento de los canales de agua o acuoporinas y cristalización del primer canal iónico, permitiendo el conocimiento de la estructura de un canal, la selectividad del poro, la unión a proteínas reguladoras y toxinas.

Tabla 1. Síntesis histórica de las contribuciones que llevaron al conocimiento de los canales iónicos.

2.2 Canales Iónicos de Potasio

Los canales iónicos más comunes son los permeables al K^+ , se encuentran presentes en todo tipo de células, tanto excitables como no excitables. Más de 50 genes humanos que codifican para diferentes tipos de canales de K^+ , han sido clonados en los últimos años, y tanto sus propiedades biofísicas, la estequiometría de sus subunidades, el ensamblado del canal y su modulación por segundos mensajeros y ligandos se ha estudiado extensamente (Shieh *et al.*, 2000). (figura 1).

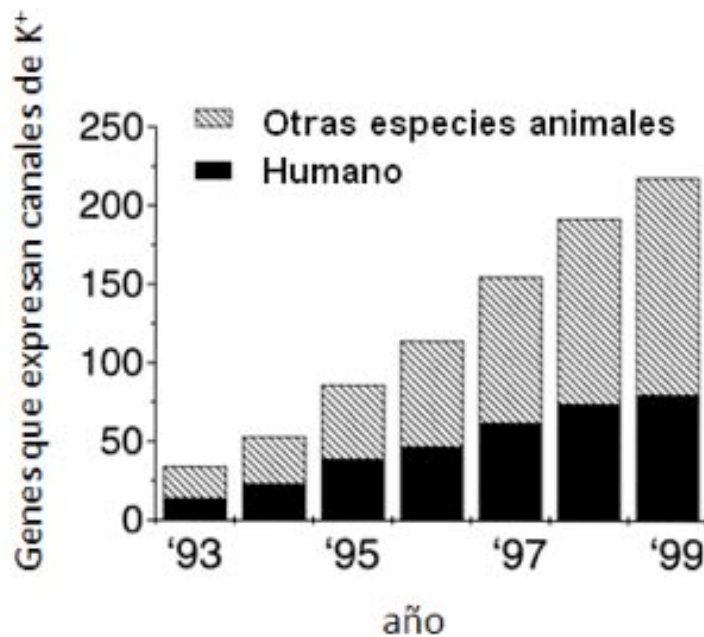


Figura 1. Avance generado en la última década de la clonación de genes que codifican para diferentes canales de potasio tanto humanos como de otras especies animales, (Shieh *et al.*, 2000).

La clasificación de los canales de K^+ se ha realizado siguiendo diferentes criterios, tradicionalmente el más utilizado ha sido el genético, donde de acuerdo a la analogía entre secuencias se han agrupado en familias, sin embargo no siempre hay una correspondencia en funcionalidad. Una de las clasificaciones más recientes y que considera el mecanismo por el que estos canales permiten el transporte de potasio fue hecha por Coetzee en 1999, en la que los canales de K^+ se catalogan de la siguiente manera (figura 2):

- 1) Canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v), los cuales son activados por despolarización de la membrana celular y se han subdividido por su mecanismo de inactivación en: a) Canales K_v de inactivación rápida o tipo A y b) canales K_v de inactivación lenta o nula ("delayed rectifiers").
- 2) Canales dependientes de la concentración intracelular de Ca^{2+} , de los que se conocen dos tipos: a) dependientes de voltaje y b) no dependientes de voltaje.

3) Canales rectificadores entrantes –Kir– (“inward rectifying”). Son canales que pueden estar abiertos en todos los potenciales de membrana, pero que bajo condiciones experimentales se favorece el ingreso en lugar de la salida de iones K^+ y por lo tanto se generan preferentemente corrientes de entrada y no corrientes de salida. Algunos de los canales Kir se abren constitutivamente, mientras que otros requieren estimulación mediada por receptor y activación por proteínas G.

4) Canales de fuga (“leak channels”), término asignado por la aparente carencia en el control del mecanismo de apertura.

5) Canales activados por Na^+ , su apertura depende del incremento en la concentración de Na^+ intracelular.



Figura 2. Clasificación de los canales de K^+ de acuerdo al mecanismo que utilizan para transportar potasio, (Coetzee y Rudy., 2006).

En este trabajo se profundizará en un tipo de canal de potasio dependiente de voltaje por lo que a continuación se detallarán las características funcionales y estructurales de estos canales. El lector interesado puede recurrir a la revisión de Coetzee *et al.*, 1999 para adentrarse en la descripción detallada de los canales de K^+ que no serán mencionados en este trabajo: leak, kir, dependientes de Ca^{2+} , activados por sodio etc.

2.3 Canales de K⁺ dependientes de voltaje

Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) son aquellos que controlan el flujo de potasio por la membrana celular, a través de un mecanismo basado en la sensibilidad a la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana. La actividad de un canal dependiente del voltaje es controlada a escala de milisegundos por dos procesos independientes: a) la activación que controla la dependencia del tiempo y el potencial bajo el cual está sometida la apertura del canal iónico en respuesta a los cambios del potencial de membrana, y b) la inactivación, que controla la velocidad y la intensidad con que el canal se cierra durante una despolarización mantenida. Estos dos procesos aseguran que la activación de los canales iónicos sea rápida, pero pasajera.

Los canales de potasio dependientes de voltaje se encuentran en diferentes tipos de células, por ejemplo: en células excitables como las neuronas, los canales Kv determinan el potencial de reposo, la duración del potencial de acción, modulan la liberación de neurotransmisores y regulan la frecuencia de disparo (Trimmer., 1993). En el potencial de acción cardiaco distintos tipos de canales de potasio participan en cada una de las fases. En concreto, los canales de potasio dependientes de voltaje generan la corriente transitoria de salida y la corriente rectificadora retardada de activación lenta que completa la repolarización del potencial de acción cardiaco (Deal *et al.*, 1996). En células no excitables las funciones de estos canales son menos conocidas, además del mantenimiento del potencial de membrana, se ha demostrado la participación de estos canales en distintas vías de señalización implicadas en procesos de control del volumen celular, proliferación, activación y apoptosis (Deutsch y Chen, 1993; Wonderlin y Strobl, 1996; Cahalan y Chandy, 1997; Szabó *et al.*, 2004).

En un inicio, el estudio de los canales Kv se favoreció considerablemente por las investigaciones realizadas en mutantes de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. La mutante *Shaker*, llamada así por el movimiento repetido y brusco de las extremidades de la mosca, fue encontrada en moscas que tenían mutado el gen que codificaba para los canales Kv (Papazian *et al.*, 1987). El análisis genético de la mutante permitió identificar y aislar el gen responsable del fenotipo "shaker" y a partir de entonces comenzó la identificación de lo que es la familia de canales iónicos más diversa: los canales de potasio dependientes de voltaje. Inicialmente se clonaron cuatro genes de *Drosophila* que expresaban canales Kv: *Shaker*, *Shab*, *Shal* y *Shaw*. Más tarde los primeros genes descritos endógenos de mamíferos que codificaban canales Kv fueron relacionados con los encontrados en la mosca, de ahí que la subfamilia Kv1 se siga llamando *Shaker* y menos frecuentemente la Kv2 se relacione con *Shab*, Kv3 con *Shal* y Kv4 con *Shaw*. En humanos, la mayoría de los canales Kv descritos están codificados por genes diferentes, permitiendo una marcada expresión diferencial en los diferentes tipos celulares. Actualmente en humanos se conocen 11 subfamilias de canales Kv con 38 miembros en total.

Para nombrar a los canales Kv se ha propuesto una nomenclatura sistemática que es ampliamente aceptada. (Chandy *et al.*, 1991; Chandy y Gutman., 1993; Gutman *et al.*, 2003). Este sistema nombra a

los canales según la estructura: Kv_{x,y}. Donde 'K' se refiere al canal de potasio, 'v' a su dependencia del voltaje, 'x' es el número que hace referencia a la familia génica, e 'y' numera los canales de cada subfamilia en el orden conforme se han clonado. En algunos casos también se pone un identificador de la especie a la cual pertenece el canal, por ejemplo 'h' para humano y 'r' para rata.

2.3.1 Organización estructural de los canales Kv

Los canales Kv se encuentran como estructuras tetraméricas que consisten de cuatro subunidades principales llamadas subunidades alfa (α), organizadas simétricamente alrededor de un poro central por donde permean los iones K⁺. Inicialmente, mediante predicciones por unión a toxinas, MacKinnon en 1991, predijo la estructura tetramérica de los canales Kv. En 1998 Doyle *et al.*, confirmaron experimentalmente la estructura del canal, cristalizando un canal de Kv procarionta perteneciente a la bacteria *Streptomyces lividans* (figura 3).

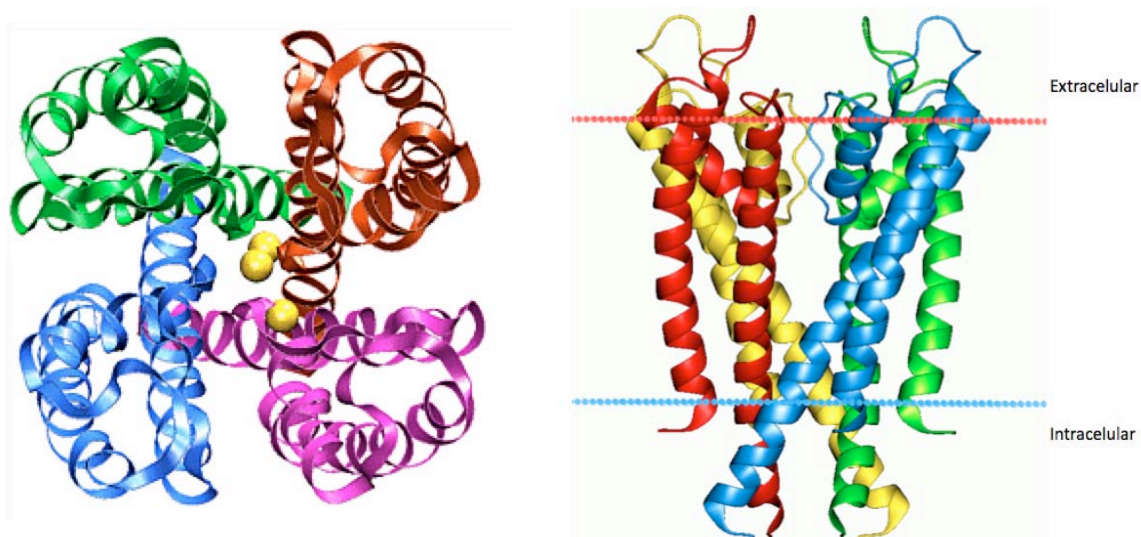


Figura 3. Estructura del canal Shaker de *Streptomyces lividans*. Se muestran en diferentes colores cada una de las subunidades α que forman el canal. Las subunidades están organizadas alrededor de un poro central, por donde pasan los iones potasio. (Doyle *et al.*, 1998).

En los mamíferos la subunidad α consta de un polipéptido que atraviesa seis veces la membrana celular, una parte sustancial de la proteína, de carácter hidrofóbico, se encuentra en la membrana en el ambiente de la bicapa lipídica; otra porción es extracelular y está ampliamente glicosilada, y otra es citoplasmática pudiendo sufrir modificaciones bioquímicas (por ejemplo, fosforilación por diversas quinasas) que van a regular la actividad del canal. Cada segmento embebido es designado con un número (S1-S6), el extremo amino y carboxilo del polipéptido se encuentran ubicados en el interior celular y cada segmento está cumpliendo una función específica; por ejemplo, se sabe que S4 actúa

como sensor de voltaje y que entre S5 y S6 se encuentra el poro del canal. Junto a la subunidad α puede o no encontrarse otra proteína conocida como subunidad β (figura 4). Cada uno de los componentes de la subunidad α son explicados a continuación.

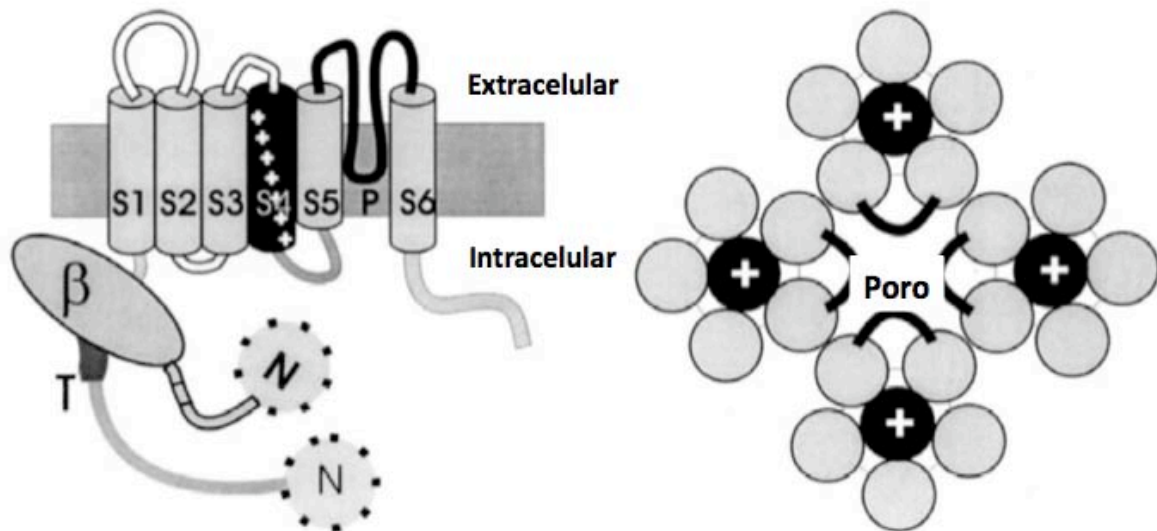
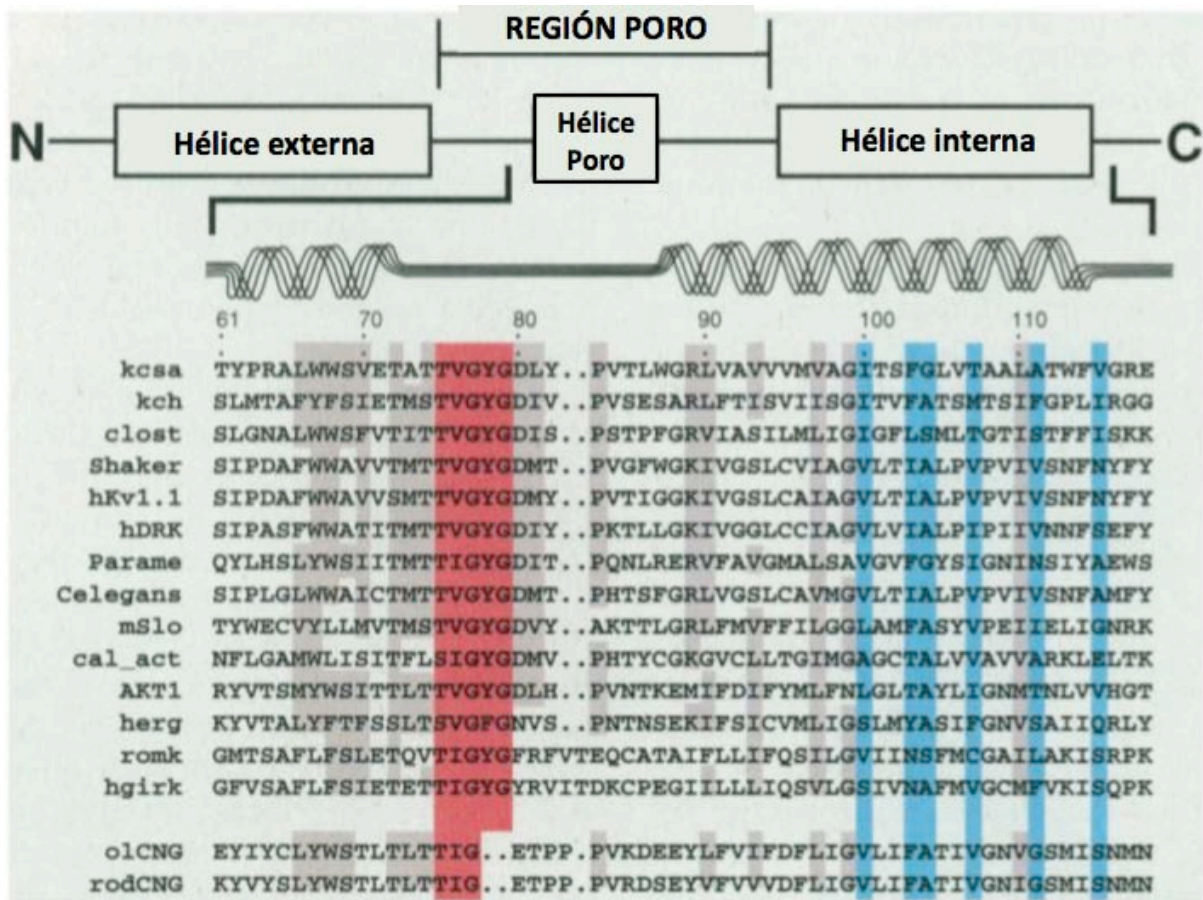


Figura 4. Organización estructural de un canal Kv de mamífero. A) La subunidad α está formada de 6 segmentos transmembranales (S1-S6). Entre el segmento S5 y S6 se encuentra el poro del canal (P). El segmento S4 actúa como sensor de voltaje. Los extremos amino y carboxilo se ubican en el citoplasma. En el extremo N-terminal de la subunidad α , puede encontrarse anclada otra subunidad llamada β . B) El canal Kv completo está formado de 4 subunidades α organizadas alrededor del poro del canal, (Snyders et al., 1999).

2.3.1.1 Filtro de selectividad

A pesar de la gran diversidad en la secuencia de aminoácidos en los segmentos transmembranales y los extremos N- y C- terminales de los diferentes canales Kv, todos ellos tienen una región de 19 aminoácidos conservada, llamada región poro (P) o segmento H5. Dentro de esta región y cerca de la boca extracelular del poro se encuentra un motivo de tres aminoácidos, Gly-Tyr(Phe)-Gly, encargado de distinguir entre los diferentes tipos de iones que pudieran difundir por el canal (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Papazian et al., 1991) (figura 5). Se ha observado que mutaciones en esta secuencia provocan la pérdida de selectividad del canal por el ión K^+ (Heginbotham et al., 1994; Aiyar et al., 1996).

A



B

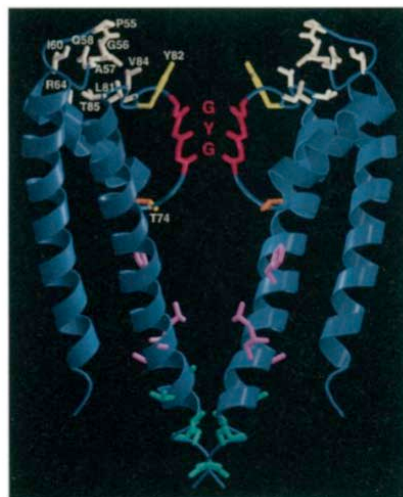
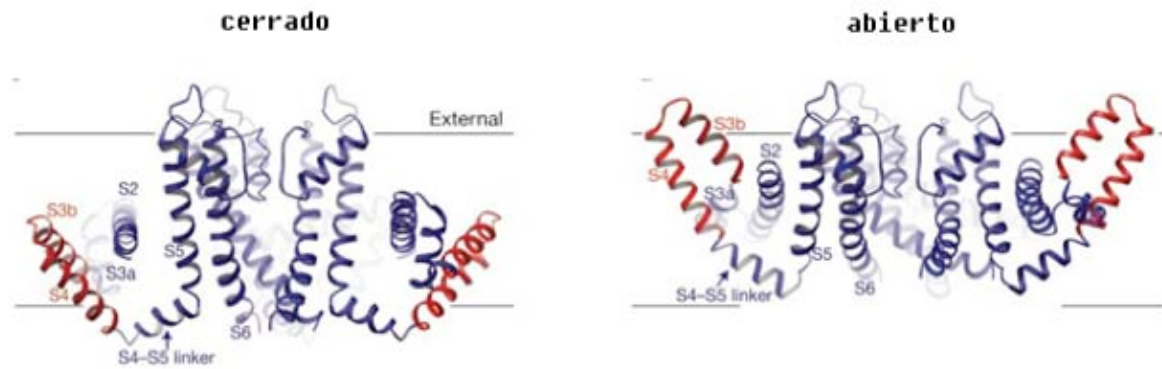


Figura 5. Filtro de selectividad de los canales Kv. A) alineamiento de los segmentos S5- P-56 de diferentes canales de K^+ . En fondo rojo se resalta un motivo con la secuencia Gly-Tyr(Phe)-Gly importante en el reconocimiento del ión que permea por el canal. B) posición de este motivo en el poro del canal Shaker, (Doyle et al., 1998).



Figurara 7. Esquema del movimiento del sensor de voltaje (*S4*) durante la apertura de los canales Kv. Las líneas grises representan la membrana celular, en color rojo se muestra el sensor de voltaje. Durante el estado cerrado (figura izquierda) el segmento *S4* se encuentra orientado al interior de la membrana celular, mientras que en el estado abierto (figura derecha) el segmento *S4* es desplazado hacia el exterior celular, en este movimiento los segmentos *S5* y *S6* se reorientan favoreciéndose la apertura del canal de potasio, (Jiang et al., 2003).

2.3.1.3 Mecanismo de inactivación

Como respuesta a una despolarización prolongada de membrana los canales de potasio dependientes de voltaje restringen el movimiento de iones a través del poro mediante el proceso de inactivación. En estos canales se distinguen dos tipos de inactivación, tipo N y tipo C. Mientras que la inactivación tipo N ocurre en los primeros milisegundos después de la apertura, la inactivación tipo C es más lenta.

Inactivación tipo N

En las primeras aproximaciones al estudio de la inactivación tipo N que se dio tanto en canales de Na^+ como de K^+ , se vio que ésta podía ser eliminada por acción de proteasas en el lado intracelular, que era mimetizada por derivados del tetraetilamonio (TEA) y que tenía cierta dependencia de voltaje. Estos primeros estudios desembocaron a finales de los años setenta en el modelo de “bola y cadena” (Armstrong y Bezanilla, 1977). Según este modelo la inactivación se produce por la existencia de una bola de inactivación que bloquea el canal por la parte interna del poro (Figura 8). El dominio de inactivación de los canales Kv se encuentra en los primeros veinte aminoácidos del extremo N terminal de la subunidad α y en las subunidades β reguladoras.

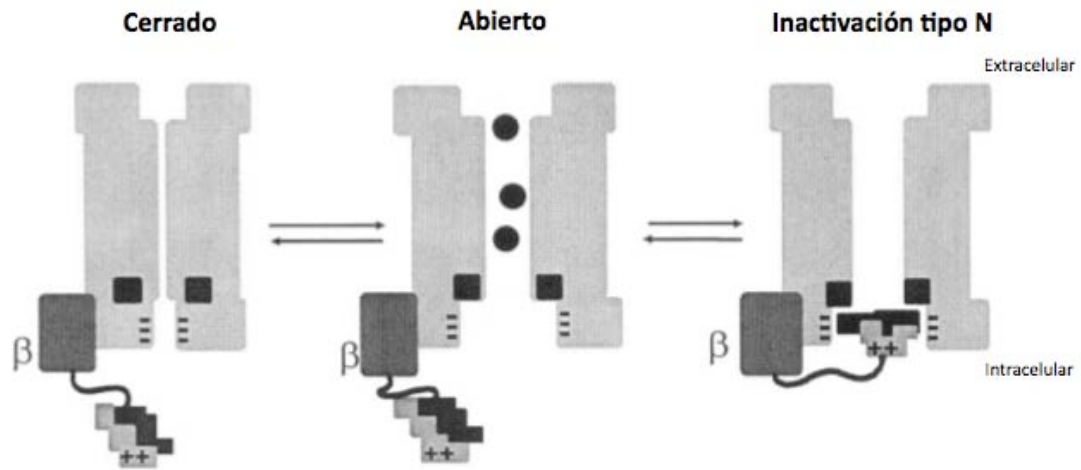


Figura 8. Inactivación tipo N de los canales Kv. Este tipo de inactivación está explicada por el modelo de “bola y cadena” en la que, una secuencia de 20 aminoácidos flexible ocluye intracelularmente el poro del canal, (Kukuljan et al., 1995).

Inactivación tipo C

La inactivación tipo C, además de ser más lenta que la tipo N, se origina por cambios conformacionales en la parte externa del poro tal como se representa en la figura 9 (Yellen et al., 1994; Liu et al., 1996). La inactivación depende de la ocupación de un lugar de unión para iones potasio en la parte externa al poro, de tal forma que este sitio ha de quedar libre para que la inactivación proceda. El aumento de la concentración extracelular de potasio o la presencia de TEA disminuyen este tipo de inactivación ya que en ambas condiciones existe una unión al lugar externo que estabiliza la salida de potasio. Se considera pues, que el filtro de selección actúa también como una compuerta con distintas conformaciones y que el sitio externo de unión al potasio favorece la no inactivación del canal (Yellen, 1998; Bemeche y Roux, 2005).

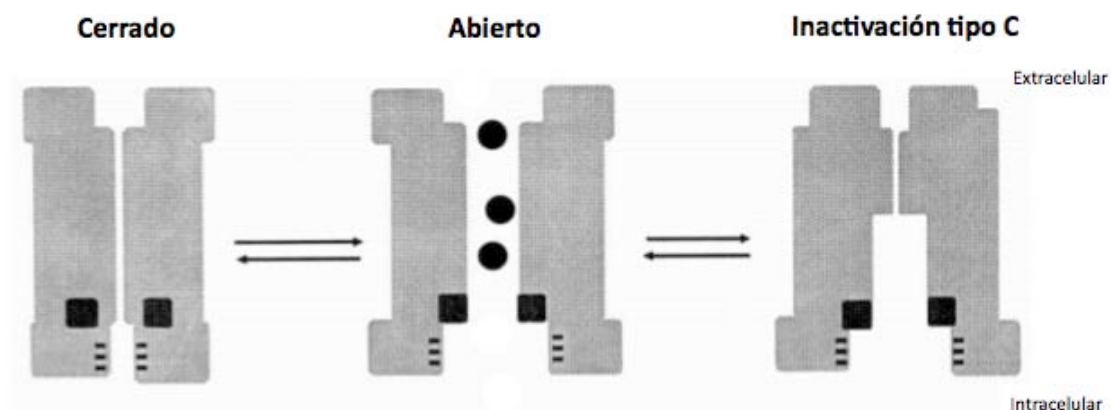


Figura 9. Inactivación tipo C de los canales Kv. Un cambio conformacional en la parte externa del poro del canal impide la fluctuación de iones al interior celular, (Kukuljan et al., 1995).

2.3.1.4 Subunidades auxiliares de los canales Kv

Junto a la subunidad α , puede o no encontrarse otra proteína conocida como subunidad β , la cual se encuentra ubicada en el citoplasma celular (figura 10). Las consecuencias funcionales del co-ensamble de una subunidad β a una subunidad α son varias, por ejemplo; la subunidad β puede interactuar con diferentes moduladores como Ca^{2+} , GMPc, AMPc y ATP, modificando las características eléctricas de la subunidad α confiriéndoles a ciertos canales Kv una inactivación rápida (Coetzee *et al.*, 1999; Tamargo *et al.*, 2003; Tamargo *et al.*, 2004). También se ha propuesto que la subunidad β podría estar incrementando la localización de la subunidad α en la membrana celular (Pongs *et al.*, 1999).

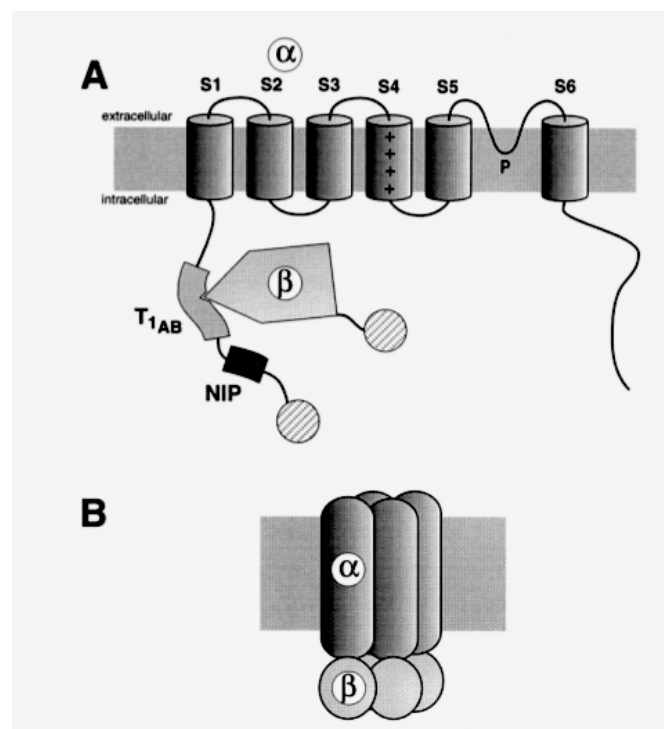


Figura 10. Ubicación de la subunidad β en los canales Kv. A) Representación de la subunidad β co-ensamblada al extremo N-terminal de la subunidad α . B) Ensamble tetramérico de la subunidad α como proteína integral de membrana asociada por la parte intracelular a una subunidad β bajo una relación estequiométrica 1:1, (Pongs *et al.*, 1999).

2.4 Canales Kv tipo ERG

A principios de los años noventa se identificó en mutantes de la mosca *Drosophila* una nueva familia de canales de potasio dependientes de voltaje a la que se llamó EAG (figura 11). Las mutantes mostraban un defecto en un tipo de canal de potasio cuyo fenotipo implicaba el temblor de las extremidades de la mosca, efecto parecido al provocado por el éter, razón por la cual, el canal responsable de dicho fenotipo se llamó ether-a-go-go (EAG), (Drysdale *et al.*, 1991; Warmke *et al.*, 1991). La identificación de este canal llevó a una búsqueda de canales relacionados y actualmente la familia EAG está formada de tres subfamilias: EAG, ERG (Ether a-go-go related gene) y ELK (*ether a-go-go like K⁺ channel*).

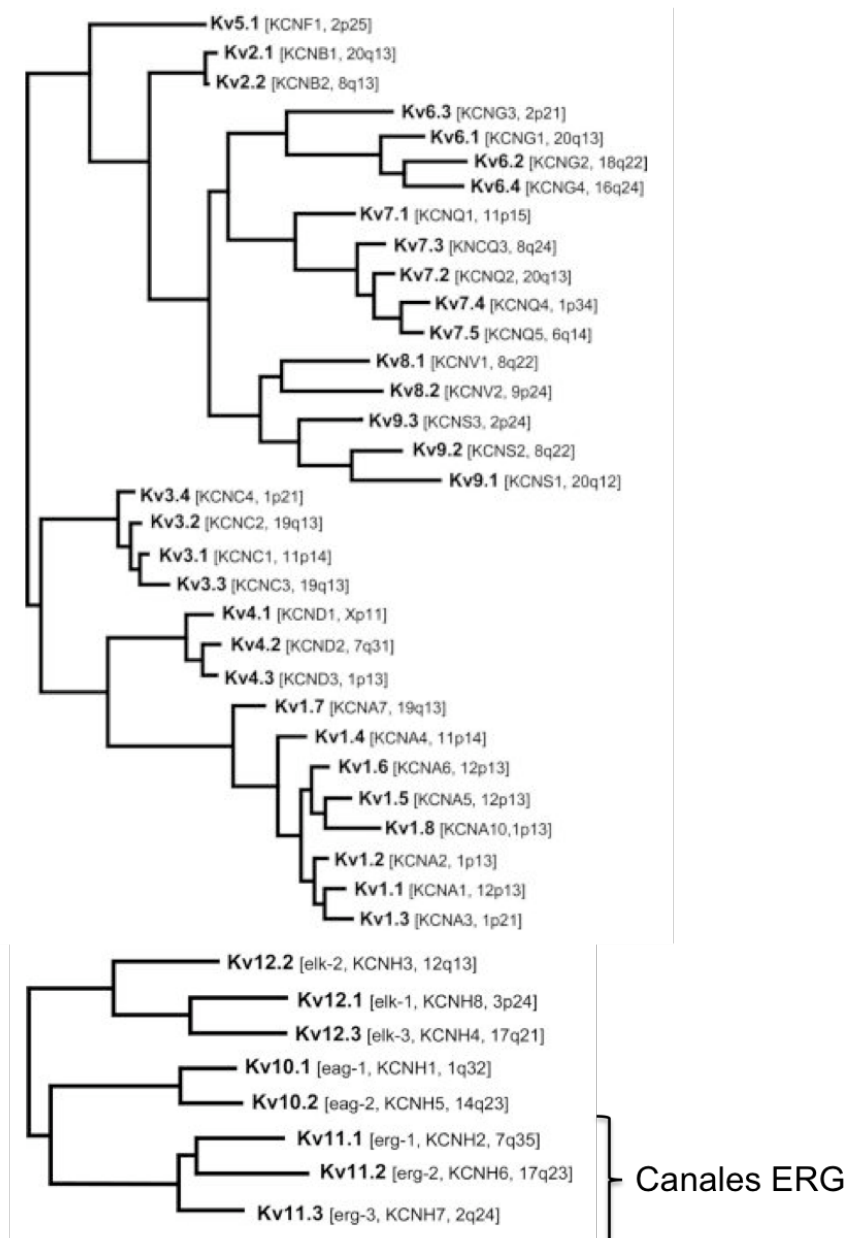


Figura 11. Árbol filogenético de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje. En paréntesis se muestra el nombre alternativo del correspondiente canal Kv, seguido del cromosoma en el que se localiza el gen del canal.

Esta tesis está enfocada en uno de los miembros de la familia EAG: los canales ERG, por lo que se detallarán algunas de sus características a continuación.

Los canales ERG al igual que los otros miembros de la familia de canales Kv son tetrámeros formados de 4 subunidades α organizadas alrededor de un poro central. Las diferencias que los distinguen del resto de los canales Kv son básicamente 3: 1) el tamaño de su segmento S5-P es más grande, 2) son rectificadores entrantes, es decir, limitan la salida de potasio a potenciales despolarizados y 3) tienen un sitio de unión a nucleótidos cíclicos. Diferencias explicadas a continuación:

En los humanos hasta ahora se conocen tres subtipos de canales ERG, nombrados hERG1, hERG2 y hERG3. El mejor estudiado ha sido hERG1, muchos investigadores han centrado su atención en conocer como se modula este canal dado el importante papel que tiene en el corazón donde se sabe son los responsables de mantener el potencial de acción cardiaco en reposo. Cualquier factor que incremente la duración del potencial de acción como puede ser una mutación en los canales hERG se manifiesta con una prolongación del intervalo QT del electrocardiograma, conllevando al padecimiento de arritmias cardiacas, enfermedad conocida como Síndrome de QT largo. Además estos canales han resultado ser blanco de fármacos como antiarrítmicos, antihistamínicos y antibióticos que bloquean sus corrientes de K⁺ y causan el síndrome de QT largo adquirido (Vandenberg 2001). Incluso, algunos medicamentos han sido retirados del mercado en diferentes países por este indeseable efecto (p. Ej. Astemizol, cisaprida, entre otros).

Se ha propuesto que la interacción del canal con los diferentes fármacos se debe a su estructura molecular. La mayoría de los canales que transportan el ión K⁺ tienen en la α -hélice del segmento S6 dos prolinas, inclinadas hacia el poro del canal, disminuyendo su lumen, pero el canal ERG carece de las prolinas, lo que hace que esta región del poro sea más amplia, facilitando su exposición a grandes moléculas. Por el contrario, tiene dos residuos aromáticos (tirosina y fenilalanina) que facilitan enlaces con moléculas aromáticas presentes en diversos fármacos capaces de bloquear el canal.

En la siguiente tabla se señalan algunos fármacos de uso frecuente que han sido asociados a la prolongación del intervalo QT (Roden DM., 2004; Viskin S. et al., 2003; www.qtdrugs.org). Es importante considerarlos porque muchos de ellos son administrados de manera crónica sin saber sobre los efectos secundarios que pueden estar causando.

<i>Fármacos de aplicación cardiológica</i>	Sotalol, amioderona, disopiramida, dobutamina, dopamina, flecainida, ibutilide, efedrina, norepinefrina, quinidina, amirionona.
<i>Fármacos de aplicación neuropsiquiátrica</i>	Amitriptilina, hidrato de cloral, citalopram, cloropromazina, doxepina, droperidol, fluoxetina, haloperidol, imipramina, litio, metadona, metifenidrato, paroxetina, oltanzapina, risperidona, tioridazina, ketanserina.
<i>Fármacos de aplicación gastroenterológica</i>	Cisaprida, domperidona, octreótida, ondansetrón, sibutramina, droperidol.
<i>Fármacos antimicrobianos</i>	Azitromicina, Ciprofloxacina, Claritromicina, eritromicina, clindamicina, levofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol.

Tabla 2. *Fármacos que prolongan el intervalo QT. Medeiros-Domingo et al., 2007*

Otro factor que ha causado impacto en el estudio de estos canales, es su relación con el ciclo celular, sugiriéndose su posible uso como marcadores moleculares en el diagnóstico y blancos terapéuticos en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se han encontrado transcritos de la isoforma I del canal hERG en

diferentes líneas celulares de tumores, como neuroblastoma, adenocarcinoma de glándula mamaria, leucemia monoblástica, entre otras (Arcangeli *et al.*, 1995 y Bianchi *et al.*, 1998).

Las otras dos isoformas de canales ERG fueron encontradas por primera vez por clonación de cDNA de ganglios cervicales superiores de rata (Shi *et al.*, 1997). Ambos canales se expresan principalmente en tejido neuronal en contraste con la expresión de ERG1, la cual se encuentra en un amplio rango de tejidos, principalmente corazón, pero también retina, intestino delgado y por supuesto SNC (Shi *et al.*, 1997; Saganich *et al.*, 2001; Papa *et al.*, 2003).

El papel fisiológico de los canales ERG en el SNC es incierto; el bloqueo de la corriente de estos canales en una línea celular de ganglios de la raíz dorsal de rata resultó en un incremento en la excitabilidad celular ante un estímulo mantenido de depolarización (Chiesa *et al.*, 1997), sugiriendo que los canales ERG contribuyen en el control de la excitabilidad neuronal.

Recientemente, los canales ERG2 y ERG3 también se han encontrado en órganos como el páncreas, particularmente en las células β , contribuyendo en la secreción de insulina (Mühlbauer *et al.*, 2007)

Pocos son los trabajos que reportan el papel fisiológico de la isoforma 3 de los canales ERG, uno de los más recientes, publicado en 2008 por un grupo canadiense muestra que los canales ERG3 se encuentran presentes en células intersticiales de Cajal (ICC), las cuales actúan como marcapasos del intestino, contribuyendo en los movimientos rítmicos del peristaltismo. En su investigación, este grupo utilizó un fármaco antiarrítmico (E-4013) a diferentes concentraciones para estudiar las corrientes de potasio de los canales ERG en el intestino, observando que la isoforma 3 es importante y la única que mantiene el potencial de membrana en reposo de las células ICC (White *et al.*, 2008).

Mucha de la información estructural y fisiológica que se conoce de los canales ERG1, ha sido en parte, resultado del uso de moléculas de diferente origen que tienen como receptor a estos canales. Sin embargo, poca información de las isoformas ERG2 y ERG3 se conoce hasta ahora, se sabe que estos dos subtipos se expresan en el SNC, pero cómo contribuyen específicamente en su actividad sigue siendo desconocido. Por esto se hace una necesidad recurrente contar con moléculas que faciliten el estudio biofísico de cada isoforma. Considerando que algunas de las moléculas con las que se cuenta para estudiar a estos canales se han obtenido de diferentes fuentes naturales, el veneno de diferentes animales ponzoñosos es una opción en la búsqueda de estas moléculas.

2.5 Fuentes naturales de moléculas con actividad en canales iónicos

A lo largo de la evolución diferentes especies animales han desarrollado mecanismos fisiológicos que les han permitido la sobrevivencia. Uno de los mecanismos más sofisticados y específicos lo constituyen las toxinas, compuestos presentes en el veneno de animales como alacranes, víboras, arañas, abejas, y anémonas.

Históricamente el estudio de la composición del veneno de estos animales, comenzó con el interés de encontrar los componentes responsables del daño físico y letal causado al hombre, con el fin de contrarrestar su toxicidad. Hoy se sabe que el veneno de estos animales ponzoñosos es una mezcla de proteínas, péptidos, carbohidratos, nucleósidos, cationes metálicos, como sodio, calcio y zinc y una gran cantidad de aminoácidos libres y lípidos. Las proteínas y péptidos comprenden el 90-95 % del peso seco del veneno. En su mayoría las proteínas son enzimas, por ejemplo; fosfolipasas, fosfodiesterasas, fosfomonoesterasas, oxidasas de L-aminoácidos, acetilcolinesterasas, hialuronidasas y enzimas proteolíticas. Los componentes tóxicos corresponden a la parte peptídica del veneno y pueden tener efecto neurotóxico, citotóxico, miotóxico y/o cardiotoxico (Dias da Silva y Kipnis, 2001).

2.5.1 Alacranes

Existen cerca de 1500 especies diferentes de alacranes en todo el mundo, su veneno es una mezcla rica de toxinas que afectan las funciones de diferentes canales iónicos tanto de células excitables como no excitables (Zhijian *et al.*, 2006). Se ha propuesto la existencia de cerca de 100,000 péptidos diferentes con diversa actividad biológica en estas 1500 especies, (Possani *et al.*, 2000, Rodríguez de la Vega y Possani 2005, Srinivasan *et al.*, 2002), sin embargo sólo cerca de 400 péptidos (0.4 %) del total han sido identificados (<http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/scorpion/>). La caracterización bioquímica que se ha hecho de estos péptidos indica semejanzas en cuanto a sus estructura terciaria, sin embargo poseen actividades biológicas particulares (Zhu *et al.*, 2004).

Para su estudio estas toxinas han sido clasificadas en diferentes familias en base a criterios como: 1) especificidad en diferentes animales (mamíferos, insectos y crustáceos); 2) receptores sobre los que actúan (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}); 3) longitud de su estructura primaria (cadenas cortas y largas); 4) presencia de puentes disulfuro; 5) mecanismo de acción (neurotoxinas y citotoxinas) y 6) sitio de unión a su receptor (toxinas tipo α o β).

Las toxinas que actúan sobre canales de K^+ son péptidos de cadena corta, de 20 a 70 aminoácidos estabilizados por 3 o 4 puentes disulfuro (Rodríguez de la Vega y Possani, 2004), los cuales en los venenos de los alacranes de la familia Buthidae se encuentran en baja concentración representando en el

veneno crudo el menor componente en un orden de 0.05 a 0.1 % (Legros y Martin-Eauclaire, 1997), y presentan especificidad sobre las diferentes subfamilias de canales de potasio.

La primera toxina de alacrán identificada con actividad en canales de K^+ fue la noxiustoxina también conocida como NTX (Possani *et al.*, 1982). Desde entonces cerca de 140 estructuras primarias de toxinas de K^+ y sus mecanismos farmacológicos han sido descritos (Cassulini, 2008; Corona *et al.*, 2002). Las toxinas de K^+ han sido clasificadas en 4 familias: α -KTx, β -KTx, γ -KTx y kappa-KTx (Tytgat *et al.*, 1999; Nirthanan *et al.*, 2005).

Dentro de la familia γ -KTx, se encuentran las toxinas bloqueadoras de canales de potasio tipo ERG. Actualmente se conocen más de 20 toxinas diferentes, sin embargo no todas ellas han sido caracterizadas bioquímica y/o farmacológicamente, la mayoría se han conocido por clonación de cDNA de un macerado de glándulas de diferentes alacranes del género *Centruroides* (Rodríguez de la Vega y Possani 2004).

La contribución creciente de numerosos grupos de investigadores en el estudio de aislamiento, purificación y caracterización bioquímica y farmacológica de las más diversas toxinas a partir de secreciones venenosas y cuerpo íntegros de especies tóxicas, permitirá: definir en gran medida su significación funcional en la ecofisiología de las respectivas especies, esclarecer en gran parte los procesos fisiológicos sujetos a la acción de receptores y canales sobre todo en los vertebrados y analizar su utilización potencial en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades en beneficio de la humanidad.

Por ejemplo, actualmente la forma sintética de la toxina ω -conotoxina, péptido aislado del veneno del caracol marino *conus magus* es utilizada como fármaco para calmar el dolor crónico. Otro ejemplo ha sido el uso de toxinas con acciones específicas sobre canales iónicos que han contribuido notablemente al conocimiento biofísico y farmacológico de los canales. Por ejemplo; la noxiustoxina (NTX) obtenida a partir del veneno del escorpión mexicano *ha sido utilizada* en la preparación de columnas de afinidad con el objetivo de aislar canales de K^+ de membranas axónicas de calamar, lo cual ha permitido el estudio de parámetros biofísicos del canal de K^+ (Prestipino *et al.*, 1989).

3. ANTECEDENTES

La primera toxina caracterizada bioquímicamente con actividad en canales de potasio tipo ERG se purificó a partir del veneno del alacrán *Centruroides noxius*. Esta toxina nombrada ErgTx es un péptido de 42 aminoácidos, con cuatro puentes disulfuro y de 4,757 Da (Gurrola *et al.*, 1999). Su estructura 3D fue resuelta por NRM, planteándose una estructura terciaria típica de las toxinas bloqueadoras de canales de K⁺ (figura 13), en las que la estructura está definida por la presencia de cisteínas que estabilizan un motivo α/β , en el que dos puentes disulfuro ligan covalentemente un segmento de la cadena α -hélice con una de las tres hojas β -plegadas presentes en estas toxinas (Torres *et al.*, 2003, a; Frénil *et al.*, 2004).

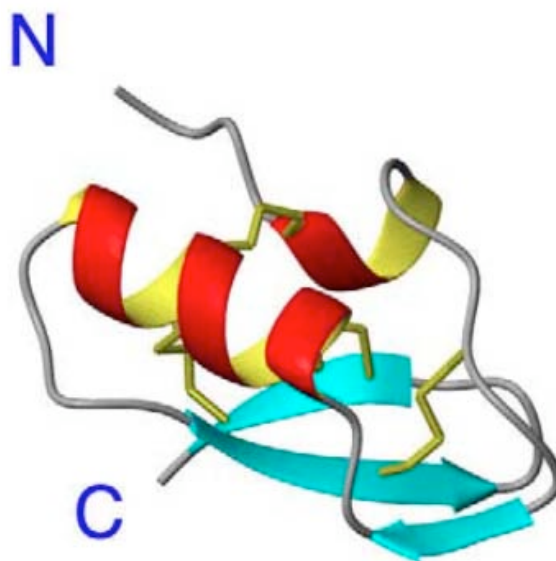


Figura 13. Estructura terciaria de la toxina ErgTx. La estructura comienza con un extremo N-terminal flexible que involucra los aminoácidos 3-7, se continúa con la primera hoja β -antiparalela que es corta y está formada por los residuos 14-15, en seguida se encuentra una α -hélice formada por los residuos 18-27 y finalmente se encuentran otras dos hojas β -antiparalelas definidas por los residuos 32-35 y 39-41, (Torres *et al.*, 2003a).

Una característica notable en la estructura de ErgTx es la presencia de un gran parche hidrofóbico, ubicado sobre las hojas β -plegadas y definido por residuos aromáticos como; K13, Y14, Y16, Y17, F36 y K38 y la presencia de un parche hidrofílico ubicado sobre la α -hélice formado por aminoácidos ácidos como; D1, D3, D7, S4, K8, R2 y R10. Se ha propuesto que estas regiones en la toxina son importantes en la interacción (parche hidrofóbico) y orientación de la toxina sobre el canal (parche hidrofílico).

Diferentes trabajos han elucidado la región de interacción del canal con la toxina, en el año 2002 Pardo-López *et al.*, trabajaron con quimeras del canal hERG y observaron que la interacción de la toxina se da con la región S5-P del canal (figura 14). Cambios puntuales de aminoácidos por cisteínas en la región S5-P permitieron identificar la importancia de 3 residuos: W585, G590 e I593 y un residuo en la región P-

S6: P632 para el bloqueo de la corriente de potasio por la toxina (Pardo-López et al., 2002b), (Figura 15).

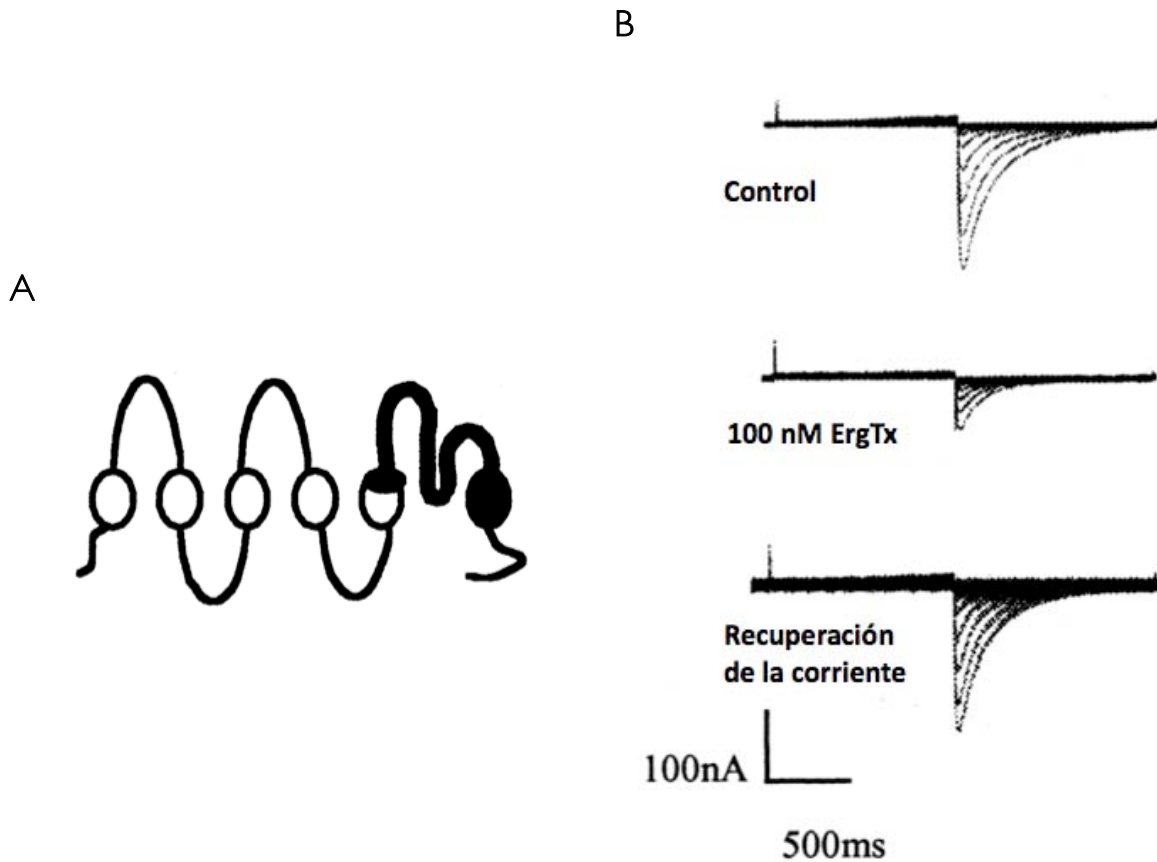


Figura 14. Efecto de la toxina ErgTx sobre una quimera del canal hERG. A) Representación del diseño de la quimera, en negro se resalta la parte que corresponde al canal hERG, en línea suave se muestra la región que corresponde al canal EAG (S1, S2, S3, S4 y parte del S5). B) Registros electrofisiológicos realizados con 100 μ g de la toxina ErgTx. La corriente de la quimera es bloqueada por la toxina reversiblemente, sugiriéndose que la región de interacción de la toxina se da con parte del segmento S5-P-S6. (Pardo-López et al., 2002a).

STRUC	S5	S5-P-linker	S5-P Linker	P-loop	P-S6link	S6
hERG1	WYATIGNMEQPHMDSRIG	WLNHIGDQIGKPYNSSGLG	G	SIKDKYV	DALYFTFSSLT	SVGFQNV
rERG1		H				PNTNSEKIF
hERG2		V-R-YLEHK	DS	V-L-R	G-DPAS	VQ
rERG2		P		A	Q	
hERG3		V-R-YLTDK	DS	Q	R-D-DSSS	
rERG3				T		

Figura 15. Comparación de la composición de aminoácidos del segmento S5-P y P-S6 de las tres diferentes isoformas de canales hERG y rERG. En fondo negro se muestran los aminoácidos importantes en la interacción de ErgTx y el canal hERG1, los cuales son: W585, G590 e I593 y están ubicados en el segmento S5-P y el aminoácido P632 ubicado en el segmento P-S6, (Restano-Cassulini et al., 2006).

Mediante estudios de dicroísmo circular, se determinó que la estabilidad de la α -hélice anfipática de los canales ERG disminuye con el incremento de temperatura de 22 °C a 37 °C, bajo estas condiciones se determinó la KD de ErgTx observándose un incremento de 7.3 nM a 22 °C hasta 64 nM a 37 °C (es decir la afinidad disminuía mientras la temperatura se incrementaba) y la proporción de los eventos de enlace que conducen al bloqueo del canal descendían del 70 % al 40 % sobre estos rangos de temperatura respectivamente, (Hill *et al.*, 2007). Los resultados de este trabajo sugieren también que la interacción de la toxina ErgTx con el canal ERG está dada en la región S5-P del canal.

Actualmente el número de toxinas que forman parte de la familia γ -KTx se ha incrementado considerablemente, algunas de estas toxinas han sido caracterizadas bioquímica y fisiológicamente a partir del veneno de diferentes alacranes, principalmente del género *Centruroides*. Los ejemplos más recientes son CeErg4 y CeErg5 aisladas del veneno de *C. elegans* (Restano-Cassulini *et al.*, 2008), otras han sido identificadas por clonación de cDNA del veneno de diferentes alacranes del género *Centruroides* (Corona *et al.*, 2002).

Datos recientes no publicados de nuestro laboratorio efectuados con veneno del alacrán *C. gracilis* colectados en el estado de Puebla (Venustiano Carranza) han demostrado que este veneno tienen componentes que afectan los canales hERG1, hERG2 y hERG3, como se indica en la tabla 3 abajo, (Restano-Cassulini, Cázares-Ordóñez, Gurrola y Possani - datos no publicados).

	rERG1	rERG2	rERG3	hERG1	hERG2	hERG3
Fracción 20-30 min.	50% de bloqueo con total recuperación de la corriente	Bloque lento del 80% con recuperación lenta e incompleta, 60%.	No efecto	No efecto	No efecto	Bloqueo total, rápido y reversible

Tabla 3. Efecto electrofisiológico de la fracción 20-30 min. de HPLC de veneno de *C. gracilis* sobre las diferentes isoformas de canales ERG tanto de rata (*r*) como de humano (*h*). La fracción se probó a una concentración de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sobre células CHO que expresaban cada uno de los tres subtipos de canales ERG.

4. HIPÓTESIS

El veneno de los alacranes del género *Centruroides* contiene péptidos bloqueadores reversibles de las corrientes de K^+ de los canales hERG1. Un estudio preliminar de nuestro laboratorio, mostró que el veneno del alacrán *C. gracilis* además, tiene actividad reversible sobre la isoforma hERG3, con base en este estudio, consideramos posible purificar el (los) componente (s) responsable (s) del bloqueo de los canales hERG3.

5. OBJETIVO GENERAL

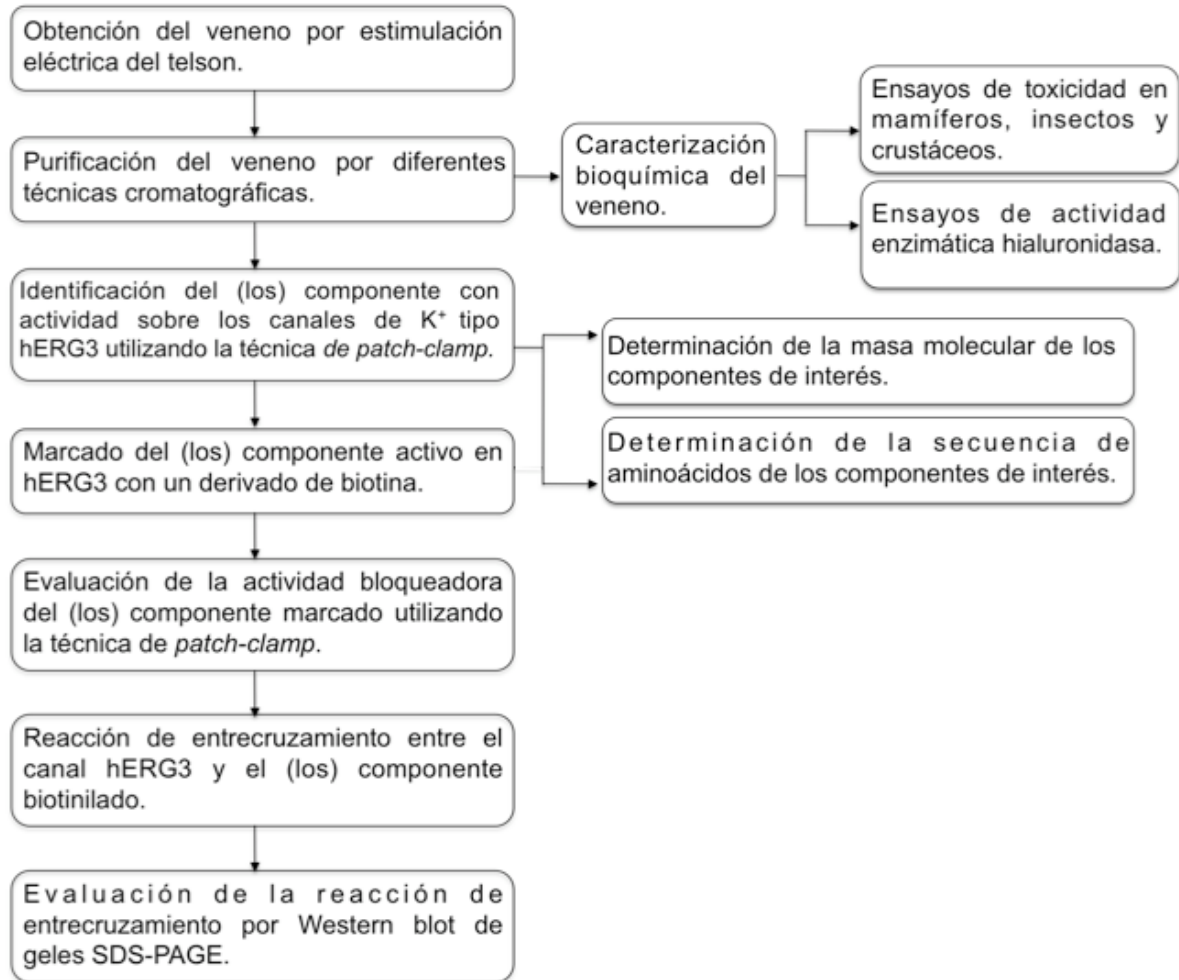
Analizar bioquímicamente los componentes del veneno del alacrán *C. gracilis*, enfocándonos principalmente en el (los) componente (s) que tengan actividad sobre el canal de potasio hERG3 y marcarlo para ser utilizado como sonda molecular.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Purificar el veneno del alacrán *C. gracilis* por diferentes técnicas cromatográficas
2. Caracterizar bioquímicamente los principales componentes del veneno del alacrán *C. gracilis*.
3. Caracterizar toxicológicamente el veneno del alacrán *C. gracilis* contra tres organismos diferentes: mamíferos (ratones), insectos (grillos), crustáceos (acociles).
4. Aislar del veneno del alacrán *C. gracilis* el (los) componente (s) que bloquea la corriente de K^+ de los canales hERG3, mediante diferentes tipos de cromatografía.
5. Marcar el (los) componente (s) que bloquea la corriente de K^+ de los canales hERG3 con un derivado de biotina (Biotina-7-NHS).
6. Evaluar la actividad biológica del componente marcado mediante la técnica de *patch-clamp*.
7. Utilizar el (los) componente (s) marcado (s) como marcador (es) molecular (es) para el estudio de los canales hERG3, por ejemplo su distribución en un tejido u órgano.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El siguiente diagrama muestra de manera general el esquema de trabajo propuesto para cubrir los objetivos planteados en el proyecto. En el apartado de materiales y métodos se desarrollan las técnicas planteadas en este diagrama.



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Obtención de veneno

Los alacranes de los cuales se obtuvo el veneno para el desarrollo de este proyecto, como he mencionado anteriormente provinieron del municipio de Venustiano Carranza, ubicado al noreste del Estado de Puebla. En el laboratorio los alacranes se mantuvieron de manera individual en cajas plásticas y su alimentación se basó en insectos (grillos) y agua.

El veneno se extrajo por estimulación eléctrica del telson (último segmento de la cola del alacrán). El fluido extraído se resuspendió en agua tetradestilada hasta quedar totalmente disuelto y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La parte soluble se separó y se cuantificó por absorbancia a 280 nm (una unidad de absorbancia equivale a una concentración de 1 mg·mL⁻¹ de proteína), finalmente se liofilizó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

8.2 Purificación del veneno

La purificación del veneno se realizó mediante el uso de tres tipos de cromatografía: 1) exclusión molecular, 2) intercambio iónico, y 3) cromatografía líquida de alta presión (HPLC, "High pressure liquid chromatography").

1) Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó una columna de vidrio de 2 m de altura x 0.9 cm de diámetro, empacada con Sephadex G50 y equilibrada con 20 mM de acetato de amonio pH 4.7. La elución se hizo a un flujo de 25 mL·hora⁻¹, utilizando un volumen final de 200 mL de 20 mM de acetato de amonio pH 4.7. El eluato fue colectado en fracciones de dos mililitros y éstas fueron cuantificadas por absorbancia a 280 nm.

Cromatografía de intercambio iónico

Se utilizó una columna de vidrio de 30 cm de alto x 0.9 cm de diámetro, empacada con un intercambiador catiónico, carboximetilcelulosa (CMC), y equilibrada en buffer de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 (solución A). La muestra resuspendida en solución A se aplicó en la columna y se eluyó utilizando un gradiente lineal de 0 a 0.5 M de NaCl en solución A. La elución se hizo a un flujo de 25 mL·hora⁻¹, utilizando un volumen final de 500 mL (250 mL de buffer A y 250 mL de 0.5 M de NaCl en solución A). Al final la columna se eluyó con 50 mL de 1 M de NaCl en solución A. El eluato se colectó cada 2.5 mL y se cuantificó por absorbancia a 280 nm.

2) HPLC de fase reversa

Se utilizaron dos equipos: HPLC semipreparativo Waters 600E y HPLC analítico Waters 600. Para el HPLC semipreparativo se utilizó una columna C18 semipreparativa de fase reversa Vydac (Hysperia, CA, USA), mientras que para el HPLC analítico se utilizó una columna C18 analítica de fase reversa Vydac (Hysperia, CA, USA). La separación de las muestras se hizo utilizando diferentes gradientes de solución A y de solución B.

Solución A: agua tetradestilada + 0.12 % de ácido trifluoroacético

Solución B: acetonitrilo + 0.1% de ácido trifluoroacético

El eluato se colectó en base al perfil cromatográfico, el que fue graficado automáticamente en un graficador Waters 745B data module para el HPLC semipreparativo y un graficador Beckman 427 integrator para el HPLC analítico. Las muestras se secaron (SAVANT Speed Vac SCI 110) y almacenaron hasta su uso.

8.3 Ensayos de toxicidad

a) Insectos

Los ensayos de toxicidad se realizaron en grillos *Acheta domestica*, la dosis administrada fue de 30 μg de muestra por grillo (tres insectos por muestra), en un volumen de 30 μL de agua. La inyección se realizó entre el tercer y cuarto segmento abdominal y los animales se mantuvieron en observación durante 12 hrs. Se inyectó agua como control negativo.

b) Crustáceos

La toxicidad se ensayó en acociles colectados en la laguna el Texcal Jiutepec, Morelos. La dosis administrada fue 30 μg de muestra por acocil (tres acociles por muestra), en un volumen de 30 μL de agua. La inyección se realizó entre el tercer y cuarto segmento abdominal y los animales se mantuvieron en observación durante 12 hrs. Se inyectó agua como control negativo.

c) Mamíferos

Las pruebas de toxicidad se hicieron en ratones cepa CDI de sexo indistinto y de 20 g de peso proporcionados por el Bioterio-IBT. Se administraron intraperitonealmente 100 μg de proteína por animal en un volumen de 100 μL de agua (un animal por muestra). Los ratones se mantuvieron en observación durante 12 h. Se inyectó agua como control negativo.

8.4 Actividad Enzimática (hialuronidasa)

La actividad enzimática hialuronidasa se determinó utilizando dos métodos diferentes: 1) protocolo descrito por Di Ferrante, 1955 y 2) protocolo descrito por Cevallos *et al.*, 1992.

- Protocolo 1: Método turbidimétrico

Se prepararon dos soluciones, 1) ácido hialurónico a una concentración de 0.4 mg mL⁻¹ en buffer de 100 mM de fosfato de sodio pH 5.8 conteniendo 150 mM de NaCl y 2) hexadecilpiridino al 10 % en agua tetradestilada. La cantidad de proteína ensayada fue de 4 µg para el caso de veneno y 2 µg o menos de fracción de veneno purificado. Cada una de las muestras se trabajó por duplicado.

Se puso en un tubo de ensayo la muestra en un volumen final de 50 µL de solución amortiguadora de fosfatos, se adicionaron 50 µL de la solución de ácido hialurónico, se mezclaron y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 20 min. Posterior a este tiempo la actividad enzimática se detuvo calentando en baño María durante 5 min. El tubo se enfrió a temperatura ambiente y se le adicionaron 250 µL de hexadecilpiridino al 10 %, el tubo se agitó y después de 10 min., se determinó la absorbancia a 540 nm. Finalmente se graficaron los datos de concentración de ácido hialurónico versus A₅₄₀.

Para determinar la cantidad de ácido hialurónico de la muestra se realiza a la par una curva de calibración de la siguiente manera:

Tubo	Solución de ácido hialurónico (µL)	Solución	
		amortiguadora pH 5.8 (µL)	[ácido hialurónico] (mg/mL)
A	50	50	0.2
B	40	60	0.16
C	30	70	0.12
D	20	80	0.08
E	10	90	0.04
F	0	100	0.0

Tabla 4. Curva de calibración para determinar la cantidad de ácido hialurónico hidrolizado.

- Protocolo 2: Geles de actividad enzimática hialuronidasa.

Se preparó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE siguiendo la metodología descrita por Laemmli, 1970, copolimerizado con 0.5 mg mL⁻¹ de ácido hialurónico (Cevallos *et al.*, 1992). Las muestras de interés se separaron bajo corriente constante 15 miliamperios. Después de la electroforesis el gel se incubó con una solución amortiguadora 100 mM de NaH₂PO₄ pH 5.8, conteniendo 150 mM de NaCl y 5% Tritón

X-100 por dos horas. Durante este tiempo el gel se lavó tres veces con el mismo amortiguador pero disminuyendo la concentración de TritónX-100 hasta 0. Posteriormente el gel se tiñó por dos horas con 5% de formamida, 20% de isopropanol, 0.015 M de Tris-HCl pH 7.95 y 5 mL de 0.1% de "Stains all", sin exponerse a la luz. Finalmente, se destiñó con 5% de formamida, 20% de isopropanol y 15 mM Tris-HCl pH 7.95. Cada uno de los pasos se realizaron en agitación rotatoria a temperatura ambiente. La actividad de hialuronidasa se observó por la presencia en el gel de una banda de degradación.

8.5 Electroforesis

El protocolo seguido para la técnica de electroforesis es el citado en Schagger y Jagow, 1987. Las muestras se separaron en geles discontinuos de 16.5, 10 y 4 % de poliacrilamida. La proteína se detectó utilizando azul de Coomassie (Neuhoff *et al.*, 1981) y tinción con plata siguiendo el protocolo descrito en Switzer *et al.*, 1979. El marcador de peso molecular utilizado fue de 6,5 a 175 KDa (Bio-Labs).

8.6 Secuenciación

La secuencia N-terminal que involucró los primeros 22 aminoácidos fue obtenida por degradación automática de Edman, en un secuenciador de aminoácidos Beckman LF (Palo Alto CA, USA), siguiendo el protocolo citado por Zamudio *et al.*, 1997. La secuencia completa se obtuvo por hidrólisis del péptido con quimotripsina (Boehringer Mannheim, Germany). Antes de ser hidrolizado, el péptido fue reducido y alquilado, 50 μg de péptido se disolvieron en 200 mM de Tris-HCl, pH 8.6, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EDTA, 6 M de cloruro de guanidina y 1 mg de DTT, todo en un volumen final de 100 μL . Esta mezcla se incubó a 55 °C durante 45 minutos, pasado este tiempo a la mezcla se agregó 1 mg de iodoacetamida y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los productos de reacción se separaron por HPLC de fase reversa utilizando una columna analítica C18 y bajo un gradiente lineal de 0 a 60 % de solución B en 60 minutos. El péptido reducido y alquilado se disolvió en 100 mM de Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM de CaCl_2 y 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de quimotripsina, todo en un volumen final del 50 μL y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. Los productos de la hidrólisis se separaron por HPLC de fase reversa utilizando una columna C18 analítica y bajo un gradiente lineal de 0 a 60 % de solución B en 60 minutos. La secuencia C-terminal se obtuvo analizando cada uno de los productos de la hidrólisis por espectrometría de masas a través del sistema nano-LC/ESI-it/MS.

8.7 Análisis de masa molecular

Se determinó la masa molecular de los péptidos de interés a través del sistema nano-LC/ESI-it/MS, siguiendo el protocolo citado por Batista *et al.*, 2006.

8.8 Electrofisiología

Los ensayos electrofisiológicos fueron realizados por la Dra. Rita Restano-Cassulini mediante la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa, protocolo descrito en Restano-Cassulini *et al.*, 2008. Brevemente, se utilizaron células de ovario de hamster chino ("Chinese Hamster Ovary"), las que fueron cultivadas en medio de Dulbecco modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10 % de suero fetal bovino (Invitrogen) y mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Las células fueron transfectadas con 1 a 5 µg del plásmido pCDNA3.1 que contiene la secuencia codificante para el canal hERG3 y cotransfectadas con 0.2 µg de un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente. Para la transfección se utilizó lipofectamina (Invitrogen). Los ensayos electrofisiológicos se realizaron entre las 24 y 72 hrs. de haberse iniciado la transfección de las células.

Durante los experimentos las células se mantuvieron en una solución extracelular estándar, que contenía: 130 mM de NaCl, 5mM de KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES-NaOH y 5 mM de D-glucosa, pH 7.4. Para los ensayos biofísicos las células se perfundieron con una solución externa en alto contenido de K⁺ ([K⁺] = 40 mM), en la cual el NaCl fue reemplazado por una cantidad equimolar de KCl. La solución de la pipeta contenía 130 mM de aspartato de potasio, 10 mM de NaCl, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de EGTA-OH, 10 mM de HEPES-OH y una concentración de Ca²⁺ de aproximadamente 50 nM, pH 7.3. La medición de las corrientes se hizo a temperatura ambiente usando un amplificador Axopatch 1D. El protocolo de pulsos consistió de una repolarización a -120 mV durante 500 ms seguida de una depolarización a 60 mV por 500 ms. Los registros fueron analizados mediante el programa pClamp7 (Molecular Device, USA).

8.9 Biotinilización

Se utilizó el estuche "Biotin Protein Labelling" de Roche y los reactivos se prepararon siguiendo las instrucciones del proveedor. El reactivo utilizado (biotina-7-NHS) es un derivado de biotina, que reacciona con los grupos amino de las proteínas. El péptido de interés (40 µg) se resuspendió en 50 µL de PBS pH 7.3 y se adicionó biotina-7-NHS en una relación molar 1:2 respectivamente. La mezcla se agitó con vortex y se incubó dos horas a temperatura ambiente. Los productos de reacción se separaron por HPLC analítico, utilizando una columna de fase reversa C18 Vydac (Hysperia, CA, USA) y un gradiente lineal de 0 a 60 % de acetonitrilo en 60 minutos.

8.10 Determinación de la constante de disociación

La curva dosis-respuesta para los canales hERG3 se construyó graficando el pico de cada corriente medida tras la aplicación de toxina nativa o toxina biotilada después de 100 s sobre células CHO que expresaban el canal hERG3. La corriente medida se normalizó con la corriente obtenida en el control. Los datos experimentales (una media de 3 a 6 células \pm SEM) fueron ajustados utilizando la ecuación de Hill:

$$I_T/I_{\max} = \{1 + ([T]/K_D)^n\}^{-1}$$

Donde I_{\max} es la corriente máxima; $[T]$ es la concentración de la toxina; I_T es la corriente a cierta $[T]$; K_D es la constante de disociación correspondiente a la $[T]$, la cual se estima para el 50 % de la corriente; n es el coeficiente de Hill.

8.11 Reacción de entrecruzamiento

Se cultivaron células CHO que expresaban transientemente canales iónicos hERG3 en cajas Petri de 100 x 15 mm, hasta presentar de 80 – 90 % de confluencia. Las células se mantuvieron en crecimiento en medio Dulbecco modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10 % de suero fetal bovino (Invitrogen) y mantenidas a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5 % de CO₂. Para la reacción de entrecruzamiento se utilizaron 2 cajas Petri (control y experimento), las células contenidas en cada caja se lavaron 2 veces con buffer de registro electrofisiológico (130 mM de NaCl, 5mM de KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES-NaOH y 5 mM de D-glucosa, pH 7.4.) Posteriormente a la caja control se adicionaron 400 μ L de amortiguador de registro electrofisiológico y a la caja experimento se adicionaron 5 μ g \cdot mL⁻¹ de toxina biotilada contenida en 400 μ L del mismo amortiguador. Ambas cajas se agitaron manualmente e incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ durante 15 minutos. Después de la incubación y bajo ausencia de luz, a cada caja se adicionó 0.25 mM de biperidil rutenio y 0.35 mM de persulfato de amonio se mezcló de manera manual y se expuso a la luz de un foco de 150 Watts a una distancia de 15 cm durante 10 s. Se retiró la mezcla de reacción de las cajas Petri y las células se lavaron 2 veces con PBS. Las células de cada una de las cajas Petri se lisaron utilizando 100 μ L de amortiguador de lisis adicionado con inhibidores de proteasas, utilizando la concentración recomendada por el proveedor, 1:25 (Complete, Roche). El lisado celular se colocó en un tubo eppendorf y se sonicó tres veces durante 10 s., posteriormente se sometió a una extracción con una mezcla de metanol-cloroformo. La cantidad de proteína obtenida del lisado celular se cuantificó utilizando el kit 2D Quant Dot y siguiendo las instrucciones del fabricante. Una cantidad de 50 μ g de lisado celular se separaron en geles SDS-PAGE al 8 %.

8.12 Western Blot

Para la electrotransferencia de proteínas se utilizaron membranas de nitrocelulosa de la marca Amersham Biosciences de 0,45 μm y una cámara de transferencia Semi Dry-Blotter CBS Scientific CO. El procedimiento fue el siguiente:

Se cortaron 10 tiras de papel filtro Whatman y una tira de membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel SDS-PAGE a transferir. Las tiras de papel filtro se pusieron en buffer de transferencia y la membrana de nitrocelulosa en agua tetradestilada durante 15 minutos. Se colocaron en la cámara de transferencia 5 papeles filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel y otros 5 papeles filtro, siguiendo ese orden. La electrotransferencia se hizo durante 1 hora a corriente constante y aplicando la siguiente relación $0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ de gel a transferir. Terminada la electrotransferencia la membrana se lavo en PBS 10 minutos y se bloqueó con Tween20 al 2 % en PBS durante 4 horas a temperatura ambiente, posteriormente la membrana se lavó tres veces de diez minutos cada lavado con PBS Tween 20 0,1 %. La membrana se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidada (1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavo tres veces, cada lavado de diez minutos con PBS 0.1 % de Tween20 y se detectó la actividad enzimática con un amortiguador de revelado que contenía 6 mg mL^{-1} de diaminobenzidina y $10 \mu\text{L}$ de H_2O_2 .

8.13 Modelado por homología de la toxina CgErgTxI

El modelo de la estructura tridimensional de la toxina CgErgTxI fue construido usando el programa Modeller 9v5 (Sali y Blundell., 1993), utilizando como templado las estructuras de ErgTx reportadas en el PDB como INE5 (Torres, AM., *et al*, 2003, a) y IPX9 (Frenal, K., *et al*, 2004), los cuales presentan 67% de identidad con respecto a la toxina problema. El modelo obtenido fue sometido a 100 rondas de minimización en UCSF Chimera (www.cgl.ucsf.edu/chimera). Los modelos fueron visualizados con Pymol v1.0r2 (DeLano, 2002).

9. RESULTADOS

9.1 Purificación del veneno de *C. gracilis*

La separación de los componentes del veneno del alacrán *C. gracilis* se realizó utilizando diferentes tipos de cromatografía. La primera de ellas implicó la separación del veneno por exclusión molecular. La segunda consistió en la separación de la fracción tóxica del veneno por cromatografía de intercambio iónico y finalmente el péptido de interés se aisló utilizando HPLC de fase reversa.

9.1.1 Filtración en gel Sephadex-G50

La purificación de 140 mg de veneno de *C. gracilis* por cromatografía de exclusión molecular puso de manifiesto la presencia de tres fracciones, cada una de ellas con moléculas diferentes evidenciadas por electroforesis (figura 16A y 16B). La fracción I contiene los componentes del veneno de alto peso molecular, como pueden ser enzimas. La fracción II quedó enriquecida con los componentes tóxicos del veneno, que se sabe por trabajos previos en el laboratorio son péptidos con actividad sobre canales iónicos y cuyas masas moleculares oscilan entre los 3,000 y 8,000 Da. En la fracción III se concentraron componentes de bajo peso molecular que no fueron resueltos en geles de poliacrilamida y/o componentes no peptídicos. El volumen equivalente a cada una de las fracciones se juntó y cuantificó por absorbancia a 280 nm, teniendo un rendimiento del 98.9 %. En la tabla 5 se resume el rendimiento de la purificación.

Fracción	Cantidad (mg)	Cantidad (%)
I	18.5	13.2
II	95.0	68.0
III	24.3	17.3
Total	138.5	98.9

Tabla 5. Recuperación de la purificación de veneno de *C. gracilis* por cromatografía de exclusión molecular.

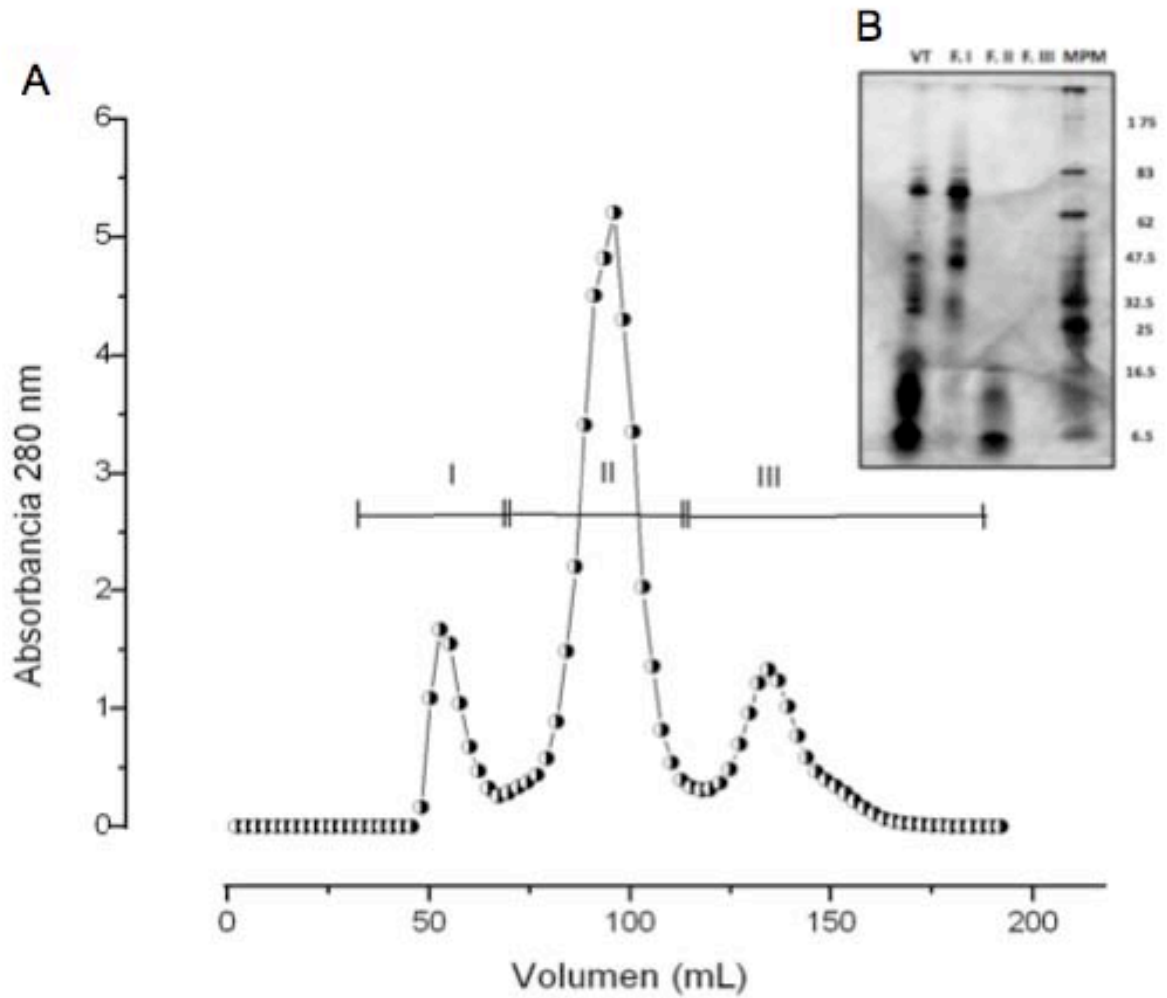


Figura 16. Perfil cromatográfico de la purificación de veneno de *C. gracilis* por exclusión molecular. A) Una cantidad de 140 mg de veneno en un volumen de 3 mL se cargó en una columna de 2m de altura por 0.9 cm de diámetro empacada con Sephadex-G50 y equilibrada en acetato de amonio 20 mM pH 4.7. La elución se hizo bajo un flujo de 20 mL·h⁻¹. Se obtuvieron tres fracciones FI, FII y FIII. B) Análisis de la composición de veneno y las fracciones de Sephadex-G50 por electroforesis en geles de gradiente de 10 % y 16.5 % de poliacrilamida. En el carril 1 se cargaron 40 µg de veneno, en los carriles 2, 3 y 4 se cargaron 10 µg de fracción I, II y III respectivamente. En el carril 4 se cargó un marcador de peso molecular cuyas bandas van de 175 KDa a 6.5 Da.

9.1.1.2 Cromatografía de intercambio iónico

La fracción II de exclusión molecular resuspendida en un volumen total de 130 mL y con 95 mg de proteína se separó por intercambio iónico en 15 fracciones denominadas F.II.1- F.II.15 (figura 17). El volumen correspondiente a cada fracción se juntó y cuantificó por absorbancia a 280 nm, la recuperación fue de 83 %, en la tabla 6 se muestra el reparto de la recuperación entre las 15 fracciones.

Fracción	Cantidad (mg)	%	Fracción	Cantidad (mg)	%
II.1	3.1	3.3	II.9	7.6	8.0
II.2	6.2	6.5	II.10	2.3	2.4
II.3	10.7	11.2	II.11	1.3	1.4
II.4	5.6	5.9	II.12	5.4	7.8
II.5	11.7	12.3	II.13	5.2	7.5
II.6	6.5	6.8	II.14	2.6	2.8
II.7	7.7	8.0	II.15	1.1	1.1
II.8	1.6	2.3	Total	79	83

Tabla 6. Recuperación de la purificación de veneno de *C. gracilis* por cromatografía de intercambio iónico.

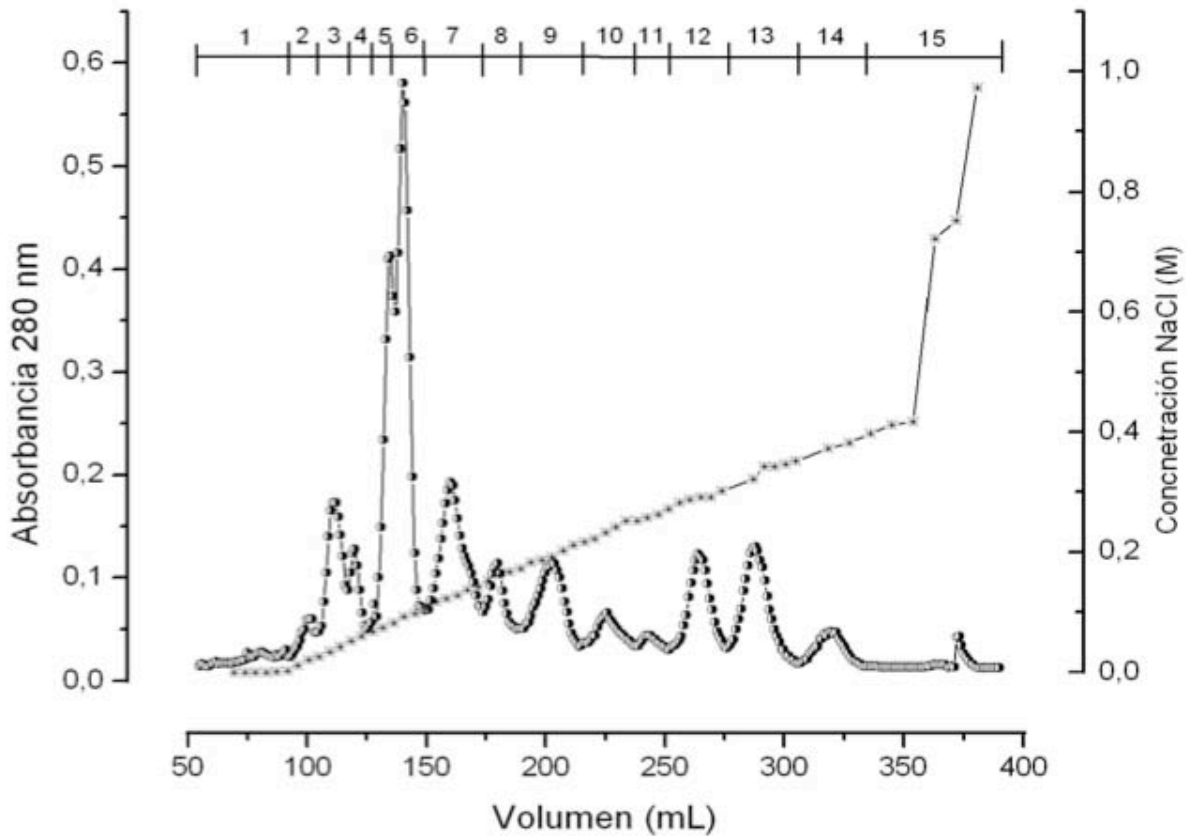


Figura 17. Perfil cromatográfico de la purificación de la F.II por cromatografía de intercambio iónico (CMC). Noventa y cinco mg de F.II en un volumen de 130 mL se cargaron en una columna de 30 cm de altura y 0.9 cm de diámetro empacada con carboximetilcelulosa y equilibrada en acetato de amonio 20 mM pH 4.7. La elución se hizo utilizando un gradiente lineal de 0 a 0.5 M de NaCl en el mismo amortiguador de equilibrio. Terminado el gradiente la columna se eluyó con 1.0 M de NaCl en buffer de equilibrio. El flujo utilizado durante toda la corrida fue de 25 mL·h⁻¹. La elución se repartió en 15 fracciones denominadas F.II.1 a F.II.15.

9.2 Análisis proteómico del veneno de *C. gracilis*

El veneno de *C. gracilis* se purificó por HPLC de fase reversa, separándose en 38 picos (figura 18), cada uno de los cuales se analizó por espectrometría de masas. La mayoría de los picos presentó más de una masa molecular, el número de componentes identificados, considerando el número de masas moleculares diferentes fue de 60 péptidos (tabla 7), algunos de los cuales fueron secuenciados por degradación automática de Edman, interesantemente encontramos que varios de ellos son péptidos parecidos a la noxiustoxina, también identificamos secuencias cuyo extremo N-terminal es típico de las toxinas erg-like, así como algunas secuencias que no coincidieron con las secuencias reportadas en las bases de datos (tabla 8).

El veneno de *C. gracilis*, es una mezcla compleja de compuestos de naturaleza peptídica, cuyas masas moleculares se concentran en péptidos de 3 a 5 KDa, representando más del 50% de los componentes del veneno. Seguidos en abundancia se encuentran péptidos de 7 a 8 KDa, siendo cerca del 35% del

veneno (figura 19). De los 38 picos analizados solo dos de ellos y eluidos al final de la corrida fueron péptidos de alto peso molecular (mayores a 20 KDa), sin embargo sus masas no pudieron ser identificadas con exactitud. Considerando que en estos picos se encontraba la actividad enzimática hialuronidasa, se ensayo su capacidad de hidrolizar ácido hialurónico, siendo ésta totalmente nula. Se sabe que el acetonitrilo tiene efecto desnaturalizante sobre la enzima hialuronidasa, por lo que se explica ausencia de actividad después de separar por HPLC de fase reversa.

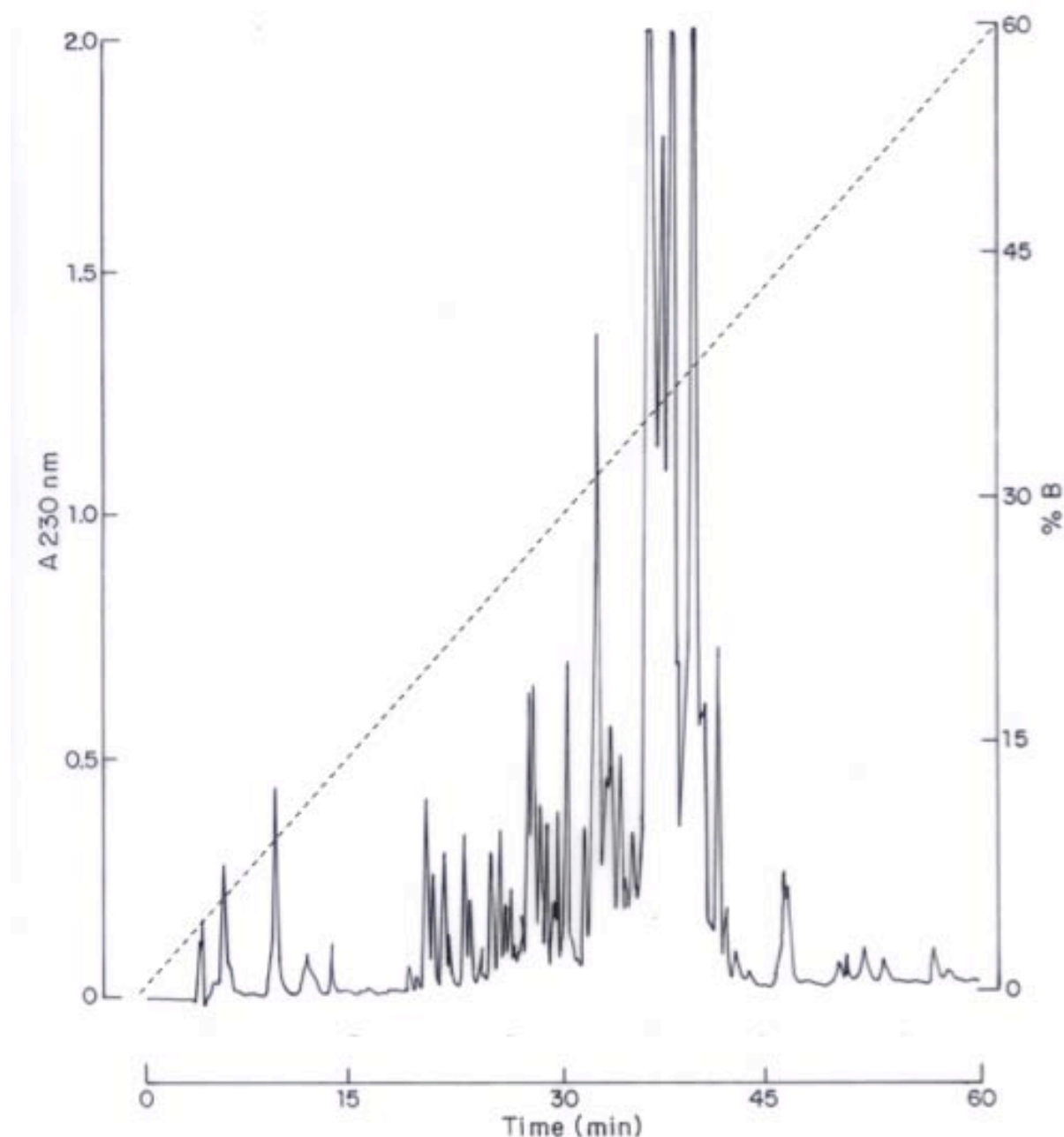


Figura 18. Perfil cromatográfico de la separación de veneno de *C. gracilis* por HPLC de fase reversa. Se separaron 2 mg de veneno utilizando una columna C18 analítica de fase reversa, bajo un gradiente lineal de 0 a 60% de solución B en 60 minutos. La elución se separó en 38 picos.

TR	Masa molecular (Da)	TR	Masa molecular (Da)
3.04	Indeterminado	31.04	4,048, 2,338
5.42	Indeterminado	32.62	3,025, 3,923, 4,048
11.55	Indeterminado	32.67	3,302, 3,025, 3,923, 4,048, 6,921
13.52	Indeterminado	33.31	3,884, 7,154
20.66	3,733	34.70	5,248, 7,013, 6,435
22.62	2,487 (696, 740, 780, 824)	35.68	
22.84	Indeterminado	36.67	6,962, 7,005
		37.58	
23.74	4,195, 4,304	38.75	6,864, 7,004, 7,234, 7,132
24.85	2,662	39.12	7,164, 7,564
25.64	3,307	39.68	6,947
26.44	4,196, 4,306, 4,088, 4,665	39.32	7,154
27.24	3120	40.48	7,213, 7,516, 7,672
27.76	4,062, 3,981, 3,960, 4,384	41.00	7,212
27.98	3,983, 4,384	41.90	7,042, 7,212, 7,227
28.65	7,148, 7,258, 7,020	43.02	6,085, 6,124, 5,870, 6,254
28.85	4,762, 4,785	45.02	6,737, 6,721, 6,752
29.25			
29.68	4,220	48.50	Alto peso molecular
30.41	6,218, 2,340	50.00	Alto peso molecular

Tabla 7. Análisis proteómico de los 38 picos eluidos en la separación del veneno de *C. gracilis* por HPLC de fase reversa.

TR	Masa	Secuencia de aminoácidos N-terminal	Parecido con toxinas reportadas
23.74	4,195	IVINVKCTSPNQC...	Noxius toxina-like
26.44	4,665	ARDSCVNKSRQKYGNQ...	Erg-like
27.76	4,384	GTNSCVNKSGCAKYGYATCQACCK...	Erg-like
27.98	3,983	TFINHKCKSGXEXYGACXAE...	Nonius toxina-like
28.85 29.25	4,785	DFIAV... y DRD...	Desconocida y nonius-like
29.68	4,220	TVIDV...	Noxius-like
39.68	6,947	VADDYECNDSEGIRG...	Desconocida

Tabla 8. Secuencia N-terminal de algunos péptidos del veneno de *C. gracilis*. En negritas se resaltan los TR en los que se encontraron las masas moleculares de los péptidos caracterizados: péptido bloqueador de canales hERG3 y péptido letal en acociles.

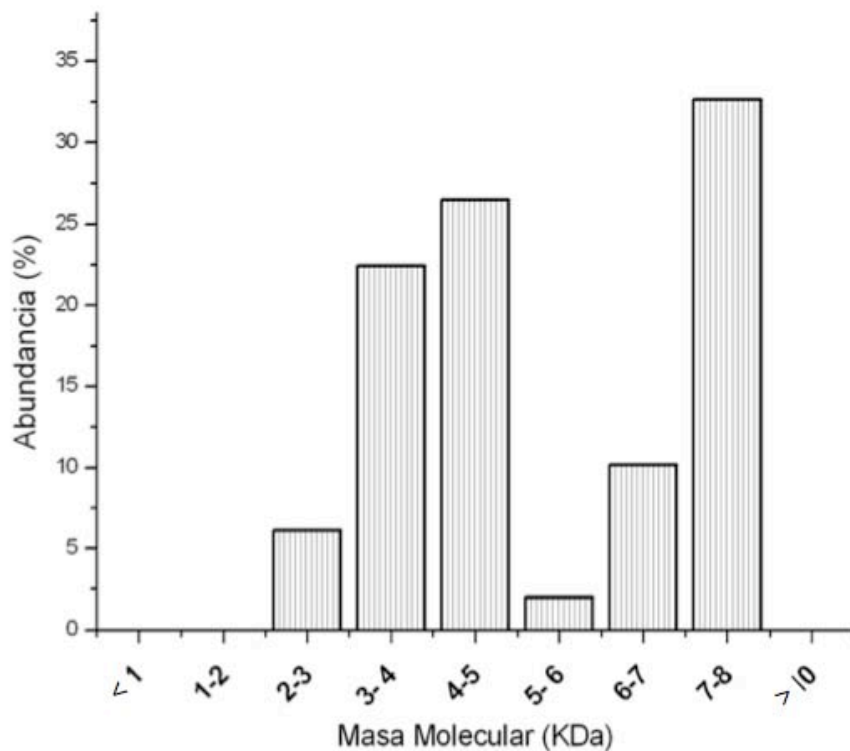


Figura 19. Agrupación de los componentes del veneno de *C. gracilis* por su masa molecular.

9.3 Toxicidad del veneno de *C. gracilis*

La toxicidad de las fracciones I, II y III se ensayó en ratones cepa CDI. Se inyectó vía intraperitoneal 100 μg de fracción por 20 g de peso de ratón. A diferencia del veneno de la mayoría de los alacranes del género *Centruroides*, el veneno de *C. gracilis* no parece contener péptidos tóxicos que pudieran representar un peligro para la salud humana, en los ensayos de toxicidad con las concentraciones de proteína usadas ninguna de las fracciones causó alguno de los síntomas característicos por intoxicación con veneno de alacrán: espasmos, dificultad respiratoria, salivación, convulsiones parálisis de los miembros y muerte. En la tabla 9 se resume el efecto de cada una de las tres fracciones obtenidas por exclusión molecular.

Fracción	Dosis	Efecto
F.I	100 μg / 20 g de peso	No tóxica
F.II	100 μg / 20 g de peso	No tóxica
F.III	100 μg / 20 g de peso	No tóxica

Tabla 9 Efecto tóxico de las fracciones I, II y III en ratones CDI.

Fracción	Dosis	Efecto	Fracción	Dosis	Efecto
F.II.1	30 μg /animal	Sin actividad	F.II.9	30 μg /animal	Tóxica en grillos
F.II.2	30 μg /animal	Letal en grillos	F.II.10	30 μg /animal	Tóxica en grillos
F.II.3	30 μg /animal	Letal en grillos	F.II.11	30 μg /animal	Sin actividad
F.II.4	30 μg /animal	Letal en grillos	F.II.12	30 μg /animal	Sin actividad
F.II.5	30 μg /animal	Tóxica en grillos	F.II.13	30 μg /animal	Sin actividad
F.II.6	30 μg /animal	Tóxica en grillos	F.II.14	30 μg /animal	Sin actividad
F.II.7	30 μg /animal	Tóxica en grillos	F.II.15	30 μg /animal	Sin actividad
F.II.8	30 μg /animal	Letal en acociles			

Tabla 10. Efecto tóxico de las fracciones FII.1 – F.II.15 de carboximetilcelulosa en insectos (grillos) y crustáceos (acociles). La sintomatología observada fue la siguiente: "sin actividad" significa comportamiento similar a la inyección con agua; "tóxico" significa que el animal se mostró agitado, tuvo problemas de equilibrio, mostró parálisis ligera pero se recuperó dentro de las primeras 24 horas; "letal" significa que además de los síntomas tóxicos mostró parálisis total y murió dentro de las 24 horas de haberse inyectado la muestra.

La toxicidad de las fracciones F.II.1 – F.II.15 de carboximetilcelulosa, se ensayó en insectos (grillos) y en crustáceos (acociles), a una dosis de 30 µg por animal y la inyección se hizo en el segundo segmento abdominal de los animales. Se encontraron varias fracciones tóxicas en grillos, pero únicamente letales las fracciones: F.II.2, F.II.3, F.II.5, F.II.6, F.II.7 y F.II.8. La fracción F.II.8 fue la única letal en acociles (tabla 10).

9.4 Caracterización bioquímica del péptido tóxico en acociles.

La fracción F.II.8 tóxica en acociles se purificó por HPLC de fase reversa, los picos más abundantes se inyectaron en acociles, probando 5, 4, 3, 2 y 1 µg de muestra respectivamente, con el fin de determinar la dosis mínima letal. Únicamente se identificó un componente tóxico, que corresponde al tiempo de retención 40.42 del perfil cromatográfico de la separación de la fracción F.II.8 (figura 20), este péptido representa el 0.07 % del veneno soluble (tabla 12). Y tiene una masa molecular que corresponde a 6,947 Da y un extremo N-terminal VADDYECNDSEGIRG... (tabla 11).

Muestra	Cantidad	%
Veneno de <i>C. gracilis</i>	140 mg	100
Cg 40.42	100 µg	0.07

Tabla 11. Abundancia en el veneno soluble de *C. gracilis* del péptido letal en acociles.

Toxina	Secuencia de aminoácidos	Masa molecular experimental
Cg40.42	VADDYECNDSEGIRG...	6,947

Tabla 12. Secuencia N-terminal de la toxina denominada Cg40.42, proveniente de la fracción F.II.8. La secuencia se obtuvo por degradación automática de Edman.

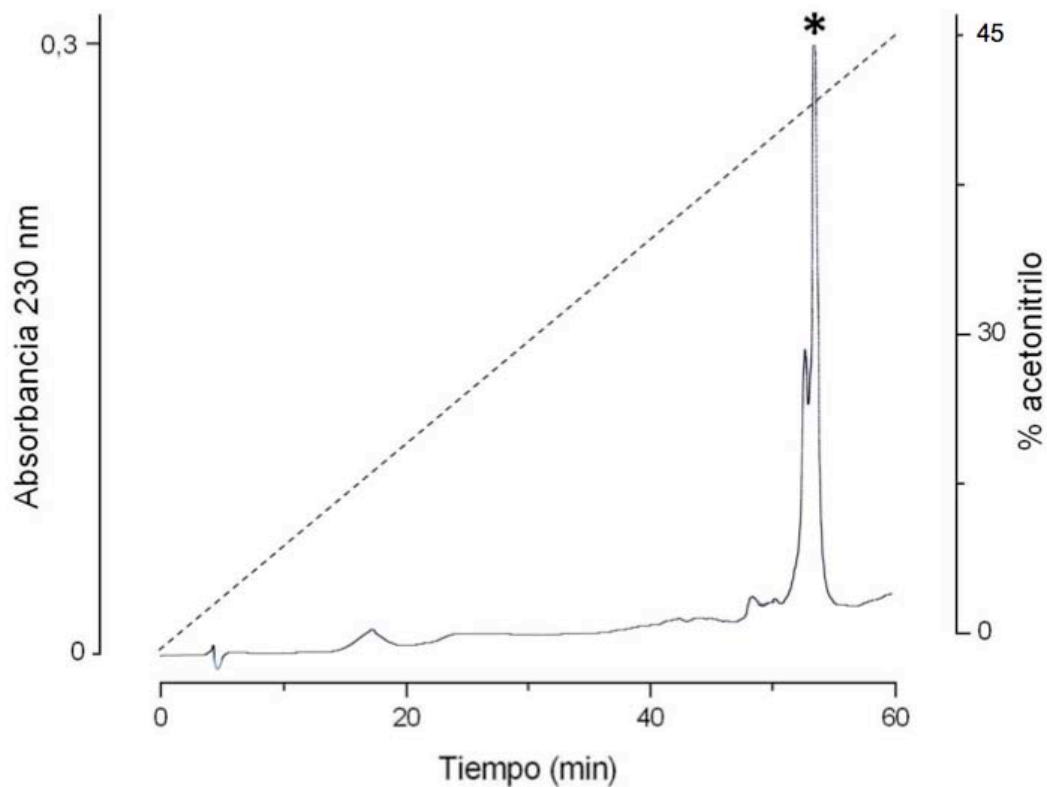
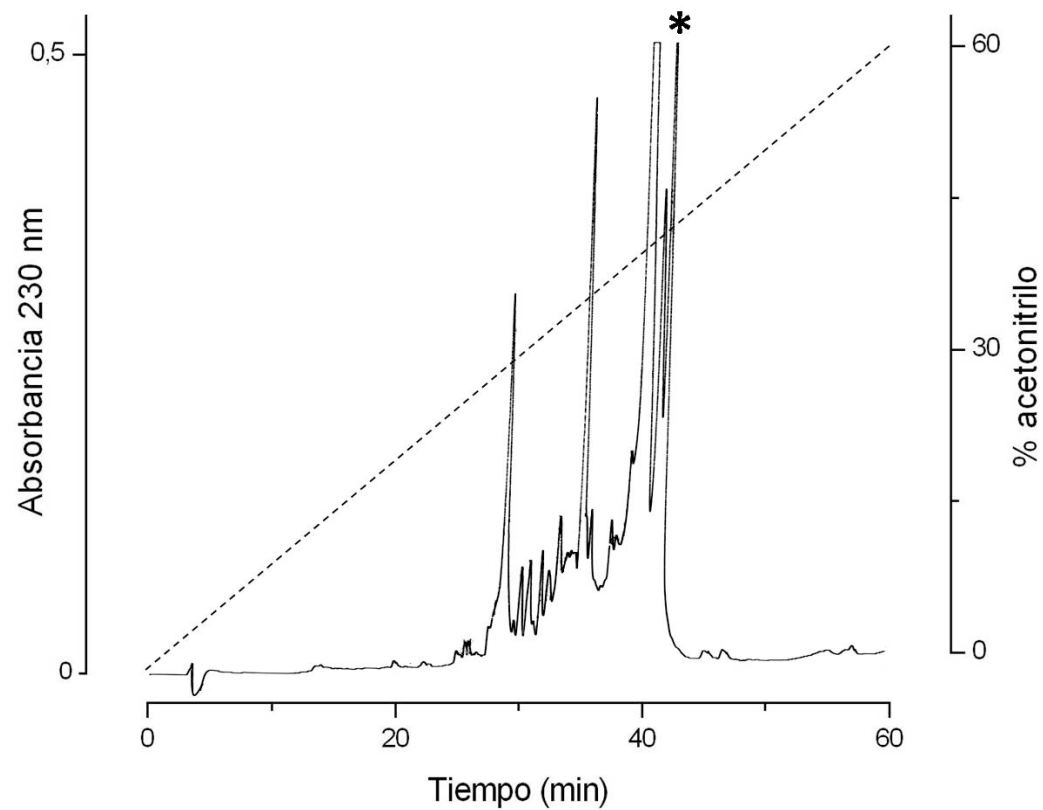


Figura 20. Perfil cromatográfico de la repurificación del péptido letal en acociles por HPLC de fase reversa. Arriba, separación de la fracción F.II.8 Se utilizó un gradiente lineal de 0-60 % de acetonitrilo en 60 min. El pico marcado con un asterisco correspondiente al TR 40.42 tuvo efecto letal en acociles. Abajo, repurificación del pico 40.42. Se utilizó un gradiente de 0-45 % de acetonitrilo en 60 min. El pico marcado con un asterisco tuvo efecto letal a una dosis de 1 μ g por acocil.

9.5 Actividad enzimática hialuronidasa

En el veneno de *C. gracilis* se encontró actividad enzimática hialuronidasa. Cuando el veneno se purifica por exclusión molecular, la actividad enzimática hialuronidasa se concentra en la fracción F.I (figura 21A). Mediante ensayos de hidrólisis in situ en un gel SDS-PAGE co-polimerizado con ácido hialurónico se identificó en la fracción F.I una banda de 45 KDa con actividad enzimática hialuronidasa (figura 21B).

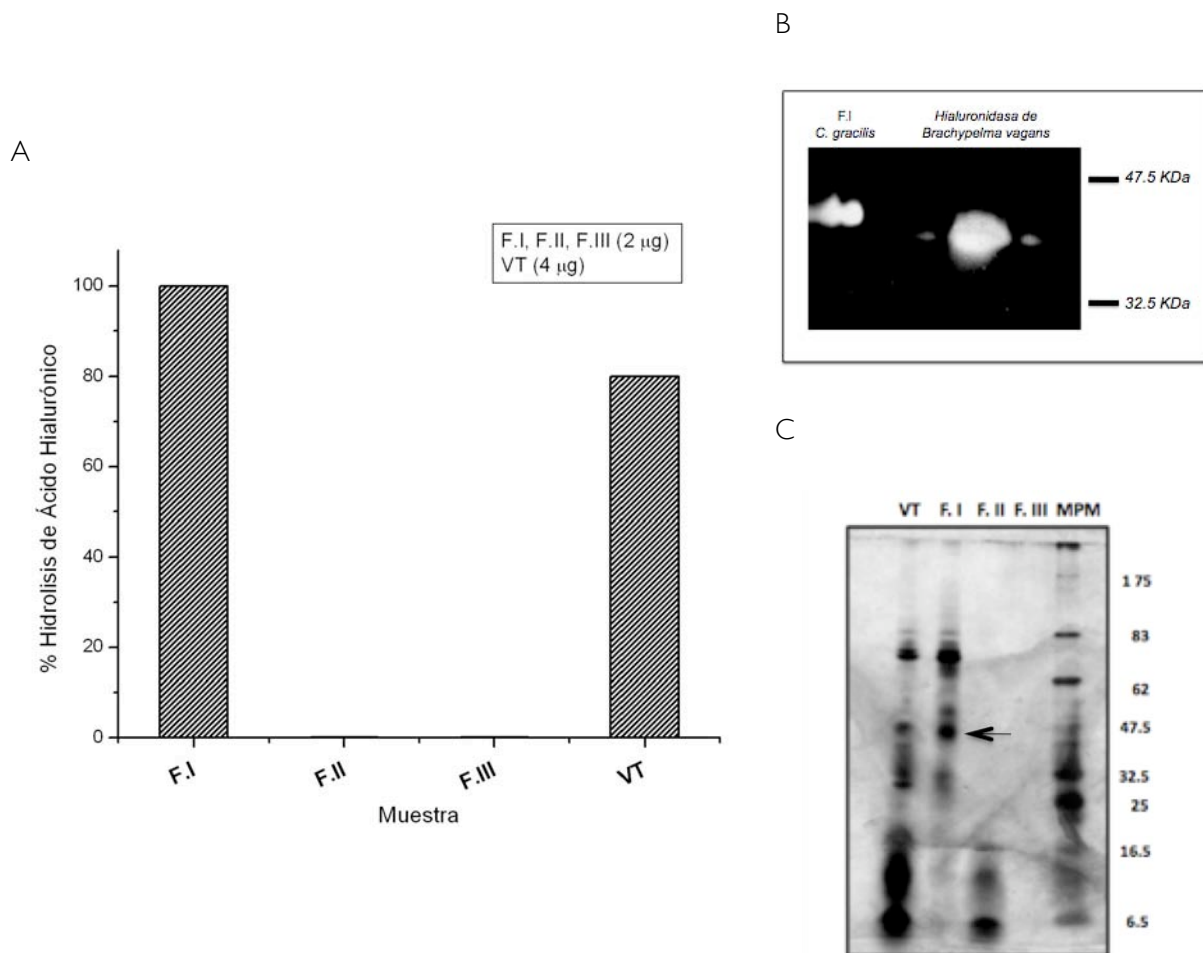


Figura 21. Actividad enzimática hialuronidasa del veneno de *C. gracilis* y de las F.I, F.II y F.III. A) En la fracción F.I se encuentra presente la actividad enzimática hialuronidasa del veneno, 2 μg de ésta fracción hidrolizaron 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido hialurónico con una eficiencia de rendimiento del 100%. El veneno total (4 μg) hidroliza en un 80% la misma cantidad de ácido hialurónico. B) Gel SDS-PAGE co-polimerizado con ácido hialurónico. En la F.I (16 μg) se encontró una banda de 45 KDa con actividad enzimática hialuronidasa. El control positivo corresponde a una enzima hialuronidasa de araña (*Brachypelma vagans*) cuya masa molecular es de 40 KDa. C) Separación electroforética de las fracciones de Sephadex y de veneno total. En la fracción F.I se resalta con una flecha la banda que corresponde a la proteína con actividad enzimática hialuronidasa.

9.6 Purificación del péptido con actividad sobre los canales hERG3

En las fracciones F.II.8-F.II.14 se buscó la actividad bloqueadora de canales hERG3, utilizando la técnica de patch-clamp sobre células CHO que expresaban canales de K^+ tipo hERG3. La fracción F.II.13 presentó actividad sobre estos canales. La cantidad de proteína correspondiente a la fracción II.13 (5.2 mg) se

analizó por HPLC semipreparativo de fase reversa. En la figura 22A se muestra el perfil cromatográfico y se resalta con un asterisco el pico que contiene al péptido bloqueador de canales hERG3. Este pico nombrado F.II.13.6 corresponde al 1.7 % (equivalente a 90 μg) de la F.II.13, y fue repurificado por HPLC analítico de fase reversa, el perfil cromatográfico se muestra en la figura 22B, donde el pico mayoritario y resaltado con un asterisco corresponde al péptido bloqueador de canales hERG3. La recuperación final de este péptido fue de 48 μg lo que representa el 0.035 % del veneno. En la tabla 13 se resume la recuperación del péptido de interés a partir de 140 mg de veneno. El péptido puro se nombró CgErgTx1, donde Cg se refiere al nombre del alacrán del cual fue aislado (*C. gracilis*), Erg indica el tipo de canal iónico que afecta (canal de K^+ tipo ERG), Tx hace referencia a una toxina y 1 a que es la primera toxina caracterizada del veneno de *C. gracilis*; el efecto electrofisiológico que CgErgTx1 tiene sobre los canales hERG1 y hERG3 se muestra en la figura 24, este péptido bloquea únicamente el subtipo 3 de estos canales, la corriente de K^+ se reduce en un 80 % en presencia de la toxina y el efecto es reversible, es decir, la corriente de potasio se recupera al eliminar a CgErgTx1 del medio extracelular. La actividad electrofisiológica de CgErgTx1 no se ensayó sobre los canales hERG2 dado que se tenía el antecedente (ver tabla 11) de que la fracción 20-30 de HPLC no tenía efecto sobre esta isoforma.

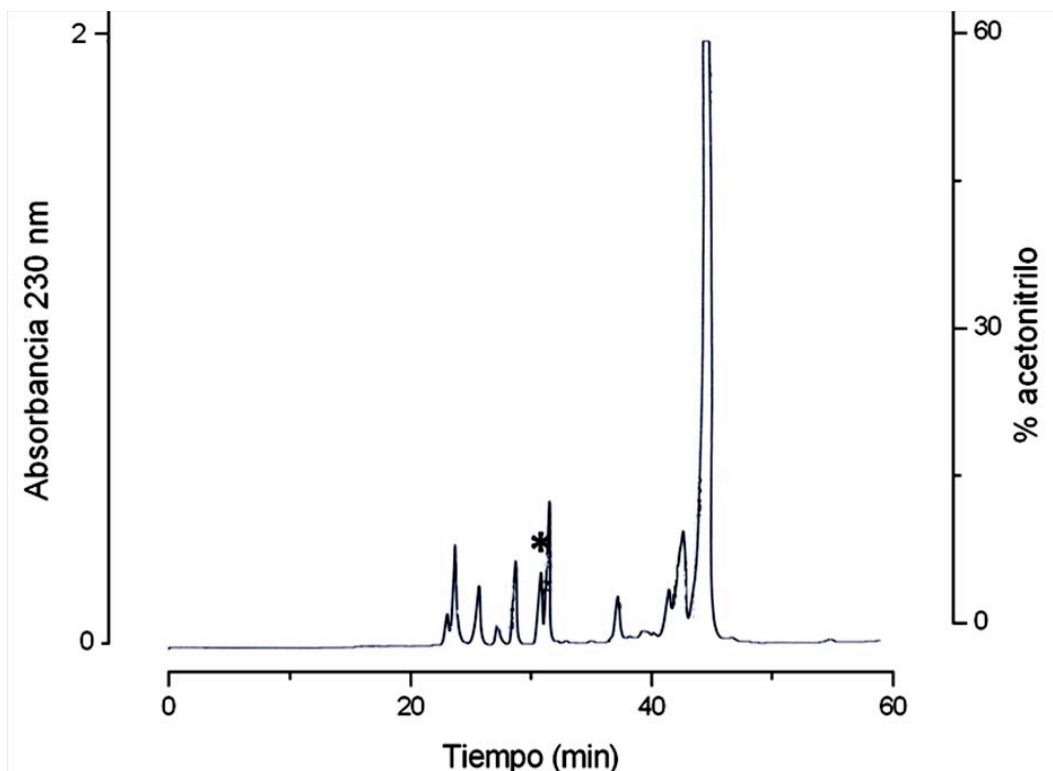


Figura 22. Perfil cromatográfico de la separación de la fracción II.13 por HPLC semipreparativo de fase reversa. Se aplicaron 2 mg en una columna C18 semipreparativa de fase reversa y se eluyeron utilizando un gradiente lineal de 0 a 60 % de acetonitrilo en 60 minutos bajo un flujo de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. El perfil cromatográfico se resolvió en 12 picos nombrados F.II.13-1 a F.II.13-12. En el pico F.II.13-6 marcado con un asterisco y eluido en el minuto 31.00 se encuentra el componente con actividad en canales hERG3. Este componente corresponde a 0.060 % del veneno soluble.

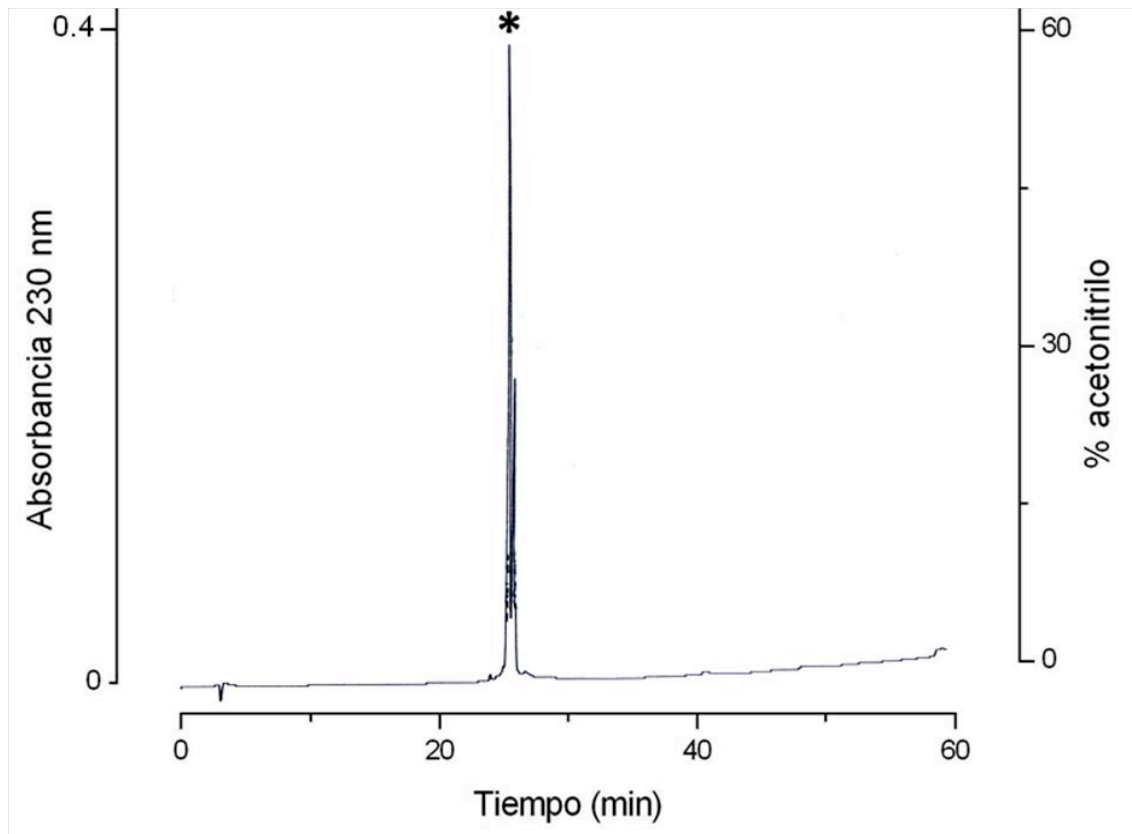


Figura 23. Perfil cromatográfico de la repurificación del péptido bloqueador de canales hERG3 por HPLC de fase reversa. Se inyectaron 40 μg de F.II.13-6 a una columna C18 analítica de fase reversa y se eluyeron utilizando un gradiente lineal de 0 a 60 % de acetonitrilo en 60 minutos y bajo un flujo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. El péptido de interés bajo estas condiciones eluye en el minuto 27.00 y se obtiene puro, se representa en la figura con un asterisco. Este péptido corresponde al 0.035 % del veneno soluble.

Muestra	Cantidad	%
Veneno de <i>C. gracilis</i>	140 mg	100.0
Péptido bloqueador de canales hERG3	48 μg	0,035

Tabla 13. Abundancia del péptido bloqueador de canales de K^+ tipo hERG3 en el veneno de *C. gracilis*.

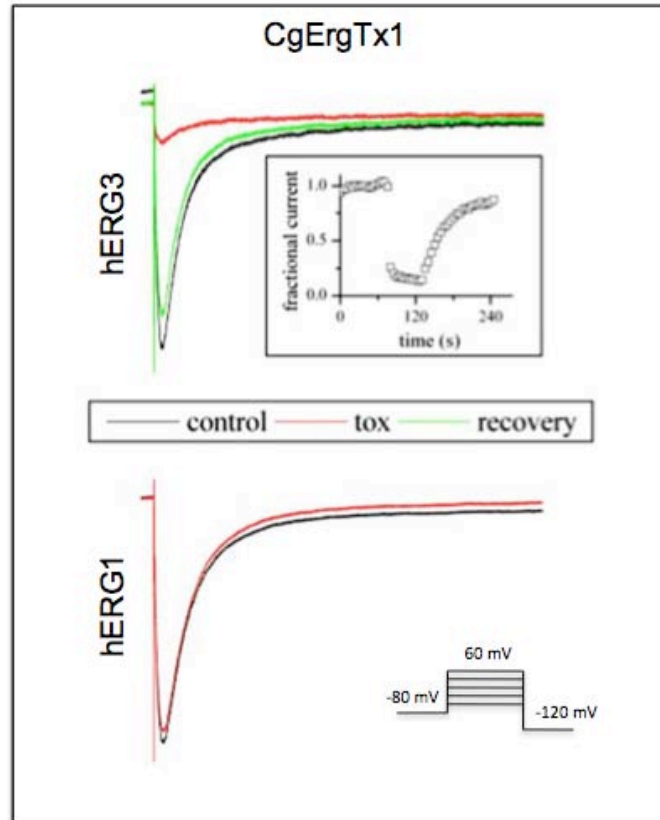


Figura 24. Registro electrofisiológico de la corriente de K^+ sobre canales hERG1 y hERG3 en presencia de toxina CgErgTx1. La actividad electrofisiológica se ensayó utilizando 450 nM de CgErgTx1 por la técnica de patch-clamp, sobre células CHO que expresan canales iónicos de K^+ hERG1 o hERG3. En rojo se muestra el efecto del péptido CgErgTx1 sobre el canal hERG1 o hERG3. En los canales hERG3, CgErgTx1 bloquea la corriente de potasio, la cual se recupera cuando las células se perfunden con una solución de lavado (línea verde). Sobre los canales hERG1, CgErgTx1 no muestra ningún tipo de efecto. La actividad electrofisiológica no se ensayó sobre la forma 2 de los canales hERG debido a que experimentos previos realizados con la fracción 20-30 min. de HPLC no tuvo efecto en este canal, no se realizó el experimento con el péptido puro (ver tabla 3).

9.7 Caracterización Bioquímica de CgErgTx1: masa molecular y secuencia de aminoácidos.

La caracterización bioquímica de CgErgTx1, requirió de un gran trabajo experimental, haciendo que la purificación de CgErgTx1 no fuera un evento trivial, es decir, dado que este componente representa en el veneno de *C. gracilis* el 0.035 % su separación implicó la repetición del proceso de purificación un gran número de veces, ya que se debe considerar que el veneno con el que se trabaja por su origen biológico es un elemento limitante.

La masa molecular de la toxina CgErgTx1, se obtuvo por espectrometría de masas a través del sistema nano-LC/ESI-it/MS, el resultado fue una masa de 4,385 Da.

En la figura 25 se muestra el perfil cromatográfico de la digestión de la toxina con quimotripsina, todos los picos eluidos se fragmentaron por espectrometría de masas y se analizaron. Sólo 5 (resaltados con una flecha) permitieron armar la secuencia de aminoácidos de CgErgTx1. En ninguno de los espectros analizados pudo encontrarse la región que corresponde a los aminoácidos 25 a 29 (tabla 14 y figura 26). La secuencia propuesta para esta región se hizo en base a la comparación de la región faltante con la misma región de otras secuencias de toxinas bloqueadoras de canales ERG (figura 27). Las secuencias con las que se hizo la comparación fueron seleccionadas con base a que son las que muestran mayor variabilidad con la región de interés. El análisis de la comparación (tabla 15) arrojó dos posibles secuencias para la toxina CgErgTx1 (tabla 16).

Con base a nuestro análisis proponemos que la estructura primaria de CgErgTx1 está constituida de 42 aminoácidos, en las posiciones 5, 11, 20, 23, 24, 34, 39 y 41 se encuentran las cisteínas que están estabilizando la estructura terciaria por medio de 4 puentes disulfuro. La posición y el número de las cisteínas se encuentran conservados en todas las toxinas bloqueadoras de canales ERG.

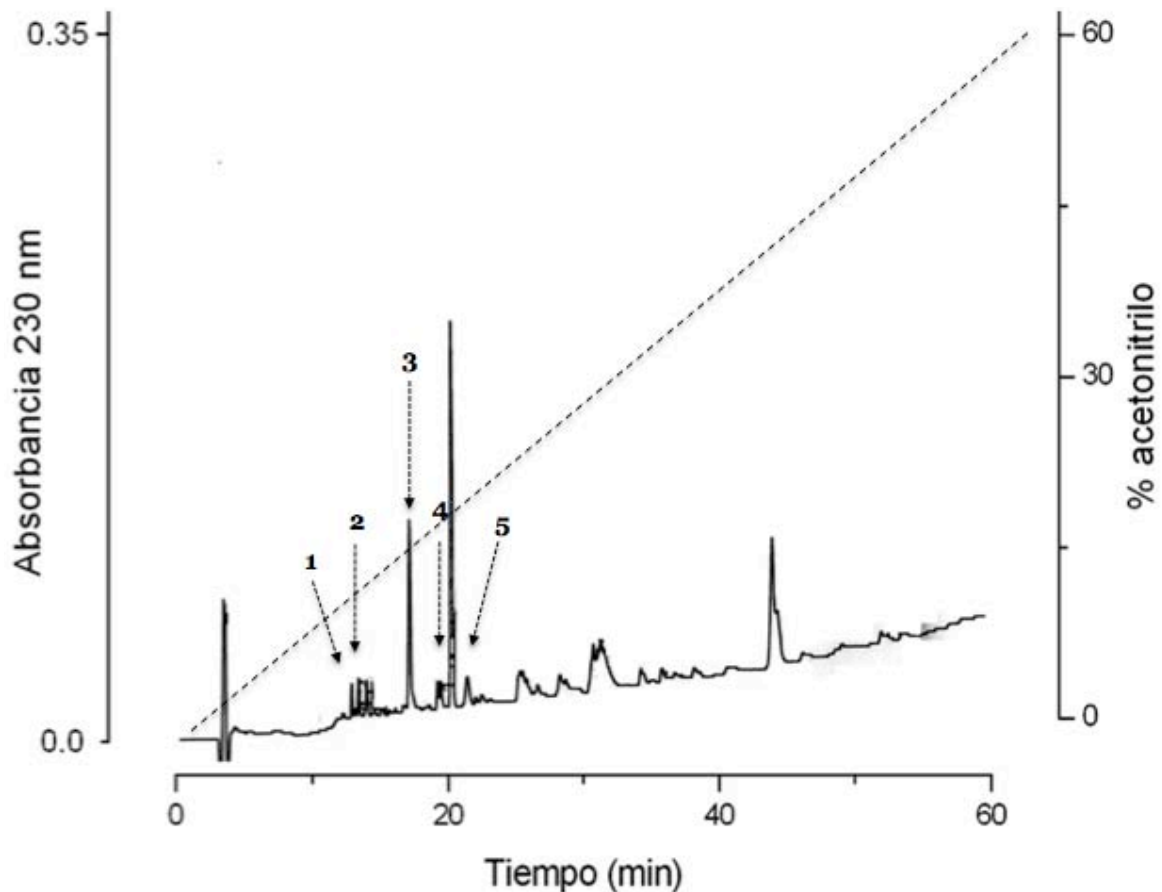


Figura 25. Perfil cromatográfico de la digestión del péptido CgErgTx1 derivatizado (reducido y carboximetilado). 50 μg de CgErgTx1 fueron hidrolizados con quimotripsina, los productos de la hidrólisis se separaron por HPLC analítico utilizando una columna C18 de fase reversa y un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo en 60 minutos. El análisis de la fragmentación de los picos resaltados con una flecha permitió armar parcialmente la secuencia de aminoácidos de la toxina.

Número de fragmentación	Secuencia de aminoácidos	Masa molecular
MS/MS 1	DKCKC	710 Da
MS/MS 2	ATCQACC	905 Da
MS/MS 3	KSGCAKY	812 Da
MS/MS 4	GTNSCVN	768 Da
MS/MS 5	EVGPCVF	806 Da

Tabla 14. Análisis de las fragmentaciones obtenidas por espectrometría de masas.

Toxina	Secuencia de aminoácidos	Masa molecular teórica	Masa molecular experimental
CgErgTx1	<p style="text-align: center;">10 20 30 40</p> <p>GTNSCVN KSG CAKYGYATC QACC E VGPCVFDKCK C .</p>	4,384	4,385

Figura 26. Secuencia de aminoácidos de la toxina CgErgTx1. Debajo de la flecha se indica el método utilizado para la determinación de la secuencia de aminoácidos. El número hace referencia al pico del perfil cromatográfico de la digestión de la toxina en el que se encontró la secuencia abarcada por la flecha.

	10	20	30	40
CgErgTx1	GTNSCVN	KSGCAKYGYATCQACC	EVGPCVFDKCKC
ErgTox	DRD...D..R.....	QE..D..	KNAGHNG.T.M.F.....	A
CeErgTx1	DRD...D..R.....	QE.TD..	KKYGHNG.T.M.F.....	A
CllErgTx	DRD...D..K.....	GQ.DE..	KKAGDRA.N..YL.....	NQ

Figura 27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CgErgTx1 con otras toxinas erg-like. Dentro de los cuadros se resalta la región que falta determinar de la toxina CgErgTx1 y al mismo tiempo los aminoácidos que corresponden a esa región en otras toxinas erg-like.

Masa del péptido buscado	a.a 25	a.a 26	a.a 27	a.a 28	Suma de a.a. 25, 26, 27 y 28.	586 Da menos la suma de a.a 25, 26, 27 y 28.	a.a 29	a.a 42	Masa de total
586 Da	K	K	A	G	384	202	M	A	4384
586 Da	K	K	Y	G	476	110	----	----	4274
586 Da	K	N	Y	G	462	124	----	----	4260
586 Da	K	N	A	G	370	216	D	T	4384

Tabla 15. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la toxina CgErgTxI.

	Secuencia de aminoácidos propuesta para la toxina CgErgTxI
Secuencia 1	GTNSCVNKSGCAKYGYATCQACCKKAGMEVGPCVFDKCKCA
Secuencia 2	GTNSCVNKSGCAKYGYATCQACCKNAGDEVGPCVFDKCKCT

Tabla 16. Secuencias de aminoácidos propuestas para la toxina CgErgTxI

9.8 Marcado del péptido con biotina

El péptido CgErgTxI después de ser expuesto a una reacción de biotinización, utilizando una relación molecular 1:2, toxina-biotina, derivó en la formación de seis picos eluidos poco después del tiempo en el que eluye la toxina nativa. (figura 28). La masa de cada uno de los picos se analizó por espectrometría de masas, encontrando en todos ellos un aumento en la masa de la toxina de 340 Da, masa correspondiente a una molécula de biotina. Como se puede observar en la figura 28 el rendimiento de la reacción de biotinización es bajo, alrededor del 10 % del péptido CgErgTxI se biotinila, porcentaje repartido entre las seis formas marcadas, donde la forma 6 parece ser la más abundante. La reacción de biotinización se repitió varias veces para poder contar con suficiente cantidad de toxina marcada y continuar con los objetivos del proyecto: evaluar si la toxina-biotinilada seguía siendo activa sobre los canales hERG3 y de ser así proseguir con los ensayos de entrecruzamiento.

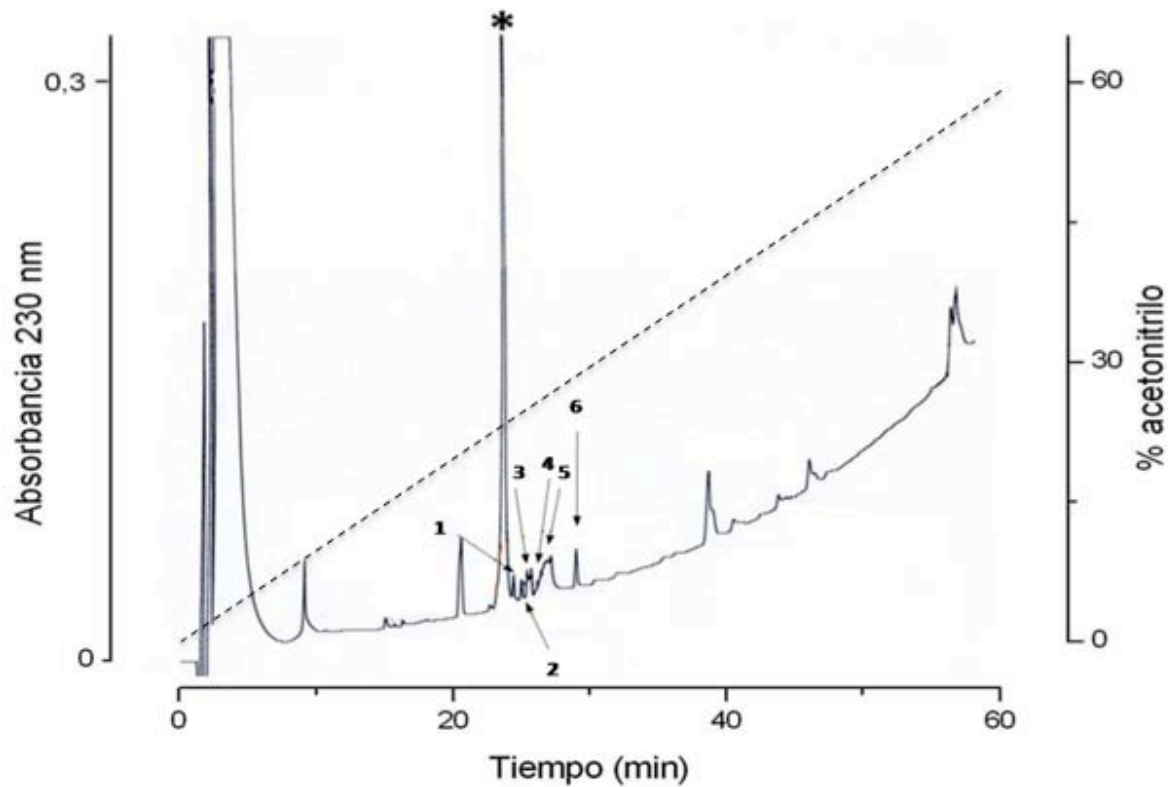


Figura 28. Perfil cromatográfico de los productos de reacción de la biotinización del péptido CgErgTx1. Los productos de la reacción de biotinización se separaron por HPLC analítico utilizando una columna C18 de fase reversa y un gradiente lineal de 0 a 60 % de acetonitrilo en 60 minutos. El pico marcado con un asterisco representa al péptido CgErgTx1 no biotinilado. Los picos marcados con una flecha corresponden a las seis diferentes formas del péptido CgErgTx1 biotinilado, cada una de las 6 formas quedó marcada con una molécula de biotina.

9.8.1 Actividad biológica del péptido nativo y el péptido biotinilado.

La actividad bloqueadora de cada una de las seis formas biotiniladas del péptido CgErgTx1 se ensayó utilizando la técnica de *patch-clamp*, en células CHO que expresaban el canal hERG3. Las formas 1, 2, 3 y 4 tuvieron actividad bloqueadora y reversible sobre los canales hERG3 (resultados no mostrados). Para las formas 5 y 6 la actividad bloqueadora se observó disminuida (resultados no mostrados). Considerando que la biotina reacciona con los grupos amino ya sea de la parte N-terminal o los ϵ -amino de las lisinas, es posible que en las formas 5 y 6 el extremo N-terminal o alguna lisina de la toxina están implicadas en la interacción con el canal, consideramos detectar por Edman la posición de la biotina en las formas 5 y 6 de la toxina marcada, sin embargo esto no pudo llevarse a cabo por la poca cantidad de material con la que contábamos.

Dado que el rendimiento de la reacción de biotinylation es bajo (aproximadamente 10 %) y sabiendo que las formas marcadas 1, 2, 3 y 4 continúan siendo activas tras el marcado, los picos correspondientes a estas 4 formas los juntamos y la actividad electrofisiológica de la mezcla se ensayó a diferentes concentraciones en células CHO que expresaban los canales hERG3. Con los datos obtenidos se trazó una curva dosis respuesta y se determinó el valor de la KD para la mezcla de péptido biotinilado, la cual tiene un valor de 132.6 nM.

La KD para el péptido CgErgTx1 nativo también se determinó, siendo de 7.7 nM. Las curvas dosis-respuesta de la mezcla de péptidos biotinilados se muestra en la gráfica de la figura 29.

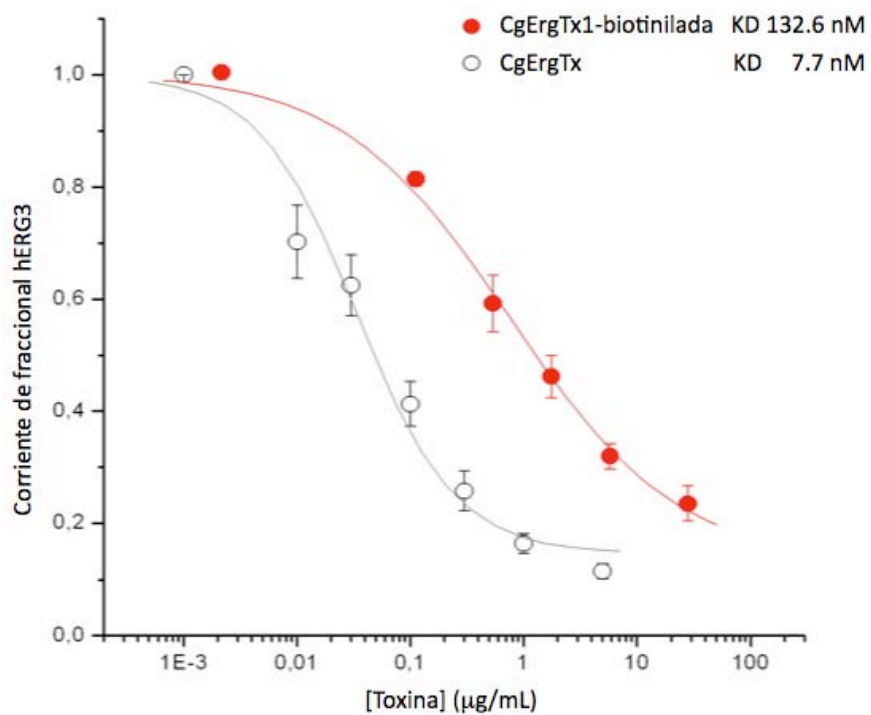


Figura 29. Curva dosis-respuesta del péptido CgErgTx1 nativo y biotinilado. La actividad electrofisiológica tanto del péptido CgErgTx1 nativo como biotinilado se ensayó a diferentes concentraciones, mediante la técnica de patch-clamp en células CHO que expresaban canales de potasio tipo hERG3. La concentración de toxina ensayada se graficó versus la fracción de corriente inhibida por el péptido probado. Cada uno de los círculos corresponde al registro electrofisiológico de 3 células. El péptido CgErgTx1 tiene una KD de 7.7 nM. Para el péptido CgErgTx1 biotinilado la KD es de 132.6 nM.

9.9 Entrecruzamiento

La reacción de entrecruzamiento entre el canal hERG3 y el péptido CgErgTx1-biotinilado se detectó por western blot de geles SDS-PAGE al 8%. Se detectaron 5 bandas de 125, 65, 55, 42 y 37 KDa tanto en células CHO control (células que expresaban el canal hERG3, sin toxina y con reactivos de entrecruzamiento), como células CHO que expresaban el canal hERG3, tratadas con toxina y con reactivos de entrecruzamiento. Dado que el patrón de bandeado fue exactamente igual para ambos experimentos, no fue posible identificar bandas que indicaran la interacción del canal hERG3 con el péptido CgErgTx1-biotinilado (figura 30).

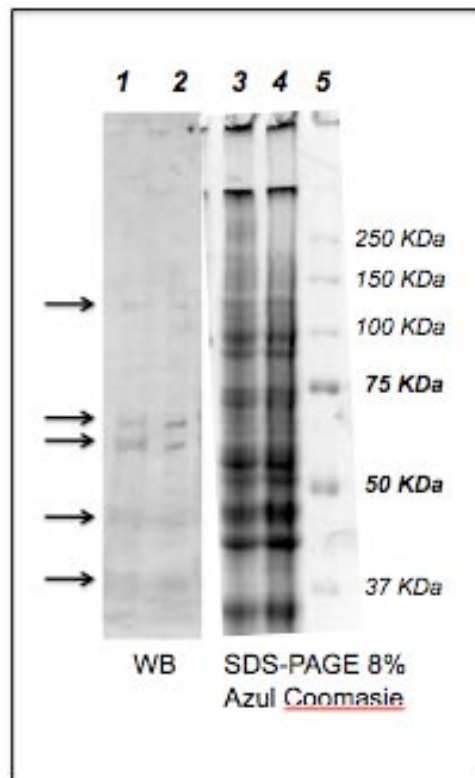


Figura 30. Reacción de entrecruzamiento entre el canal hERG3 y el péptido CgErgTx1 biotinilado. En los carriles 3 y 4 se muestra el perfil electroforético hecho en un gel SDS-PAGE al 8%, de 50 μg de la mezcla de reacción de entrecruzamiento tanto control como experimental. En los carriles 1 y 2 se muestra la electrotransferencia en nitrocelulosa de 50 μg de mezcla de reacción de entrecruzamiento, control y experimental respectivamente. La detección de la señal se hizo utilizando diaminobencidina y H_2O_2 .

10. DISCUSIÓN

10.1 Caracterización bioquímica del veneno

El veneno de los alacranes es una fuente natural de péptidos biológicamente activos; algunos de ellos actúan sobre diferentes tipos de canales iónicos. Dichos péptidos se han utilizado para estudiar la biofísica, estructura, fisiología y farmacología de sus blancos de acción (Prestipino *et al.*, 1989; Restano-Cassulini *et al.*, 2006) además representan una alternativa biotecnológica interesante para el desarrollo de fármacos que actúen modulando la actividad de un cierto tipo de canal iónico, o bien, pueden ser utilizados como marcadores moleculares que permitan identificar enfermedades asociadas a canales iónicos. Las investigaciones orientadas hacia la comprensión del mecanismo de acción de dichos péptidos como por ejemplo; cómo modifican la actividad de sus receptores, son fundamentales para su posible aplicación en el campo clínico y farmacéutico, así como para una posible mejoría en su actividad biológica. Interesantemente en el veneno de los alacranes se han aislado péptidos con actividad tóxica en insectos (Selisko *et al.*, 1996; Wadayagiri *et al.*, 2001) y crustáceos (García *et al.*, 1997; Ramírez-Domínguez *et al.*, 2002), planteándose la posibilidad de ser utilizados en la agricultura como bioinsecticidas. A pesar de que se han encontrado diversos compuestos en el veneno de los alacranes, la gran diversidad de moléculas con potencial actividad biológica que aún no han sido estudiadas hace del veneno una fuente excelente de moléculas con aplicación biotecnológica.

Hasta ahora, no se encuentran en la literatura estudios del veneno del alacrán *C. gracilis*, siendo éste, el primer trabajo que reporta la caracterización bioquímica de su veneno. *C. gracilis* es conocido comúnmente como el alacrán negro, y se distribuye desde el sur de Florida hasta la Península de Yucatán, Cuba y algunos países de América Central. Al igual que el veneno de todos los alacranes del género *Centruroides*, su veneno es una mezcla compleja de péptidos con diferente actividad biológica (Dias da Silva y Kipnis 2001), pero a diferencia de la mayoría de los *Centruroides*, *C. gracilis* no representa un problema de salud pública, ya que su veneno aún probado a dosis altas no es tóxico en mamíferos. Sin embargo, su veneno sí contiene componentes con actividad tóxica en artrópodos. Prácticamente la mitad de las fracciones de CMC tuvieron efecto tóxico en grillos (F.II.2, F.II.3, F.II.5 F.II.6, F.II.7, F.II.9 y F.II.10) lo que es lógico dado que su alimentación se basa en el consumo de insectos, sin embargo resulta interesante observar que estos componentes queden distribuidos tan ampliamente a lo largo de la purificación, sugiriéndose que la batería de toxinas con capacidad letal en insectos es muy diversa, lo que probablemente le confiere al alacrán ventajas adaptativas a su entorno. Para fines de investigación estas toxinas podrían ayudar a identificar canales iónicos relacionados estructural y funcionalmente.

De la F.II.8 aislamos un péptido que únicamente es tóxico en crustáceos (acociles), que tiene efecto letal instantáneo hasta con 1 μg de toxina. Con base en la masa molecular de este péptido (6947 Da), es posible que se trate de una toxina bloqueadora de algún canal de Na^+ además de ser sobre este tipo de canales donde recae la actividad neurotóxica de las toxinas de alacrán. Respecto a su estructura primaria

identificamos los primeros 15 aminoácidos y haciendo una búsqueda en las bases de datos no encontramos alguna secuencia reportada que tuviera similitud con la identificada, por lo que este péptido podría representar un nuevo grupo de toxinas bloqueadoras de canales de Na⁺.

El análisis bioquímico del veneno de *C. gracilis* reveló la presencia de enzimas hialuronidasas, se ha reportado que estas enzimas en el veneno de los animales ponzoñosos actúan como factores de difusión, ya que se requiere de su acción para que las toxinas del veneno puedan llegar a sus receptores blanco. Cuando el veneno total es purificado por exclusión molecular la actividad enzimática queda ubicada en la fracción F.I y al ser identificada la actividad enzimática en geles SDS-PAGE copolimerizados con ácido hialurónico, la actividad enzimática únicamente se detecta en una banda de 45 KDa. Sin embargo cuando el veneno total es purificado por cromatografía de intercambio iónico, la actividad enzimática se distribuye en tres fracciones (datos no mostrados), lo que sugiere que la enzima podría encontrarse en el veneno bajo diferentes patrones de glicosilación que estarían confiriéndole a la enzima propiedades iónicas diferentes haciéndola migrar en diferentes fracciones. Las hialuronidasas son proteínas altamente inestables, su purificación requiere mantener condiciones de temperatura y pH óptimos para conservar su actividad. La purificación de hialuronidasas generalmente se lleva a cabo a temperatura ambiente (18-25 °C) y con buffer acetato de amonio (20 a 50 mM), pH ácido (entre 5 y 6). La fuerte afinidad que las hialuronidasas tienen por los intercambiadores catiónicos a pH's ácidos puede ser ampliamente aprovechado en la purificación de estas enzimas. Bajo nuestra experiencia el uso de HPLC de fase reversa, utilizando como eluente acetonitrilo no es conveniente si lo que se persigue es detectar la actividad enzimática, ya que el acetonitrilo es un solvente que desnaturaliza irreversiblemente la enzima y por consiguiente la actividad de la enzima se pierde.

10.2 Caracterización bioquímica y uso de CgErgTx1 como marcador molecular

Hasta ahora el principal obstáculo para estudiar la contribución fisiológica de los canales de K⁺ tipo ERG, ha sido distinguir las corrientes individuales de cada una de las tres isoformas en que se expresan estas proteínas de membrana; no obstante, el diseño de estrategias electrofisiológicas que manejan diferentes concentraciones de péptidos activos en estos canales, ha permitido identificar la corriente electrofisiológica de cada una de las isoformas (Restano-Cassulini *et al.*, 2006). Sin embargo, estas estrategias han sido planeadas para estudiar, de manera independiente, cada una de las isoformas de los canales ERG expresadas (de manera heteróloga) en cultivos de líneas celulares. Cuando se encuentran presentes las tres isoformas de estos canales (ERG1, ERG2 y ERG3), ya sea en un órgano, un tejido o un cultivo celular, la identificación de la corriente individual tiende a complicarse con el uso de estas estrategias, limitándose el estudio de la contribución fisiológica de cada uno de los canales.

En el presente trabajo, se aisló una toxina CgErgTx1, del veneno del alacrán *C. gracilis* que tiene únicamente actividad sobre la isoforma 3 de los canales humanos ERG. Esta toxina comparte en

promedio 65 % de similitud, respecto a su secuencia de aminoácidos, con otras toxinas de alacrán bloqueadoras de canales ERG llamadas toxinas erg-like, la estructura terciaria en todas ellas se encuentra estabilizada por 4 puentes disulfuro. Todas las toxinas erg-like, hasta ahora descritas tienen la característica de ser anfipáticas, es decir, presentan en uno de sus extremos un parche hidrofóbico y en el extremo opuesto, un parche hidrofílico. Se ha propuesto que el modo de acción de las toxinas erg-like, sobre los canales ERG, es a través de la interacción del parche hidrofóbico con la α -hélice del segmento S5-P de los canales ERG y al mismo tiempo la interacción del parche hidrofílico con el vestíbulo del canal (Pardo López *et al.*, 2002a,b). Independientemente de las dos secuencias de aminoácidos propuestas para la toxina CgErgTx1, la región del parche hidrofóbico e hidrofílico se mantiene inalterable, es decir, los tres cambios que hacen diferentes a las dos secuencias caen en una zona diferente a los parches. Considerando esto, la discusión sobre un posible modo de interacción con el canal se hará sobre la secuencia I propuesta. Del alineamiento de la figura 31, se puede inferir que la toxina CgErgTx1 es menos hidrofílica que el resto de las toxinas erg-like, claramente se nota en estas toxinas la presencia de varios residuos hidrofílicos principalmente representados por el aminoácido aspártico, los cuales forman parte del parche hidrofílico de estas toxinas.



Figura 31. Alineamiento de la secuencia de CgErgTx1 con otras toxinas bloqueadoras de canales de K⁺ tipo ERG. Utilizando la base de datos del PDB (Protein Data Bank), se hizo un blast utilizando la secuencia de aminoácidos de CgErgTx1 como templado. La secuencia de esta toxina comparte similitud hasta de 70% con otras toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de K⁺ tipo ERG.

Es importante mencionar que ninguna de las toxinas erg-like hasta ahora descritas muestra ser activa solamente sobre una de las tres isoformas de los canales ERG; por ello, la selectividad de la toxina CgErgTx1 únicamente por la isoforma hERG3 es una característica que debemos resaltar. La generación de un modelo computacional de la toxina CgErgTx1 nos permitió visualizar y reafirmar ciertos rasgos estructurales que se mencionan a continuación:

- 1) En cuanto al plegado, la toxina CgErgTx1 mantiene la típica estructura de las toxinas de K⁺. Comienza con un N-terminal flexible seguido de una pequeña hoja β antiparalela a las siguientes dos hojas β , continúa con una α -hélice y termina con dos hojas β antiparalelas (figura 32).

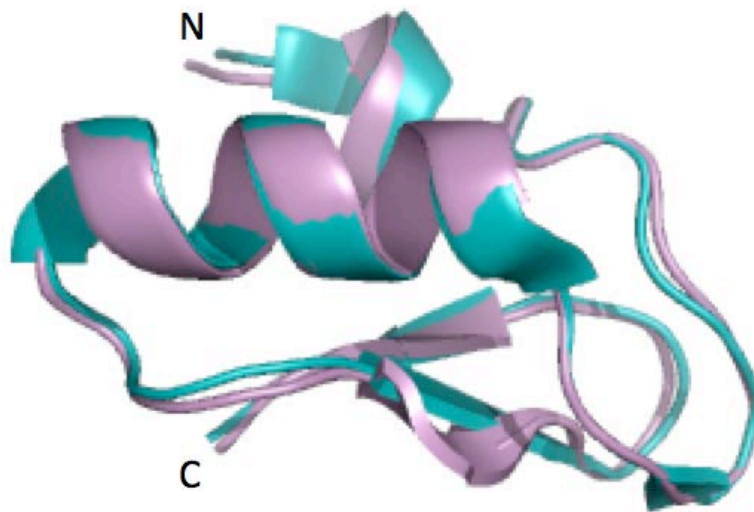


Figura 32. Sobreposición de la estructura terciaria de las toxinas ErgTx y CgErgTx1. En verde se muestra la toxina ErgTx y en púrpura la toxina CgErgTx1. Se utilizó como templatado la toxina ErgTx con número de acceso al PDB 1NE5.

- 2) Comparando la anfipaticidad de las dos toxinas observamos que ambas mantienen conservados los residuos que forman el parche hidrofóbico (K13, Y14, Y16, Y17, F36 y K38), pero el área de la molécula que corresponde al parche hidrofílico formado en ErgTx, por los residuos D1, D3, D7, S4, K8, R2 y R10 se observa reducido en la toxina CgErgTx1, donde, de los siete aminoácidos que forman el parche hidrofílico en ErgTx, solo dos se encuentran en esta toxina; S4 y K8 (figura 33).

Es posible que alguna de la diferencia en la abundancia de residuos hidrofílicos entre la toxina CgErgTx1 y las otras toxinas erg-like sea la causa de la actividad bloqueadora selectiva de CgErgTx1 sobre los canales hERG3 con respecto a las otras dos isoformas de los canales hERG: hERG1 y hERG2.

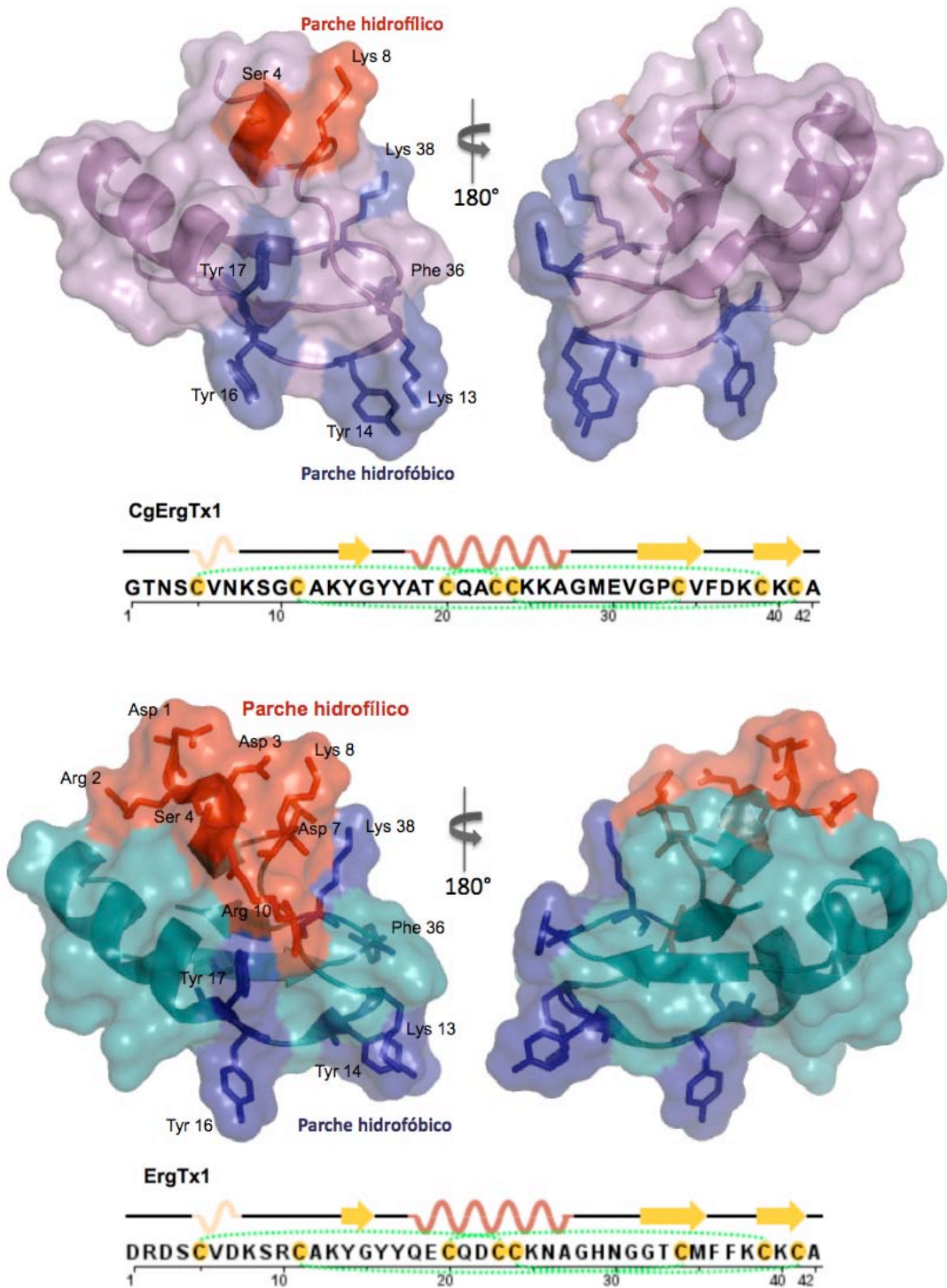


Figura 33. Distribución de la anfipaticidad de las toxinas bloqueadoras de canales ERG: ErgTx y CgErgTx1. En azul se representan los aminoácidos que forman el parche hidrofóbico, los cuales, para ambas toxinas se encuentran conservados. En rojo se muestran los aminoácidos del parche hidrofílico, éste es claramente más abundante en la toxina ErgTx.

10.3 Biotinización de la toxina CgErgTx1

La toxina CgErgTx1 muestra un valor de KD (7.7 nM) muy parecido al de otras toxinas bloqueadoras de canales ERG, como son: ErgTx cuya KD es de 10 nM y BeKm1 con una KD de 7 nM (Gurrola *et al.*, 1999; Korolkova *et al.*, 2001). Sin embargo, la gran diferencia que tiene CgErgTx1 con ellas es la selectividad que muestra por la forma 3 de los canales ERG. Cuando la toxina es marcada con una molécula de biotina el valor de la KD se modifica haciendo a la toxina menos afín por los canales hERG3, pero continua siendo activa sobre ellos, permitiendo ser utilizada como un marcador molecular para el estudio de dichos canales.

Como se observó en la parte de los resultados, la toxina CgErgTx1 tras la reacción de biotinización queda marcada de seis diferentes formas pero todas ellas solamente con una molécula de biotina e interesantemente solo 4 de las 6 formas marcadas continúan siendo activas, lo que sugiere que en las formas no activas la biotina se enlazó a un aminoácido importante para el bloqueo del canal. En la figura 34 se muestran los aminoácidos a los que la biotina se pudiera estar uniendo (lisinas y la glicina del extremo N-terminal), como se puede observar hay dos lisinas que caen en la zona del parche hidrofóbico (Lys 13 y Lys 38) pudiendo ser éstas importantes para el efecto bloqueador de la toxina por el canal hERG3 y que al ser alguna de ellas la que interacciona con la biotina la afinidad de la toxina se ve disminuida.

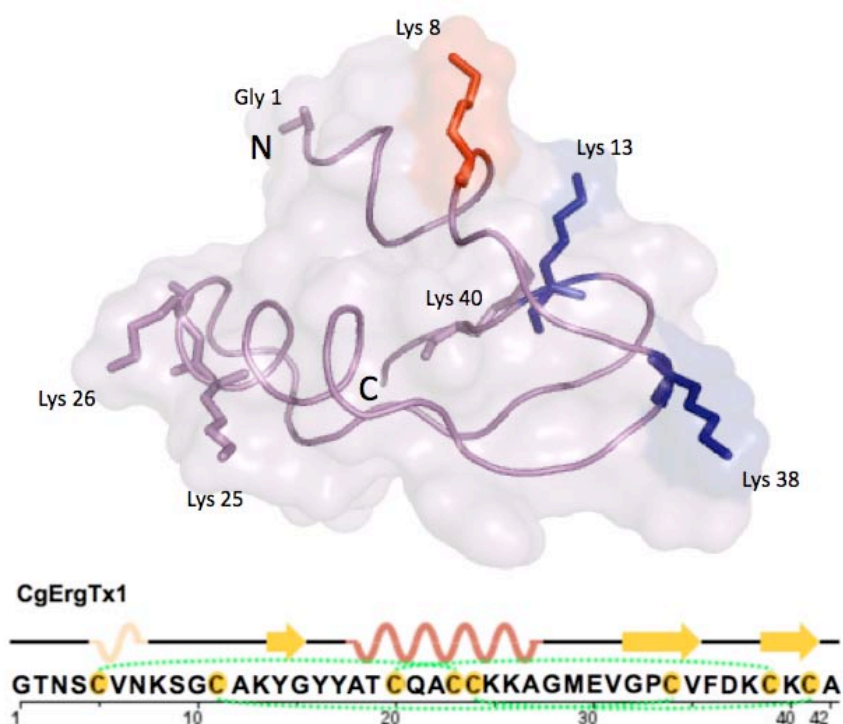


Figura 34. Representación de los posibles sitios de biotinización en la toxina CgErgTx1. La biotina puede interaccionar con los grupos amino tanto del extremo N-terminal como el ϵ -amino de las 6 lisinas presentes en la toxina CgErgTx1.

La localización e identificación de canales iónicos ha sido (está siendo) posible gracias al empleo de marcadores moleculares, como por ejemplo toxinas del veneno de animales marcadas isotópicamente (Angelo *et al.*, 2003). Para poder ser utilizados como marcadores moleculares las moléculas marcadas deben mantener su actividad biológica y su especificidad, característica que se mantiene tras ser biotinilada la toxina CgErgTxI. Sin embargo también es importante poder diferenciar la señal debida al complejo canal iónico-marcador molecular, de la señal inespecífica debida a la fijación del marcador molecular en otras proteínas.

En nuestros experimentos de entrecruzamiento entre el canal hERG3 y la toxina CgErgTxI-biotinilada, la señal detectada no fue indicativa de la presencia del complejo, más bien pareciera que la señal observada es consecuencia de la presencia de proteínas biotiniladas *per se* en nuestra línea celular utilizada. Para tratar de resolver este problema considero tomar en cuenta lo siguiente:

1. Presencia y concentración molar del canal iónico hERG3 en el sistema de expresión utilizado. Aún cuando la expresión del canal es corroborada por electrofisiología, es probable que la concentración en las células sea mínima para ser detectada por técnicas bioquímicas, pese a que en teoría la señal está siendo intensificada con el uso de estreptavidina-peroxidasa como sonda de la biotina.
2. Si la señal detectada es consecuencia de proteínas celulares biotiniladas, un bloqueo previo a la interacción de la toxina CgErgTxI-biotinilada con los canales hERG3 con estreptavidina deberá eliminar la señal endógena observada y permitir únicamente la visualización de la interacción ligando-receptor.

El montaje de la técnica de entrecruzamiento requirió de mucho trabajo, desde establecer las condiciones de lisado celular hasta establecer las condiciones idóneas del método de detección, la metodología propuesta para descartar señal "anómala" no pudo ser evaluada debido, principalmente a la limitante de la toxina biotinilada, proceso que requiere de mucho tiempo ya que implicaba la purificación de la toxina de novo.

10.4 Proteómica del veneno de *C. gracilis*

El análisis proteómico deja claro que faltan muchos componentes del veneno por ser estudiados, la mayoría de ellos son péptidos de 3 a 5 KDa, siendo probablemente toxinas bloqueadoras de diferentes canales de K⁺. La caracterización bioquímica de los componentes del veneno será muy valiosa, ya que seguramente muchos de los componentes serán mutantes naturales de toxinas cuya actividad biológica se conoce, y por tanto se podrá evaluar como se modifica su actividad cuando se encuentran cambios aminoácidos de las estructuras primarias ya conocidas.

El análisis proteómico reafirma la presencia en el veneno de un péptido eluido en el minuto 27 de la corrida de HPLC, de 4,384 Da de masa molecular que corresponde a la toxina CgErgTx1, así como también la presencia de un péptido de masa 6,947 Da, eluido en el minuto 40 y que corresponde al péptido tóxico en crustáceos.

Mediante el análisis proteómico se identificaron dos picos con posible alto peso molecular, la masa con exactitud no pudo ser identificada dado que la resolución en la detección de iones del espectrómetro de masas utilizado en el análisis, comienza a perderse con masas moleculares mayores de 15 KDa. Pensando que estos dos componentes pudieran ser hialuronidasas, ensayamos su capacidad de hidrolizar el ácido hialurónico, sin embargo ésta no pudo ser detectada. La caracterización bioquímica de los componentes de alto peso molecular (que se sabe hay y que van de los 16 a los 85 KDa) no es favorecida cuando el veneno se purifica por HPLC de fase reversa, por un lado las hialuronidasas son desnaturalizadas por el acetonitrilo y por otro es probable que los componentes de alto peso molecular queden atrapados en la matriz de las columnas C18 utilizadas. Las hialuronidasas solo son uno de los varios componentes de alto peso molecular presentes en el veneno, la función biológica de componentes entre 50 y 85 KDa es aún desconocida, su caracterización bioquímica deberá ser enfocada al uso de técnicas de purificación diferentes al HPLC, para asegurar su presencia y su funcionalidad.

II. CONCLUSIONES

- El veneno de *C. gracilis* se separa en 3 fracciones (F.I, F.II y F.III) cuando se purifica por exclusión molecular.
- En la fracción F.I se encontró actividad enzimática hialuronidasa, la cual corresponde a una proteína de 45 KDa.
- La fracción F.II se separa en 15 fracciones cuando se purifica por intercambio iónico (CMC).
- Las fracciones F.II.2, F.II.3, F.II.4, F.II.5, F.II.6, F.II.7, F.II.9 y F.II.10 tuvieron actividad tóxica en grillos, siendo las fracciones F.II.2, F.II.3 y F.II.4 letales.
- En la fracción F.II.8 se encontró un péptido letal en crustáceos (acociles), el cual tiene una masa molecular de 6,947 Da y una secuencia de aminoácidos N-terminal VADDYECNDSEGIRG... El efecto letal se observó a una dosis de 1 μ g de péptido por acocil.
- En la fracción F.II.13 se encontró un componente que bloquea reversiblemente la corriente de potasio de los canales humanos ERG3.

El péptido nombrado CgErgTxI tiene una posible secuencia de aminoácidos GTNSCVNKSGCAKYGYATCQACCKK(N)AGM(D)EVGPCVFDKCKCA(T) correspondiente a 42 aminoácidos, su estructura terciaria se encuentra estabilizada por 4 puentes disulfuro y su masa molecular es de 4,384 Da.

- El péptido CgErgTxI puede ser marcado con una molécula de biotina, manteniendo su actividad biológica sobre los canales iónicos hERG3, por lo que podría ser utilizado como marcador molecular para el estudio fisiológico y estructural de dichos canales iónicos.
- La constante de disociación (KD) para el péptido CgErgTxI es de 7.7 nM, mientras que para el péptido biotinilado es de 132 nM es decir, es 17 veces menos potente la toxina CgErgTxI cuando se marca con biotina
- El análisis proteómico del veneno de *C. gracilis* mostró que es una mezcla compleja de compuestos principalmente de naturaleza peptídica, donde los más abundantes son péptidos de 3 a 5 KDa.

12. PERSPECTIVAS

- Confirmar la secuencia de la toxina CgErgTxI
- Determinar la estructura 3D de la toxina CgErgTxI.
- Caracterizar electrofisiológicamente la actividad de la toxina CgErgTxI sobre los canales iónicos hERG3.
- Estudiar el modo de interacción de la toxina CgErgTxI con el canal hERG3 para entender por qué esta toxina es activa únicamente sobre estos canales.
- Estudio de la distribución y fisiología de los canales hERG3, en modelos animales como rata o ratón.
- Determinación de la estructura primaria del péptido toxico en acociles.
- Caracterización bioquímica de la o las enzimas hialuronidasas presentes en el veneno de *C. gracilis*.
- Caracterizar bioquímica y biológicamente los componentes de alto peso molecular del veneno de *C. gracilis*.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal**, S. K. MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker channel. Neuron, 16: 1169-1177.
- Aiyar**, J., Rizzi, J.P., Gutman, G.A. Chandy, G.K. (1996) The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. J. Biol. Chem. 271; 31013-31016.
- Akhavan**, A., Atanasiu R, Shrier A. (2003) Identification of a COOH-terminal segment involved in maturation and stability of human ether-a-go-go-related gene potassium channels. J. Biol. Chem. 278; 40105-40112.
- Alberts**, Bruce., Bray, Dennis., Lewis, Julian., Raff, Martin., Roberts, Keith., Watson James D. Biología Molecular de la Célula. Tercera Edición. 1994. Ediciones Omega.
- Alexander**, S. P. H., Mathie, A. and J. A. Peters. (2007) Guide to receptors and channels. 2nd Edition Br. J. Pharmacol. 110-111.
- Angelo**, K, Korolkova YV, Grunnet M, Grishin EV, Pluzhnikov KA, Klaerke DA, Knaus HG, Møller M, Olesen SP. (2003) A radiolabeled peptide ligand of the hERG channel, [125I]-BeKm-1. Pflugers Arch. 447; 55-63.
- Arcangeli**, A., Bianchi, L., Becchetti, A., Faravelli, L., Coronello, M., Mini, E., Olivotto, M. Wanke, E. (1995) A novel inward rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. J. Physiol Lond. 489: 455– 471.
- Armstrong**, C.M., Bezanilla, F., (1977) Inactivation of the sodium channel: Gating current experiments. J. Gen. Physiol. 70; 567–590.
- Batista**, C. V., D'Suze, G., Gomez-Lagunas, F., Zamudio, F. Z., Encarnacion, S., Sevcik, C., Possani, L. D. (2006) Proteomic analysis of Tityus discrepans scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins Proteomics. 6; 3718-3727.
- Baker**, O. S., Larsson, H. P., Mannuzzu, L. M., Isacoff, E. Y. (1998) Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K⁺ channel gating. Neuron, 20; 1283-94
- Berneche**, S. and Roux, B. (2005) A gate in the selectivity filter of potassium channels. Structure. 13; 591-600.
- Bernstein**, J. (1912) Elektrobiology. Die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage: Vieweg & Sohn.
- Bianchi**, L., Wible, B., Arcangeli, A. (1998) HERG encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis a selective advantage for cancer cells? Cancer Res. 58; 815– 822.
- Cahalan**, M. D. Chandy, G. K. (1997) Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. Curr. Opi. Biotech. 8; 749-756.

- Cevallos**, M. A., Navarro-Duque, C., Varela-Julia, M., Alagon, A. C. (1992) Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Toxicon. 30; 925-930.
- Chandy**, K. G., Douglas, J., Gutman, G. A., Jan, L., Joho, R., Kaczmarek, L., Mackinnon, D., North, R. A., Numa, S., Philipson, L. (1991) A simplified gene nomenclature. Nature. 352; 26.
- Chandy**, KG., Gutman, GA., (1993) Nomenclature for mammalian potassium channel genes. Trends Pharmacol Sci. 14; 434.
- Chiesa**, N., Rosati, B., Arcangeli, A., Olivetto, M. Wanke, E. (1997) A novel role for ERG K⁺ channels: spike frequency adaptation. J.Physiol. 501:313–318.
- Coetzee**, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz De Miera, E. Rudy, B. (1999) Molecular Diversity of K⁺ Channels. Annals of the New York Academy of Sciences. 868; 233-285.
- Coetzee**, W. A., Rudy, B. (2006) Potassium Channels. Encyclopedia of Life Sciences.
- Corona**, M., Gurrola, G. B., Merino, E., Cassulini, R. R., Valdez-Cruz, N. A., García, B., Ramírez-Domínguez, M. E., Coronas, F. I., Zamudio, F. Z., Wanke, E., Possani, L. D. (2002) A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺channels blocking peptides from scorpions of the genus Centruroides. FEBS Lett. 532; 121-126.
- Deal**, K. K., England, S. K., Tamkun, M. M. (1996) Molecular physiology of cardiac potassium channels. Physiol. Rev. 76; 49- 67.
- Delano**, W. L. (2002) Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. Curr Opin Struct Biol. 12; 14-20
- Deutsch**, C., Chen, Li-Qiong. (1993) Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes. Functional consequences for volume regulation. Proc. Natl. Acad. 90; 10036-10040.
- Di Ferrante**, N. (1955) Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. The Journal of Biological Chemistry. 303-306.
- Dias da Silva**, W., Kipnis, T. L. (2001) Venoms. Encyclopedia of Life Sciences.
- Doyle**, D. A., Morais-Cabral, J., Pfuetzner, A. K., Gulbis, J. M., Cohen, S. T., Chait, B. T. Mackinnon. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science. 280; 69-77.
- Dun**, W., Jiang, M., Tseng, G. N. (1999) Allosteric effects of mutations in the extracellular S5-P loop on the gating and ion permeation properties of the hERG potassium channel. Pflugers Arch. 439; 141-149.
- Frenal**, K., Xu, C. Q., Wolff, N., Wecker, K., Gurrola, G. B., Zhu, S. Y., Chi, C. W., Possani, L. D., Tytgat, J., Delepiepierre, M. (2004) Exploring structural features of the interaction between the scorpion toxin CnErgI and ERG K⁺ channels. Proteins. 56; 367–375.

- Garcia**, M. L., Hanner, M., Knaus, H. G., Koch, R., Schmalhofer, W., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J. (1997) Pharmacology of potassium channels. Adv. Pharmacol. 39; 425–471.
- Gurrola**, G. B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L. D., Wanke, E. (1999) A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. FASEB J. 13; 953-62.
- Gutman**, G. A., Chandy, G. K., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., Covarrubias, M., Desir, G. V., Furuichi, K., Ganetzky, B. (2003) Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. Pharmacol. Rev. 55; 583-586.
- Hamill**, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J. (1981) Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pfuegers Arch. 391; 85-100.
- Heginbotham**, L., Lu, Z., Abramson, T., Mackinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. J. Biophys. 66; 1061-1067.
- Hill**, A. P., Sunde, M., Campbell, T. J., Vandenberg, J. I. (2007) Mechanism of block of the hERG K⁺ channel by the scorpion toxin CnErgI. Biophys. 92; 3915-3929.
- Hodgking**, A. L., Huxley, A. F. (1939) Action potentials recorded from inside a nerve fibre. Nature. 144; 710-711.
- Hodking**, A. L., Huxley A. F. (1945) Resting and action potentials in single nerve fibres. J. Physiol. Lond. 104; 176-195.
- Hodking**, A. L., Huxley, A. F. (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. J. Physiol. Lond. 116; 473-496.
- Jiang**, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R. (2003) X-ray structure of voltage-dependent K⁺ channel. Nature. 423; 33-41.
- Karp**, G. *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. Traducido de la primera edición 1998.
- Korolkova**, Y. V., Kozlov, S. A., Lipkin, A. V., Pluzhnikov, K. A., Hadley, J. K., Filippov, A. K., Brown, D. A., Angelo, K., Strøbaek, D., Jespersen, T., Olesen, S. P., Jensen, B. S., Grishin, E. V. (2001) An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*. J Biol Chem. 276; 9868-9876.
- Kukuljan**, M., Labarca, P., Latorre, R. Molecular determinants of ion conduction and inactivation in K⁺ channels. Am J Physiol. 268; 535-556.
- Kuo**, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthberton, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., Doyle, D. A. (2003) Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. Science. 300, 1922-1926.
- Laemmli**, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

- Larsson**, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S., Isacoff, E. Y., (1995) Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4. Neuron. 16; 387-397.
- Legros**, C., Céard, B., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M. F. (1998) Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. FEBS Lett. 431; 375 – 380.
- Liu**, Y., Jurman, M. E., Yellen, G. (1996) Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. Neuron. 16; 859-867.
- MacKinnon**, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage activated potassium channel. Nature Lond. 350; 232-235.
- MacKinnon**, R., Aldrich, R. W., Lee, A. W. (1996) Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. Science. 262; 757-759.
- Medeiros-Domingo**, A., Hurrealde-Torres P., Ackerman M. J. (2007) Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome. Rev. Esp. Cardio. 60; 739-752.
- Minor**, D. L., Lin, Y. F., Mobley, B. C., Avelar, A., Jan, Y. N., Jan, L. Y., Berger, J. M. (2000) The polar T1 interface in linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. Cell. 102; 657-670.
- Mitcheson**, J. S., Perry, M. D. (2003) Molecular determinants of high-affinity drug binding to HERG channels. Curr Opin Drug Discov Devel. 2003 6; 667-674.
- Mühlbauer**, E., Bazwinsky, I., Wolgast, S., Klemenz, A., Peschke, E. (2007) Circadian changes of ether-a-go-go-related-gene (Erg) potassium channel transcripts in the rat pancreas and beta-cell. Cell Mol Life Sci. 64; 768-80
- Neher**, E., Sackmann, B. (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature Lond. 260; 799-802.
- Neuhoff**, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1981). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis. 9; 255-262.
- Nirathanan**, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J.S., Sato, K., Tytgat, J. (2005) Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a nontoxic homologue of kappa-hefutoxin-I, from *Heterometrus spinifer* venom. Biochem. Pharmacol. 69; 669–678.
- Noda**, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Kakayama, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyatta, T., Numa, S. (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. Nature. 312; 121-127.
- Papa**, M., Boscia, F., Canitano, A., Castaldo, P., Sellitti, S., Annunziato, L., Tagliatela, M. (2003) Expression pattern of the ether-à-go-go-related (ERG) K⁺ channel encoding genes ERG1, ERG2, and ERG3 in the adult rat central nervous system. J Comp Neurol. 466; 119–135.

- Papazian, DM., Timpe, LC., Jan, Y. N., Jan, L. Y.** (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. Nature. 24; 305-310.
- Pardo-López, L., Zhang, M., Liu, J., Jiang, M., Possani, L. D., Tseng, G. N.** (2002) Mapping the binding site of a human ether-à-go-go-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule. J Biol Chem. 277;16403–16411, (a).
- Pardo-López, L., García-Valdés, J., Gurrola, G. B., Robertson, G. A., Possani, L. D.** (2002) Mapping the receptor site for ergotoxin, a specific blocker of ERG channels. FEBS Lett. 10; 45-49, (b).
- Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray, D., Giese, K. P., Silva, A.J., Storm, J. F.** (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. Ann N Y Acad Sci. 868; 344-355.
- Possani, L. D., Martin, B. M., Svendsen, I. B.,** (1982) The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 47; 285.
- Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril, B.** (2000) Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie. 82; 861-8.
- Prestipino, G., Valdivia, H. H., Liévano, A., Darszon, A., Ramírez, A. N., Possani, L. D.** (1989) Purification and reconstitution of potassium channel proteins from squid axon membranes. FEBS Lett. 250; 570-574.
- Restano-Cassulini, R., Korolkova, Y.V., Diochot, S., Gurrola, G., Guasti, L., Possani, L., Lazdunski, M., Grishin, E., Arcangeli, A., Wanke, E.** (2006) Species diversity and peptide toxins blocking selectivity of ERG subfamily K⁺ channels in CNS. Mol. Pharmacol. 69; 1673–1683.
- Restano Cassulini, R., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F., Becerril, B., Possani, D. L.** (2008) Two Novel Ergtoxins, blockers of K⁺ channels, purified from the Mexican scorpion *Centruroides elegans elegans*. Neurochem Res. 33; 1525-1533.
- Roden, DM.** (2004) Drug-induced prolongation of the QT interval. Engl J Med. 350; 1013-1022.
- Rodgers, H. C., Knox, A. J.** (2001) Pharmacological treatment of the biochemical defect in cystic fibrosis airways. Eur Respir J. 17;1314–1321.
- Rodríguez de la Vega, R. C., Possani, L. D.** (2005) Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, Structure-function relationships and evolution. Toxicon. 46; 831-844.
- Rodríguez de la Vega, R. C., Possani, L. D.** (2004) Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. Toxicon. 43; 865-875.
- Saganich, M. J., Machado, E., Rudy, B.** (2001) Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. J Neuroscience. 21; 4609–4624.
- Sali, A., Blundell, T. L.** (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J Mol Biol. 234: 779-815.

- Schagger, H., G. von Jagow.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379.
- Selisko, B., Garcia, C., Becerril, B., Delepierre, M., Possani, L.D.,** (199). An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann. cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. Eur. J. Biochem. 242; 235–242.
- Seoh, S.A., Sigg, D., Papazian, D. M., Bezanilla, F.** (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. Neuron. 16; 1159-1167.
- Shi, W., Wymore, R.S., Wang, H.S., Pan, Z., Cohen, I.S., McKinnon, D., Dixon, J. E.** (1997) Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. J. Neurosci. 17; 9423-32.
- Shieh, C. C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., Gopalakrishnan M.** 2000 Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. Pharmacol Rev. 52; 557–593.
- Snyders, Dirk J.** (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. Cardiovascular Research. 42; 377-390.
- Srinivasan, K.N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T.K., Sato, K., Tytgat, J., Yu, C., San, B.C.** (2002) kappa-Hefutoxin I, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. J. Biol. Chem. 277; 30040–30047.
- Switzer, R. C., Merrill, C. R., Shifrin, S.** (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 98; 231-237.
- Szabò, I., Adams, C., Gulbins, E.** (2004) Ion channels and membrane rafts in apoptosis. Eur. J. Physiol. 448; 304-312.
- Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Valenzuela, C., Delpón, E.** (2003) Pharmacology of cardiac potassium channels. Cardiovasc Res. 62; 9-33.
- Tamargo, J.** (2004) Los poros y los canales iónicos regulan An. R. Acad. Nac. Farm. 70: 9-31
- Torres, A. M., P. Bansal, P. F. Alewood, J. A. Bursill, P. W. Kuchel, J. I. Vandenberg.** (2003) Solution structure of CnErgI (Ergtoxin), a HERG-specific scorpion toxin. FEBS Lett. 539; 138–142, (a).
- Torres, A. M.; Bansal, P. S.; Sunde, M.; Clarke, C. E.; Bursill, J. A.; Smith, D. J.; Bauskin, A.; Breit, S. N.; Campbell, T. J.; Alewood, P. F.; Kuchel, P. W.; Vandenberg, J. I.** (2003) Structure of the HERG K⁺ channel S5P extracellular linker: role of an amphipathic alpha-helix in C-type inactivation. J. Biol. Chem. 278; 42136- 42148, (b).
- Trimmer, J.S.** (1993) Expression of delayed rectifier K⁺ channel isoforms in the developing rat brain. FEBS Lett. 324; 205- 210.
- Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M. F., van der Walt, J. J., Possani, L. D.** (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. Trends Pharmacol Sci. 20; 444-447

Vandenberg, J. I., Walker, B. D., Campbell, T. J. (2001) HERG K⁺ channels : friend and foe. Trends Pharmacol Sci. 22:240-22246

Viskin, S., Justo, D., Halkin, A., Zeltser, D. (2003) Long QT syndrome caused by noncardiac drugs. Prog Cardiovasc Dis. 45; 415-427

Warmke, J. W., Ganetzky, B. (1994) A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals. Proc Natl Acad Sci. 91; 3438-4342.

White, E. J., Park, S. J., Foster, J. A., Huizinga, J. D. (2008) Ether-a-go-go related gene 3 is the main candidate for the E-4031 sensitive potassium current in the pacemaker interstitial cells of Cajal. Physiol Gastrointest. 295; G691-699.

Wonderlin, W. F., Strobl, J. L. (1996) Potassium channels, proliferation and GI progression. J. Membrane. Biol. 154; 91-107.

Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T., Jurman, M. E. (1994) An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. Biophys. J. 66:1068-1075.

Yellen, G. The moving parts of voltage-gated ion channels. (1998) Q Rev Biophys. 31: 239–295.

Yusaf, S. P., Wray, D., Sivaprasadarao, A. (1996). Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. Pflugers Arch. 433; 91-97.

Zamudio, F. Z., Gurrola G. B., Arévalo C., Sreekumar R., Walker J. W., Valdivia H. H., Possani L. D. (1997) Primary structure and synthesis of Imperatoxin A (IpTx(a)), a peptide activator of Ca²⁺ release channels/ryanodine receptors. FEBS letters 405; 385-389.

Zhijian, Cao., Feng, Luo., Yingliang, Wu., Xin, Mao., Wenxin, Li. (2006) Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. Toxicon. 47; 348–355

Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., MacKinnon, R. (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. Nature. 411; 657-661.

Zhu, S., Bosmans, F., Tytgat, J. (2004). Adaptive evolution of scorpion sodium channel toxins. J. Mol. Evol. 58; 145–153.

Recursos en Internet:

- <http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/scorpion/>
- www.qtdrugs.org
- www.cgl.ucsf.edu/chimera