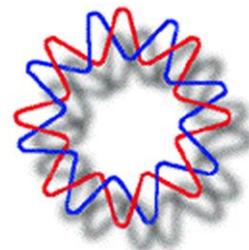




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS



DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

**Búsqueda y caracterización de fracciones peptídicas con
propiedades analgésicas en venenos de arañas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

L.Q. Guillermo Alberto Barraza Garza



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.

A mi familia y amigos
Y a ti la mujer que sigo buscando

Agradecimientos:

Agradezco a todo mi familia en especial a mis padres y hermana por siempre estar pendiente de mí y seguirme alentando a avanzar. A mis amigos, presentes conmigo durante estos mis primeros dos años viviendo fuera de Juárez en especial a: Adriana, Lorenzo, Rosby, Juana María, Alexis, Claudia V., Enrique, Martha, Lilu, Lidia, Irán, Elida, Melissa, Cesar, Conny, Claudia B., Fernando y Blanca. Y a todos aquellos que estando mi ciudad natal y otras partes siguen preocupándose por mí: Ruth, Griselda, Gisela, Oscar, Sergio, Adrian, Anais, Patricia, Fernanda, Guadalupe, Daniela, Nora, Brenda y mas que si continuo no termino, muchas gracias a todos ellos por su apoyo, platicas y consejos.

Al personal de IBt – UNAM que me ha ayudado y compartido conocimientos, en particular a: Herlinda, Timoteo, Freddy, Chano, Ricardo, Daniel, Carmen, Felipe, Alejandro y Alejandro C. A los Doctores Lourival D. Possani P., Alejandro Alagón Cano y Baltazar Becerril, por haberme proporcionado ayuda, conocimientos y sus laboratorios para poder realizar este proyecto. También a todos los animales usados durante este proyecto de investigación, sin los cuales no hubiese podido ser realizado. Al Conacyt y a la UNAM. Y a todos aquellos que no he nombrado pero gracias a los cuales he podido llegar a este momento.

Pero sobre todo a mi tutor el cual ha confiado en mí, muchas gracias Dr. Gerardo Corzo.

¡México, Pumas, Universidad!

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Fisiología y Fisiopatología del dolor	4
1.2. Nocicepción	5
1.2.1 Nociceptores	6
1.2.1.1 Fibras-A	8
1.2.1.2 Fibras-C	8
1.2.1.3 Sensibilización	10
1.2.1.4 Receptores nociceptivos	10
2. Antecedentes	12
2.1 Analgésicos	12
2.2 Funcionamiento general de los analgésicos en el sistema nervioso	14
2.3 Analgésicos provenientes de venenos animales	14
2.4 Analgésicos en venenos de arañas	16
2.5 Péptidos con el motivo estructural ICK y DDH	19
2.6 Estudios realizados con los venenos utilizados en el presente trabajo	23
3. Hipótesis	23
4. Justificación	24
5. Objetivos	24
5.1 Objetivo General:	24
5.2 Objetivos Particulares:	24
6. Metodología	25
6.1. Estrategia experimental	25
6.2. Material biológico	26
6.3. Extracción de veneno	27
6.4. Separación por métodos cromatográficos	28
6.4.1 Repurificación de péptidos	28
6.4.2 Cuantificación de proteína	28
6.5. Métodos biológicos	28
6.5.1. “Hot-Plate” método estándar	28
6.5.2. Test de Formalina	29
6.6. Caracterización química de fracciones puras	30
6.7. Construcción de bibliotecas de cDNA	31
6.8. Obtención de secuencias por medio de RACE-PCR	32
6.9. Análisis estadístico	32

7. Resultados	32
7.1 Cromatografía semipreparativa de los venenos en estudio.	32
7.2 Pruebas de “Hot-Plate”	33
7.2.1 Pruebas con el veneno de <i>Aphonopelma seemanni</i>	34
7.2.2 Pruebas con el veneno de <i>Brachypelma verdezy</i>	35
7.2.3 Pruebas con el veneno de <i>Cyclosternum fasciatum</i>	37
7.2.4 Repurificación de fracciones peptídicas.	39
7.2.5 Prueba de “Hot-plate” con péptidos puros	40
7.3 Ensayo con formalina	41
7.4 Caracterización química	42
7.5 Construcción de librerías de cDNA y Resolución de estructura primaria por medio de RACE-PCR	45
7.7 Estructura tridimensional propuesta en base a alta identidad con otros péptidos.	46
7.8 Actividad insecticida de BvTx47	47
8. Discusión.	48
8.1 Cromatografías.	48
8.2 Ensayos biológicos.	48
8.3 Caracterización de péptidos.	51
8.4 Estructura tridimensional.	55
9. Conclusiones y perspectivas.	56
Anexo 1. Purificación del veneno por HPLC de fase reversa	65
Anexo 2. Espectrometría de masas	71
Anexo 3. Fracciones repurificadas	73
Anexo 4. Protocolos utilizados para la realización de bibliotecas de cDNA. .	75
Anexo 5. Preparación de medio SOC.	77
Anexo 6. Oligonucleótidos utilizados para la búsqueda de los RNA mensajeros en las librerías	77
Anexo 7. Protocolo de realización de bibliotecas de cDNA	79
Anexo 8. Obtención de secuencias por medio de RACE-PCR.	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Ejemplos de péptidos con propiedades analgésicas provenientes de veneno y de secreciones de animales.....	15
Tabla 2	Comparativo del Prialt o ω -conotoxina MVIIA con péptidos con acción analgésica provenientes del veneno de arañas.....	19
Tabla 3	Dosis y efecto analgésico de fracciones proteicas del veneno de <i>Aphonopelma seemanni</i> en ratones.....	34
Tabla 4	Dosis y efecto analgésico de fracciones proteicas del veneno de <i>Brachypelma verdezy</i> en ratones.....	36
Tabla 5	Dosis y efecto analgésico de fracciones proteicas del veneno de <i>Cyclosternum fasciatum</i> en ratones.....	38
Tabla 6	Secuencias amino terminal de péptidos con actividad analgésica.....	43
Tabla 7	Comparación de la secuencia de AsTx48 con otros péptidos...	43
Tabla 8	Comparación de la secuencia de BvTx47 con otros péptidos...	44
Tabla 9	Comparación de la secuencia de BvTx55 con otros péptidos...	44
Tabla 10	Oligonucleótidos utilizados para obtener transcritos de los péptidos analgésicos.....	45
Tabla 11	Secuencia completa del péptido BvTx47 y su identidad con el péptido Ba1.....	46
Tabla 12	Actividad insecticida de BvTx47.....	47
Tabla 13	Datos de analgesia de péptidos provenientes de animales ponzoñosos.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Tipos de dolor.....	4
Fig. 2	Ejemplos de transmisión de dolor.....	6
Fig. 3	Estructura tridimensional de un péptido DDH y uno ICK.....	22
Fig. 4	Estructura conservada de genes ICK.....	23
Fig. 5	Estrategia experimental.....	25
Fig. 6	Especies de arañas usadas en este proyecto.....	26
Fig. 7	Distribución de las especies de las especies de arañas usadas en el proyecto.....	26
Fig. 8	Extracción de veneno.....	27
Fig. 9	Tiempos de latencia en la prueba de “Hot-plate” con las fracciones del veneno de <i>A. seemanni</i>	35
Fig. 10	Tiempos de latencia en la prueba de “Hot-plate” con las fracciones del veneno de <i>B. verdezy</i>	37
Fig. 11	Tiempos de latencia en la prueba de “Hot-plate” con las fracciones del veneno de <i>C. fasciatum</i>	39
Fig. 12	Tiempos de latencia en la prueba de “Hot-plate” con las fracciones repurificadas del veneno de las tres especies de arañas	40
Fig. 13	Segundos de lamida presentados en la prueba de formalina.....	41
Fig. 14	Modelos tridimensionales de BvTX47.....	46
Fig. A	Cromatograma del veneno de <i>A. seemanni</i> (I)	65
Fig. B	Cromatograma del veneno de <i>A. seemanni</i> (II).....	66
Fig. C	Cromatograma del veneno de <i>B. verdezy</i> (I).....	67
Fig. D	Cromatograma del veneno de <i>B. verdezy</i> (II).....	68
Fig. E	Cromatograma del veneno de <i>C. fasciatum</i> (I).....	69
Fig. F	Cromatograma del veneno de <i>C. fasciatum</i> (II).....	70

Fig. G	Espectrofotometría de masas del péptido AsTx48.....	71
Fig. H	Espectrofotometría de masas del péptido BvTx47.....	71
Fig. I	Espectrofotometría de masas del péptido BvTx55.....	72
Fig. J	Fracción AsTx48 repurificada.....	73
Fig. K	Fracción BvTx47 repurificada.....	73
Fig. L	Fracción BvTx48 repurificada.....	74
Fig. M	Fracción BvTx55 repurificada.....	74

ABREVIATURAS

ASIC	Canal iónico sensible a ácido
AsTx	Toxina de <i>Aphonopelma seemanni</i>
BvTx	Toxina de <i>Brachypelma verdezy</i>
Ca_v	Canal de calcio dependiente de voltaje
CfTx	Toxina de <i>Cyclosternum fasciatum</i>
CNS	Sistema nervioso central
DE₁₀₀	Dosis Efectiva 100
DDH	Rizo guiado por disulfuros.
dNTP's	Desoxiribonucleotidos trifosfatados
FDA	Administración Federal de drogas y alimentos
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
ICK	Nudo inhibidor de cisteínas
ICV	Intracerebro ventricular
IP	Intraperitoneal
Na_v	Canal de sodio dependiente de voltaje
NSAID	Fármaco anti-inflamatorio no esteroideo
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PNS	Sistema nervioso periférico
PBS	Buffer de fosfatos
rpHPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución por fase reversa
TFA	Ácido trifluoroacético
TRPV	Receptores de potenciales transitorios vaniloides
UFC	Unidad formadora de colonia

Resumen

La búsqueda de nuevos fármacos nos ha llevado a estudiar nuevas sustancias en la naturaleza entre las que se encuentran los venenos y secreciones de numerosos animales ponzoñosos. Estos venenos contienen varios tipos de moléculas con potencial terapéutico, entre ellas enzimas, factores anticoagulantes, inhibidores de enzimas y analgésicos (Rajendra *et al.*, 2004).

Con respecto a los analgésicos, se conocen un tipo de péptidos denominados conotoxinas, procedentes de los venenos de caracoles marinos, donde se han encontrado sustancias con propiedades antinociceptivas similares y/o superiores a la de varios opioides de uso común como la morfina (Livett *et al.*, 2006). Las conotoxinas son péptidos con una masa molecular de 2 a 4 KDa con una estructura compacta debido a un contenido relativamente alto de puentes disulfuro con respecto a otros péptidos o proteínas (Livett *et al.*, 2006 y Zhang *et al.*, 2007), lo cual les confiere una buena estabilidad biológica y estructural. Este tipo de péptidos en cuanto a tamaño y número de puentes disulfuro también se encuentran en los venenos de otros animales como en los venenos de arañas, en especial de especies de la familia *Theraposidae* (Chen *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2008 y Schmalhofer *et al.*, 2008).

El presente trabajo reporta la búsqueda de péptidos con propiedades analgésicas contenidas en los venenos de tres especies de arañas mexicanas de la familia *Theraposidae* pertenecientes a los géneros *Aphonopelma*, *Brachypelma* y *Cyclosternum*.

En el trabajo se detalla la purificación mediante cromatografía por HPLC de las fracciones proteicas de los venenos de las especies *Aphonopelma seemanni*, *Brachypelma verdezy* y *Cyclosternum fasciatum*. También se reporta la capacidad analgésica de dichas fracciones en ratones CD-1 machos, utilizando los ensayos de "Hot Plate" y formalina. Encontrándose cinco péptidos con propiedades analgésicas, uno en el veneno de *Aphonopelma seemanni* nombrado AsTx48, tres

en el veneno de *Brachypelma verdezy*, nombrados BvTx47, BvTx48 y BvTx55 y uno más en el veneno de *Cyclosternum fasciatum* nombrado CfTx54. En este proyecto se realizó el secuenciamiento parcial del N-terminal de los péptidos con actividades analgésicas y se crearon bancos de cDNA a partir de las glándulas venenosas de las tres especies con el fin de determinar la estructura química primaria completa de los péptidos con dichas propiedades analgésicas. Con las cuales se obtuvo una aproximación a la secuencia primaria completa de los péptidos AsTx48, BvTx47, BvTx48 y BvTx55, donde se puede observar la presencia de cisteínas, características de los péptidos reportados que encuentran presentes en los venenos de arañas (Zhu *et al.*, 2003) Finalmente se detalla la estructura primaria del péptido BvTx47, así como su estructura tridimensional por medio de aproximaciones *in silico*, siendo este péptido el cual presentó propiedades analgésicas comparado con analgésicos de uso común en las concentraciones mínimas donde presentan su actividad biológica, así como propiedades insecticidas en grillos comunes (*Acheta domesticus*).

En base a los resultados obtenidos, podemos dar por sentado que los venenos de estos animales son una fuente nueva de péptidos con posibles propiedades terapéuticas, en particular con propiedades analgésicas, así como su posible uso para cumplir otras actividades biológicas. El siguiente paso de esta investigación será el determinar los mecanismos por los cuales se presentan estos efectos en tanto en mamíferos, como en insectos.

1. Introducción

El dolor es un mecanismo que utiliza nuestro organismo para alertarnos acerca de lo que sucede en nuestro alrededor, tal es el caso del dolor que sentimos a causa de una quemadura o el dolor de un apéndice que está a punto de reventar. Sin embargo esto no quiere decir que se trate de una sensación uniforme a la cual cataloguemos únicamente como dolor, ya que sentimos dolor de muy distintas maneras dependiendo de cuál es el origen o causa del mismo. De hecho, el tratar de dar una escala de medida exacta al mismo, es prácticamente imposible, ya que se trata de una sensación subjetiva (Buschmann *et al.*, 2002). Debido a esta alta variabilidad en lo que nos hace sentir dolor, es que lo clasificamos principalmente en dolor de tipo agudo y crónico (Fig. 1) (García-Fajardo *et al.*, 2002).

El dolor de tipo agudo es una experiencia que usualmente es de corta duración y sirve para alertar al organismo acerca de un daño tisular, que al ser percibido por el individuo este toma las medidas protectoras o evasivas necesarias para minimizar el daño. Este tipo de dolor tiende a disminuir conforme pasa el tiempo (McGivern, 2007) (Fig.1).

Mientras que el dolor de tipo crónico representa una señal anormal que es de amplia duración y aparentemente no tiene ningún uso funcional para un organismo, pero es asociado normalmente con enfermedades que presentan inflamación de tejidos o daño a neuronas del sistema nervioso central (CNS) o del sistema nervioso periférico (PNS), en algunos de los casos más complejos el dolor crónico puede deberse a una combinación de dolor por inflamación y dolor neuropático (McGivern, 2007) (Fig.1).

A pesar de que a partir de la década de los 60's se han realizado grandes avances en el estudio del dolor, los tratamientos existentes contra este no son totalmente eficaces para todos los casos, ya que existen algunos donde el dolor aún no es tratable (Buschmann *et al.*, 2002). Incluso hay algunos padecimientos que siguen siendo manejados de manera equivocada usando medicamentos que ya no son de uso común, los cuales tienen un gran número de efectos secundarios y no una

acción específica tales como algunas fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) (Villarejo *et al.*, 2001).

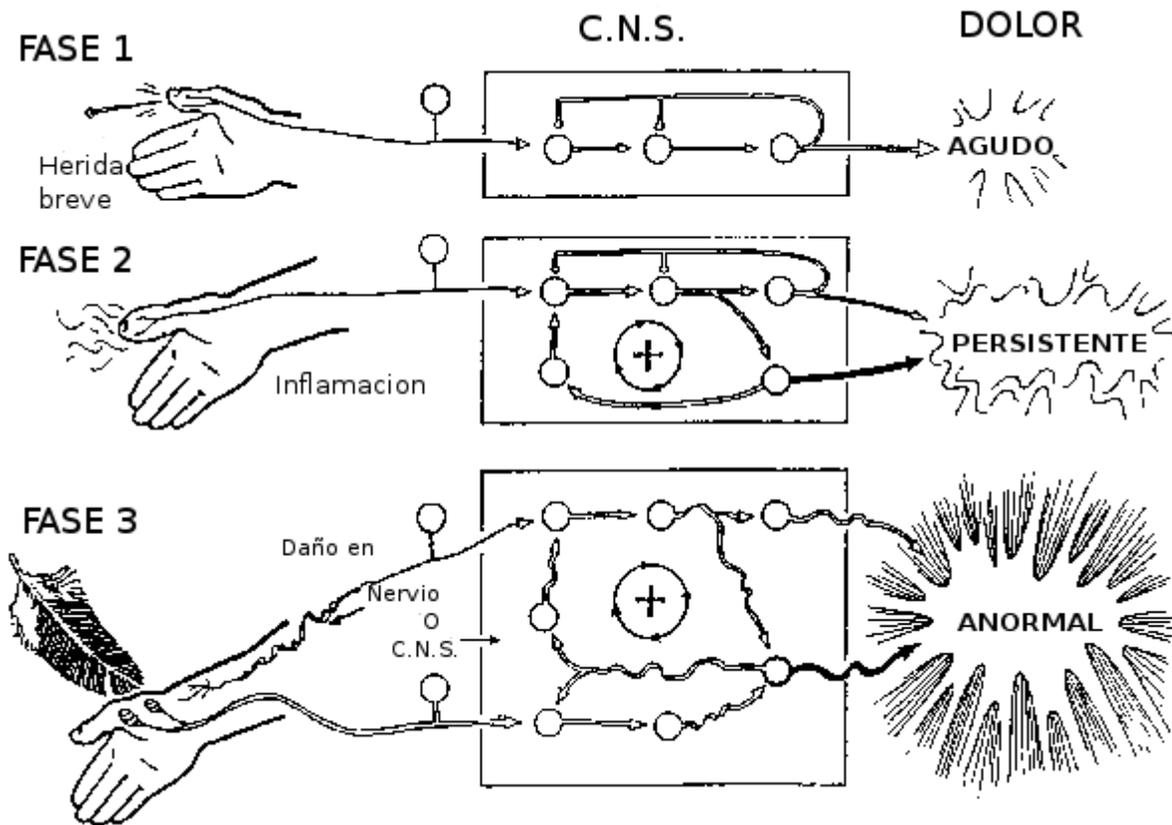


Figura 1. Tipos de dolor. A) Fase 1; consiste del dolor agudo el cual dura poco tiempo, B) Fase 2; es más prolongada y produce un estímulo dañino y C) Fase 3; la cual se produce si existe daño en un nervio periférico (Brooks y Tracey, 2005).

1.1. Fisiología y Fisiopatología del dolor

Los aspectos fisiológicos del dolor se vuelven evidentes cuando el daño que recibe el tejido es lo suficientemente intenso como para estimular a los extremos nociceptivos de las fibras-C nerviosas, los cuales se encuentran en toda la superficie del cuerpo y en los órganos internos (Riedel y Neeck, 2001). Además un gran número de subtipos de fibras-A también atraen impulsos nociceptivos aferentes (Buschmann *et al.*, 2002). La transmisión del dolor se da a partir del tejido dañado el cual manda un impulso nervioso con dirección a la corteza cerebral (Fig. 1), donde dicho impulso se traduce en una sensación consciente de

dolor. Además de dicha señal, los tejidos dañados producen varias sustancias que a su vez producen dolor, entre las cuales se encuentra la serotonina, la bradikina, la histamina, la acetilcolina entre otras sustancias las cuales pueden actuar de manera sinérgica para elevar la sensación de dolor (Rajendra *et al.*, 2004).

Un dolor severo y continuo puede desencadenar un reflejo o sensación de dolor de larga duración en la espina dorsal y el sistema nervioso simpático, que puede llevar a la producción de hormonas y otras sustancias que desemboquen en un estado de dolor crónico llamado hiperalgesia (Matthews y Dickenson, 2001).

La acción analgésica de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) tiene la habilidad de prevenir la producción de prostaglandinas las cuales juegan un papel clave en la sensibilización de receptores mediadores del dolor (Villarejo *et al.*, 2001) (Fig.2).

1.2. Nocicepción

La importancia de tener un sistema de “detección y protección ante amenazas” es ilustrada por el hecho de que la mayoría de los animales tienen aferentes sensitivas que responden a estímulos nocivos llamados nociceptores. La nocicepción es una respuesta a una fuerte estimulación de los nociceptores o fibras nociceptivas, las cuales son extremos terminales de nervios periféricos, la mayoría se encuentra en la piel, pero también pueden encontrarse en otros sitios cercanos a esta, así como en los órganos y distribuidos en el sistema nervioso periférico (Buschmann *et al.*, 2002) (Fig.1). Las señales que son transmitidas por medio de los nociceptores, cuando llegan al cerebro son interpretadas como dolor (Villarejo *et al.*, 2001).

La diferencia entre dolor y nocicepción por parte de la IASP (International Association for the Study of Pain) indica como principal disimilitud que el dolor tiene una componente emocional (Smith y Lewin, 2009).

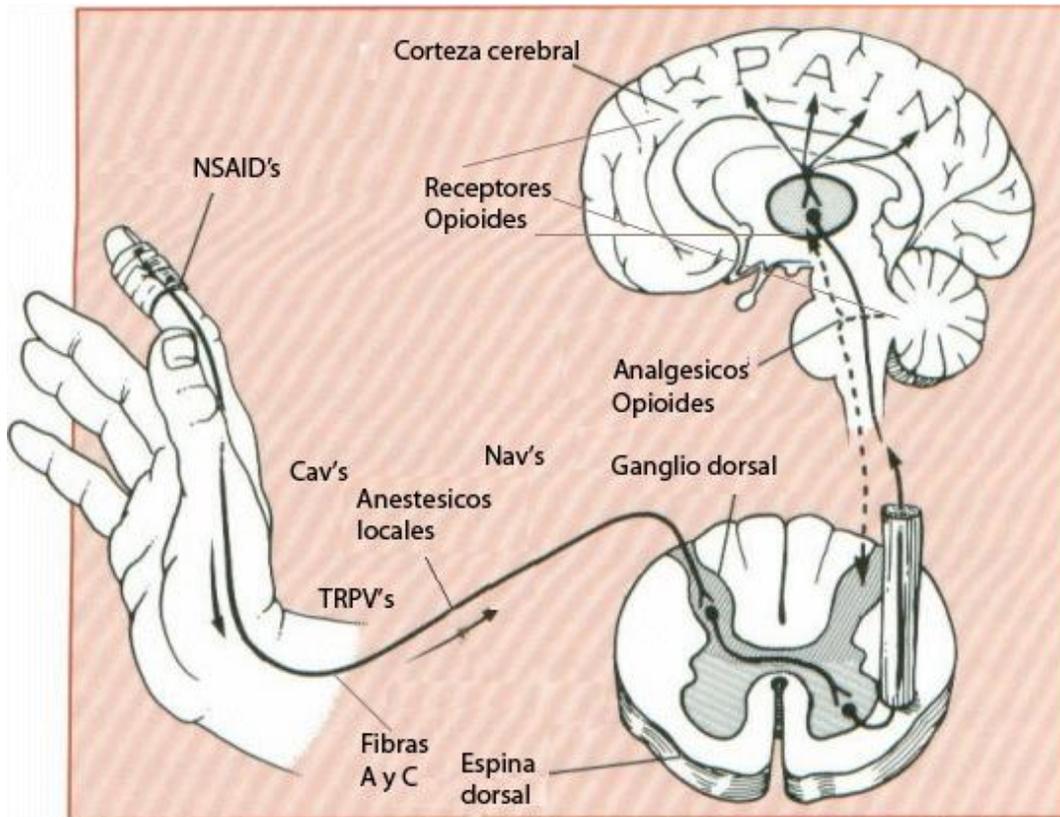


Figura 2. Ejemplo de transmisión de dolor. Transmisión del dolor desde aferentes nerviosas situadas en distintos puntos del organismo, hasta llegar al ganglio dorsal de donde son mandadas a distintas zonas del cerebro donde terminan siendo interpretadas como dolor. Existen nociceptores distribuidos a lo largo de esta vía y los medicamentos de uso común actúan a distintos niveles de esta vía (Buschmann *et al.*, 2002).

1.2.1 Nociceptores

La idea de que existían sensores aferentes que detectaran específicamente estímulos nocivos fue propuesta por primera vez por Charles Sherrington quién menciona que *“existe una considerable evidencia de que la piel está provista con un conjunto de terminaciones nerviosas, cuyo oficio específico es detectar estímulos que dañan la piel, preferentemente nocipiente”* (Sherrington y Laslett, 1903).

Los primeros conocimientos en el estudio de los nociceptores provienen del trabajo de Burgess y Perl (1967) Usando el método de nervio sensibilizado y registrando fibras aferentes A δ y fibras-C en nervios cutáneos de gato.

Demostrando que existían ciertas clases de aferentes las cuales solo responden a estímulos nocivos.

El término nociceptor en este trabajo es utilizado como aquel aferente capaz de responder al daño de tejido a diferencia de aquellos que por lo general solo perciben estímulos inocuos. La activación del nociceptor inicia típicamente con la transducción que es un proceso en el cual se lleva cabo un cambio conformacional en las proteínas específicas que se localizan en la terminación del nociceptor y que directa o indirectamente provocan la apertura o cerrado de los canales iónicos (Treede *et al.*, 1992). Los cambios resultantes en el flujo iónico a través de la membrana plasmática producen un cambio en el potencial de membrana, lo que se conoce como potencial generador.

Morfológicamente un nociceptor es una terminación nerviosa libre que se encuentra conectado al CNS por medio de fibras nerviosa mielinizadas (Fibras-A) o desmielinizadas (Fibras-C), una de las localizaciones más frecuentes de las terminaciones nerviosas libres es en la pared de las arteriolas y el tejido conectivo circundante (Mense *et al.*, 2009).

En mamíferos la piel es la que se encuentra más frecuentemente expuesta a un potencial estímulo dañino y es por ello que las terminales aferentes de esta área han sido ampliamente examinadas (Smith y Lewin, 2009).

Nuestro conocimiento de la función de los nociceptores y la nocicepción proviene de 4 métodos experimentales principalmente; 1) Examinación electrofisiológica de las respuestas de fibras aferentes simples en preparaciones de nervios sensibilizados; 2) Análisis “patch-clamp” de toda la célula de un cultivo de neuronas sensitivas; 3) Microneurografía en humanos voluntarios y 4) El estudio del entorno de un organismo en respuesta a un estímulo nocivo (Smith y Lewin, 2009).

También es posible registrar a partir de fibras aferentes en humanos despiertos a través de la técnica de microneurografía desarrollada por Valbo y Hagbarth, 1968.

Dicha técnica ha permitido confirmar muchos de los descubrimientos hechos en estudios con animales con las obvias ventajas de comunicación.

La percepción del dolor es generalmente provocada por un estímulo de alta intensidad ya sea mecánico, químico o térmico.

En cuanto a los aferentes cutáneos estos se dividen en 2 grupos principales de acuerdo al calibre del axón y su mielinización; 1) Las fibras-A que son de gran diámetro y están mielinizadas; y 2) fibras-C que son de diámetro pequeño y sin mielina. Varios axones de las fibras-C se encuentran empacados en paquetes Remak que se encuentran cubiertos por células de Schwann. Las fibras-A conducen sus potenciales de acción de manera más rápida que las fibras-C (Fibra-A, 1.2 – 40 m/s y Fibras-C, 0.3 – 1.2 m/s) (Smith y Lewin, 2009).

1.2.1.1 Fibras-A

Las fibras A tipo β tienen un gran diámetro y una cubierta delgada de mielina, estas son fibras conductoras muy rápidas relacionadas a la detección de estímulos mecánicos no nocivos.

Las fibras A tipo δ (A δ) tienen un diámetro axonal más pequeño y una capa más delgada de mielina y son activados por estímulos nocivos de alta intensidad. Las fibras A δ son mecanonociceptores y pierden su mielina en sus extremos los cuales se encuentran libres. Estudios en ratones han mostrado que algunos de los A δ mecanonociceptores son termosensibles, 12% son sensibles al calor (a partir de los 42°C), 50% son sensibles al frío (a partir de los 8°C) (Cain *et al.*, 2001). Aunque también se han encontrado mecanonociceptores A δ que se activan por temperaturas arriba de los 45°C (Adriaensen *et al.*, 1980).

1.2.1.2 Fibras-C

Las fibras-C sin mielina también tienen extremos libres como en el caso de los A δ mecanonociceptores, los cuales dicho sea de paso son más abundantes que las fibras-A, en general. Las fibras-C son generalmente concebidas respondiendo únicamente a estímulos nocivos sin embargo se han encontrado un número de

fibras-C de bajo umbral. La mayoría de las fibras-C son principalmente polimodales, respondiendo a estímulos nocivos de todos los tipos (mecánico, calor, químico).

Algunos estudios en ratón han encontrado que estas fibras-C llegan a tener un mayor umbral mecánico que los A δ mecanonociceptores, mientras que otros estudios encontraron valores similares para ambos, la explicación para esto puede ser que los nervios registrados y la piel inervada difiere entre ambos estudios (Smith y Lewin, 2009).

El porcentaje de fibras-C activadas por calor nocivo varía entre estudios pero por lo general son cerca del 70% y el umbral de temperatura es de $\sim 40^{\circ}\text{C}$ (Cain *et al.*, 2001; Lewin y Moshourab, 2004).

En cuanto al porcentaje de fibras-C polimodales que son sensibles al frío nocivo existen más discrepancias. En un estudio la mayoría de las fibras sensibles al calor fueron descritas como sensibles al frío en un umbral $\sim 10^{\circ}\text{C}$ (Cain *et al.*, 2001). Sin embargo otros estudios no han encontrado tal proporción de fibras sensibles al frío nocivo (Lewin y Mendell, 1994; Kwan *et al.*, 2009).

Así mismo el porcentaje de fibras-C clasificadas como termosensibles varían entre distintos estudios, los umbrales de activación para el calor y frío nocivos son de $\sim 40^{\circ}\text{C}$ y $\sim 10^{\circ}\text{C}$ respectivamente lo que se correlaciona bien con las temperaturas que los humanos identifican como causantes del dolor provocado por calor y frío (Treede *et al.*, 1992; Davis y Pope, 2002).

No todas las fibras-C que codifican estímulos nocivos son polimodales, algunas son activadas únicamente por un tipo de estímulo nocivo, sin embargo son menores en número que las fibras-C polimodales (Koltzenburg *et al.*, 1997; Cain *et al.*, 2001; Lewin y Moshourab, 2004). El último tipo de fibras-C identificado tanto en ratones como en humanos, son las conocidas como “durmientes” o “silentes” debido a que no reaccionan a estímulos mecánicos o termales (Handwerker *et al.*, 1991; Schimidt *et al.*, 1995; Weidner *et al.*, 1999).

1.2.1.3 Sensibilización

Los nociceptores muestran una gran plasticidad. Como evidencia existe el fenómeno de sensibilización, este fenómeno se manifiesta en neuronas no-sensibles, las cuales súbitamente se vuelven sensibles a un estímulo o neuronas respondiendo a un rango de estimulación menor al normal y/o produciendo respuestas con una mayor magnitud. Lo que resulta en vías de señalización que son activadas extensiva y fuertemente, esta sensibilización puede suceder debido a una estimulación repetida.

La sensibilización suele ocurrir en respuesta a la inflamación actuando como un mecanismo de protección ya que esta sensibilidad incrementada provoca que la parte del cuerpo lastimada sea protegida previniendo un mayor daño (Lewin *et al.*, 2004, Woolf y Ma, 2007).

1.2.1.4 Receptores nociceptivos

Algunos ejemplos de receptores que se han asociado a la percepción del dolor son: Los canales Na_v 1.7, 1.8 y 1.9, los cuales son unos de los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) expresados en el sistema nervioso periférico, estos son complejos transmembranales que permiten un rápido flujo de sodio que subyace a la creciente despolarización generadora de los potenciales de acción. Estos canales juegan un rol crítico en la modulación de la excitabilidad de las neuronas sensitivas, ya que son altamente importantes para la generación y conducción de impulsos nerviosos (Rush *et al.*, 2007). Se tiene evidencia de que los canales de tipo Na_v son muy importantes en la señalización del dolor, siendo los subtipos Na_v 1.7, 1.8 y 1.9 los que se han encontrado más claramente relacionados con la percepción del dolor sobre todo del tipo inflamatorio y del tipo neuropático, siendo dentro de ellos, el subtipo Na_v 1.7 uno de los más importantes, no solo entre los canales de sodio sino desde una perspectiva más global, debido a que las más mínimas modificaciones en este subtipo pueden generar desde varios cuadros severos de dolor crónico hasta la pérdida total de la sensibilidad al

dolor. Los Na_v 1.7 se expresan principalmente en neuronas nociceptivas de pequeño diámetro (Schmalhofer *et al.*, 2008).

Los canales de calcio de tipo N (N-Type Ca^{2+}) son canales heteropoliméricos expresados únicamente por el sistema nervioso, principalmente localizados en la terminal pre-sináptica de neuronas aferentes que forman parte de la espina dorsal así como en el ganglio dorsal (Chen *et al.*, 2004) y contribuyen a la liberación de glutamato, ya que tras ser activados llevan a una mejor liberación del neurotransmisor (Rycroft *et al.*, 2007). Como el resto de los canales de calcio activados por voltaje (Ca_v), estos canales tienen la particularidad de que al ser activados por un potencial de acción generan la liberación de neurotransmisores (Bourinet *et al.*, 2005).

Los receptores opioides se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, así como en nervios autonómicos y sensibles periféricos. Actúan como transductores de señal y se encuentran anclados a la superficie de la membrana neuronal (Henriksen y Willoch, 2008). Los receptores analgésicos de tipo opioide son la piedra angular de la mayoría de los tratamientos analgésicos hasta el día de hoy. Estos actúan sobre los tres tipos de receptores pertenecientes a esta familia los cuales son los delta, mu y kappa. La mayoría de los tratamientos que utilizan alguna de estas vías tiene una serie de efectos secundarios (mu y kappa), salvo por los receptores delta que son los ligandos para las encefalinas (Villarejo *et al.*, 2001).

Los canales iónicos sensibles a ácido (ASIC) son expresados a través de todo el sistema nervioso central (CNS) así como en el periférico (PNS). En mamíferos se han encontrado 4 genes codificantes para canales ASIC, así como 2 “splicings” alternativos los cuales generan las variantes del tipo 1 y 2 (Donier *et al.*, 2008). Son canales catiónicos neuronales insensibles a voltaje y activados por protones extracelulares. En neuronas sensitivas los canales ASIC se encuentran relacionados con la percepción del dolor y la mecanorecepción, sin embargo su rol

no está del todo claro. Estos canales disparan potenciales de acción después de la acidificación del medio extracelular (Baron et al., 2008). Evidencia experimental ha mostrado que los canales ASIC tienen un rol en la mecanosensación, pero su función exacta en la transducción de señales no está muy clara (Price et al., 2000; Page et al., 2004; Jones et al., 2005).

Los receptores de potenciales transitorios vaniloides (TRPV) pertenecen a una familia de canales iónicos activados por ligandos y son permeables a Ca^{+2} y Na^{+} , los cuales se expresan por neuronas aferentes primarias. Cuando estos canales se activan, el canal se abre, lo cual permite el influjo de los iones de calcio y sodio, lo cual despolariza las fibras neuronales asociadas al dolor, iniciando los potenciales de acción en las terminaciones nerviosas y también modulan la liberación de neurotransmisores (Premkumar y Sikand, 2008), entre los ligandos que reconocen se encuentran moléculas lipofílicas. Sin embargo también pueden verse activados por protones extracelulares, así como estímulos físicos tales como el calor y cambios de presión osmótica (Kauer y Gibson, 2009). Uno de los canales de este tipo más estudiados es el TRPV1 el cual media la hiperalgesia inflamatoria térmica (Premkumar y Sikand, 2008).

Existen un sin número de nociceptores dependiendo del tipo de vía que utilizan para transmitir su señal.

2. Antecedentes

2.1 Analgésicos

Por definición general los analgésicos son medicamentos utilizados para tratar y aliviar el dolor (Buschmann et al., 2002). Al existir dolor como parte de una sintomatología, el tratamiento general refiere al uso de analgésicos tanto opioides como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), los cuales son administrados principalmente de manera oral o intradérmica.

Los medicamentos para el control del dolor se diseñaron para interrumpir las vías de transmisión en sitios específicos, usualmente bloqueando la transmisión de señales. Existen tres sitios principales donde se puede modificar la señal transmisora del dolor, esto puede ocurrir en la periferia, en la médula espinal y en el cerebro. La mayoría de los analgésicos tienen más de un solo sitio de acción. En la espina dorsal la información dolorosa se percibe por medio de células del ganglio dorsal de donde son enviados al cerebro. Las fibras que transmiten estas señales al cerebro tienen terminaciones en diferentes sitios, particularmente la formación reticular, el tálamo y la corteza cerebral. En la formación reticular el estímulo doloroso puede provocar cambios en el ritmo cardíaco, la presión sanguínea, la respiración y otras funciones. Mientras que en el tálamo y la corteza cerebral es donde se genera la apreciación consciente del dolor.

Los analgésicos opioides entre los cuales se cuentan algunos de los más potentes actualmente son utilizados para tratar dolores de moderados a severos, sin embargo provocan una serie de efectos secundarios, entre los que se encuentran la generación de resistencia y en ocasiones y como consecuencia de ello se puede generar una farmacodependencia en el paciente. Uno de los analgésicos opioides más conocido es la morfina, la cual aparte de acarrear consigo la fama de narcótico es el estándar contra el cual son comparados los nuevos analgésicos (Schmalhofer *et al.*, 2008).

Mientras que los NSAID tienen un grado variable de acción analgésica, anti-inflamatoria y anti-pirética, su acción analgésica se encuentra mediada principalmente por su capacidad de prevenir la producción de prostaglandinas, las cuales se encuentran implicadas en la producción de dolor inflamatorio y en la sensibilización de nociceptores. Los NSAID producen una serie de efectos secundarios como los daños gastrointestinales y la nefrotoxicidad, entre otros debido a que afectan distintos órganos (Buschmann *et al.*, 2002).

2.2 Funcionamiento general de los analgésicos en el sistema nervioso.

Los analgésicos tienen diferentes vías de acción, sin embargo los analgésicos a los cuales nos avocamos principalmente en este trabajo son aquellos que fundamentan su acción en el agonismo con ciertos receptores lo cual provoca una liberación de neurotransmisores que permiten la liberación de sustancias endógenas para combatir el dolor. Este es el caso de la mayoría de los analgésicos opiodes que actúan sobre los receptores opiodes de tipo mu y kappa (Buschmann *et al.*, 2002). Mientras que la otra vía es el antagonismo, en el cual el analgésico bloquea o reduce la transmisión de señales provenientes de las vías aferentes o cuando estas ya han alcanzado el ganglio dorsal, debilitando la transmisión de señales por parte de las neuronas de relevo presentes (Buschmann *et al.*, 2002).

2.3 Analgésicos provenientes de venenos animales.

En la actualidad el uso de analgésicos sigue siendo en su mayoría similar al mismo que existía hace ya varias décadas (Livett *et al.*, 2006). Sin embargo en la búsqueda de nuevos fármacos contra el dolor se ha llegado a encontrar moléculas analgésicas en venenos de animales, tal es el caso de los conos marinos (Livett *et al.*, 2006). Estos moluscos producen un veneno bastante complejo el cual puede llegar a contener hasta 200 componentes distintos biológicamente activos (Buschmann *et al.*, 2002).

La búsqueda de analgésicos en venenos de animales tiene como base conocimientos previos (mas no es la única razón), sobre la sintomatología provocada por éstos venenos en el ser humano, la cual podría estar relacionada con una actividad analgésica. Esta búsqueda ha dado como resultado el descubrimiento de péptidos con propiedades analgésicas en distintos organismos (Zhang *et al.*, 2007).

Uno de los mejores resultados obtenidos hasta el momento es el fármaco llamado Prialt, que es el nombre comercial de la ω -Conotoxina MVIIA (que pertenece a una familia de ω -Conopéptidos que tienen un tamaño de entre 24 – 29 aminoácidos).

La ω -Conotoxina MVIIA se obtuvo del veneno del caracol marino denominado *Conus magus* y su acción analgésica se basa en el bloqueo de canales de calcio del tipo N. Este péptido completó satisfactoriamente sus fases de pruebas clínicas y fue aprobado por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés) para su uso terapéutico. En la actualidad el Prialt es utilizado en el tratamiento del dolor crónico, teniendo varias ventajas sobre los tratamientos tradicionales, ya que no se ha observado que provoque algún efecto secundario (McGivern, 2007) siempre y cuando se administre vía epidural, lo cual es una limitante de este fármaco.

El descubrimiento de la actividad analgésica de la ω -Conotoxina MVIIA ha sido un aliciente en la investigación que se lleva a cabo en el estudio de venenos provenientes de animales ponzoñosos. Posteriormente se han encontrado péptidos con acción antinociceptiva en varias especies de animales venenosos, entre ellos alacranes, arañas, conos y etc. (Tabla 1) donde se describe su actividad.

Tabla 1. Ejemplos de péptidos con propiedades analgésicas provenientes de veneno y de secreciones de animales. Se puede observar la gran variedad de fuentes de péptidos con propiedades analgésicas (Rajendra *et al.*, 2004).

Fuente	Péptido	Actividad	Referencia
Veneno de alacrán	BmK ITAP	Toxina contra insectos y analgésicos.	Xiong <i>et al.</i> , 1999
	BmK dITAP3	Depresor neurotóxico, anti-hiperalgesia periférica, anti-nociceptivo.	Guan <i>et al.</i> , 2001 ^a
	Bmk AS	Antinociceptivo y anti-hiperalgesia periférica.	Chen y Ji, 2002
	BmK AS1	Antinociceptivo potente.	Tan <i>et al.</i> , 2001
	BmK AGAP	Péptido analgésico anti-tumoral	Liu <i>et al.</i> , 2003
Secreciones de piel de ranas	BmK Ang P1	Analgésico	Guan <i>et al.</i> , 2001b
	Epibatidina	Antinociceptivo vía receptor colinérgico	Spande <i>et al.</i> , 1992
	Dermorfina	Agonista de receptores μ opioides	Negri <i>et al.</i> , 1992
Veneno de arañas	ω -Agatoxina IVA	Antinociceptor de canales calcio del tipo P	Roerig y Howse., 1996
Veneno de caracoles marinos	Joro toxina	Inhibidor de receptores no-NMDA	Sorkin <i>et al.</i> , 2001
	Psalmotoxina 1	Bloqueador de canales activados por H ⁺ (ASIC)	Escoubas <i>et al.</i> , 2000
	ω -Conotoxina MVIIA	Inhibidor selectivo de canales de calcio de tipo N	Wang <i>et al.</i> , 1998
	ω -Conotoxina GVIA	Inhibidor selectivo de canales de calcio de tipo N	Plummer <i>et al.</i> , 1989
	Conantokina G	Inhibidor selectivo de N2RB	Malmberg <i>et al.</i> , 2003
	Conantokina T	Inhibidor de NR2A y NR2B	Klein <i>et al.</i> , 2001
Mr 10 ^a	Potente Antinociceptivo	McIntosh <i>et al.</i> , 2000	
	Contulakina G	Familia proteínica de neurotensinas	Craig <i>et al.</i> , 1999

2.4 Analgésicos en venenos de arañas

Los estudios llevados a cabo en el veneno de conos marinos han llevado a varios grupos científicos a buscar péptidos analgésicos en otros organismos, tales como en el veneno de las arañas y en el caso de este trabajo arañas de la familia *Theraphosidae* mejor conocidas como tarántulas.

El término tarántula no siempre es aplicado de la manera correcta y en ocasiones se utiliza para designar de manera indistinta a otras arañas con vellosidades y algunas arañas lobo de gran tamaño al sur de Europa (*Lycosa sp.*, *Lycosidae*). Sin embargo este término solo denota a las cerca de 860 especies que forman la familia *Theraphosidae*, representando estas un pequeño número del total de 37,972 especies de arañas reconocidas a la fecha (Platnick, 2010). Las tarántulas se encuentran distribuidas en una gran diversidad de ecosistemas lo cual correlaciona con la gran diversidad de moléculas en sus venenos. Al igual que otras arañas estas son depredadoras, las cuales además de depender de su fuerza, deben contar con venenos altamente eficientes que les permiten lidiar con sus presas entre las cuales se incluyen algunos vertebrados a los cuales paralizan, lo cual hace de estos venenos fuentes interesantes de moléculas para el estudio de receptores celulares y canales iónicos en vertebrados.

Los venenos de tarántula representan pues una gran fuente de nuevos ligandos para una variedad de receptores, ya que la diversidad de toxinas peptídicas en estos venenos ha sido vagamente explorada. De las *circa* de 860 especies de tarántulas conocidas solo se han hecho estudios con el veneno de 55 de estas especies (Escoubas y Rash, 2004).

Las primeras investigaciones con el veneno o toxinas de algún animal se llevaron a cabo como consecuencia de los efectos dañinos de estos sobre el ser humano pero teniendo como mira el desarrollo de tratamientos. Estos estudios demostraron entre otras cosas que las toxinas presentes en dichos venenos tienen una gran actividad biológica. Al ser aislados de sus venenos, estas moléculas

pueden revelar mucho acerca de los procesos fisiológicos con los cuales interfieren.

Los reportes de toxicidad del veneno de tarántula son aislados y en la mayoría de los casos son hechos anecdóticos, si bien existen reportes médicos sobre mordeduras de terafósidos, la mayoría de ellos se remiten al hecho de que producen dolor de mediano a severo cerca de la zona de la mordida, escozor, edemas, eritemas, dolor articular, entre otros (Chan *et al.*, 1975; Schenbacher *et al.*, 1973). Los únicos casos donde se han presentado problemas más severos es en el caso de algunas especies europeas, del subcontinente indio, entre otras, principalmente especies con costumbres arborícolas, la sintomatología puede llegar a ser tan grave como para provocar un arresto cardíaco. En el caso de Australia se han reportado 7 mordeduras fatales en perros (Isbister *et al.*, 2003).

En estudios de toxicidad en ratones se ha observado que los efectos letales se observan mejor tras una inoculación ICV (intracerebroventricular), que utilizando cualquier otra vía de entrada. En una serie de pruebas realizadas con el veneno de 55 especies de tarántulas distintas se observó que todos los venenos de especies asiáticas y africanas (a excepción de una) inducen la muerte en menos de 20 minutos de un ratón de 20 g con 0.1 μ L de veneno crudo vía ICV. Llegándose en algunos casos hasta el extremo de que el ratón muriese a los pocos segundos de inyectado el veneno. Los principales géneros con estas características son *Helenoscodra*, *Stromatopelma* y *Poecilotheria*. La acción tan rápida de algunos de estos venenos nos hace pensar en una posibilidad de evolución convergente, debido a la presencia de péptidos con características similares en otros venenos de rápida acción como el de los conos marinos (Escoubas y Rash, 2004).

La purificación de estos venenos de manera eficiente no se logró sino hasta el advenimiento de técnicas de separación como el HPLC, espectrometría de masas y secuenciación automatizada de Edman. Se han llevado a cabo varios estudios con el veneno de distintas especies de araña y hasta el momento se han encontrado varias moléculas con potencial analgésico (Tabla 2), que son:

La psalmotoxina-1 (PcTx1), la cual es un péptido extraído de la tarántula sudamericana *Psalmopeus cambridgei* que tiene un gran potencial analgésico en contra de dolor termal, mecánico, químico, inflamatorio y neuropático en roedores. Su acción radica en bloquear canales iónicos ácido-sensibles 1a (ASIC1a), este bloqueo resulta en la activación de un vía endógena de encefalinas (Mazzuca *et al.*, 2007).

Pro-TXII es un péptido bloqueador de 30 aminoácidos, que actúa de manera selectiva en canales activados por sodio Na_v 1.7, que es un contribuidor esencial en la transmisión del dolor, este péptido es altamente selectivo por este subtipo de canales y se encuentra presente en el veneno de la tarántula *Thrixopelma prurirent* (Schmalhofer *et al.*, 2008).

Huwentoxina-1 es un bloqueador de canales de calcio del tipo N proveniente del veneno de la tarántula *Ornithoctonus huwena* el cual durante sus estudios se comparó con la Conotoxina- MVIIA y la morfina en ensayos de formalina en ratas consientes dando muy buenos resultados (Chen *et al.*, 2005).

La Agatoxina IVA es un péptido que actúa como bloqueador de canales de calcio de tipo P y se encontró en el veneno de la araña de embudo americana *Agelenopsis aperta*. Se ha observado que la Agatoxina IVA tiene un efecto sinérgico con la morfina y clonidina (Roerig y Howse, 1996).

El péptido GsMTx4 proviene del veneno de la tarántula *Grammostela spatulata* que aunque no se sabe aun cual es su mecanismo de antinocicepción, parece aliviar la hiperalgesia mecánica inducida por inflamación bloqueando canales mecanosensitivos (Park *et al.*, 2008).

Phα1β es un péptido que se encuentra en el veneno de la araña *Phoneutria nigriventer*, el cual tiene un gran potencial analgésico como bloqueador de canales de calcio pendientes de voltaje (Ca_v). Después de varios estudios se ha encontrado que su acción analgésica está ligada a la liberación provocada por Ca²⁺ del neurotransmisor pro-nociceptivo glutamato de los sinaptosomas de la

médula espinal de la rata, disminuyendo así su cantidad en el fluido cerebro-espinal (Souza *et al.*, 2008)

Tabla 2. Comparación estructural del Prialt o ω -conotoxina MVIIA con péptidos con acción analgésica provenientes del veneno de arañas. Conservación de la cisteínas (C) presentes en la secuencia, marcadas con asteriscos. Estas forman entre si los puentes disulfuro del motivo estructural ICK.

Péptido	Secuencia	Referencia
Prialt (Ca _v Tipo N)	---CKGK-GAKC SRLMYDCC---TGS CRS GK-----C-----	Wang <i>et al.</i> , 1998
HwTx-1 (Ca _v Tipo N)	--ACKGV-FDACC TPGKNECC---PNRVC SDKHK---WCKWKL-----	Chen <i>et al.</i> , 2005
GsMTx4 (N/A)	--G CLEF-WWKCNPNDDKCCR---PKLKC SKLFK---LCNFSF-----	Park <i>et al.</i> , 2008
ω -Aga-IVA (Ca _v Tipo P)	KKKCI AKDYGRCKWGGTFC CRG-RGCI CSIMGT----NCECKPRLIMEGLGLA-----	Roerig y Howse <i>et al.</i> , 1996
PcTX1 (ASIC1a)	-EDCIPK-WKGC VNRHGDCC---EGLCCWKRRRS-FEVCVPKTPKT-----	Mazzuca <i>et al.</i> , 2007
Pro TX-II (Nav 1.7)	--YCQKMMWT-CD SER-KCC---EGMVC RL-----WCKKKLW-----	Schmalhofer <i>et al.</i> , 2008
Ph α 1 β (Ca _v)	--ACIPR-GEICTDDC-ECCGCDNQCYCPGSSLGIFKCS CAHANKYFCNRKKEKCKKA	Souza <i>et al.</i> , 2008
	* * ** * *	

Una característica que comparten todos estos péptidos con la Conotoxina-MVIIA, analgésico peptídico del veneno de *Conus magus*, es un motivo estructural llamado “nudo inhibidor de cisteínas” (ICK), este motivo se encuentra altamente distribuido en la mayoría de los péptidos que se han caracterizado de venenos de arañas y conos marinos (Zhu *et al.*, 2003). Estos y otros descubrimientos han puesto en la mira a varias especies de arácnidos y otros animales ponzoñosos en la búsqueda de analgésicos peptídicos.

2.5 Péptidos con el motivo estructural ICK y DDH

Los péptidos con motivos estructurales ICK (nudo inhibidor de cisteínas) y DDH (rizo guiado por disulfuros) se encuentran principalmente en el veneno de las tarántulas, aunque también se encuentran presentes en venenos de algunos otros arácnidos. Son unos los dos principales motivos estructurales presentes en los péptidos que conforman el veneno de las tarántulas. Siendo DDH el otro motivo estructural presente en los péptidos presentes en los venenos de tarántula. De

manera estricta estos péptidos son todos DDH ya que el motivo estructural ICK parece ser un plegamiento ligeramente modificado proveniente de un motivo estructural más simple y antiguo como lo es el DDH. La diferencia entre estos dos tipos de motivos es que en el motivo DDH solo se forman dos puentes disulfuros obligatorios, mientras que en los péptidos con motivo estructural ICK, existe un tercer puente disulfuro obligatorio (Wang *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2001) (Fig. 5). Por lo tanto se puede decir que todos los péptidos ICK son también péptidos DDH, pero no todos los péptidos DDH son péptidos ICK.

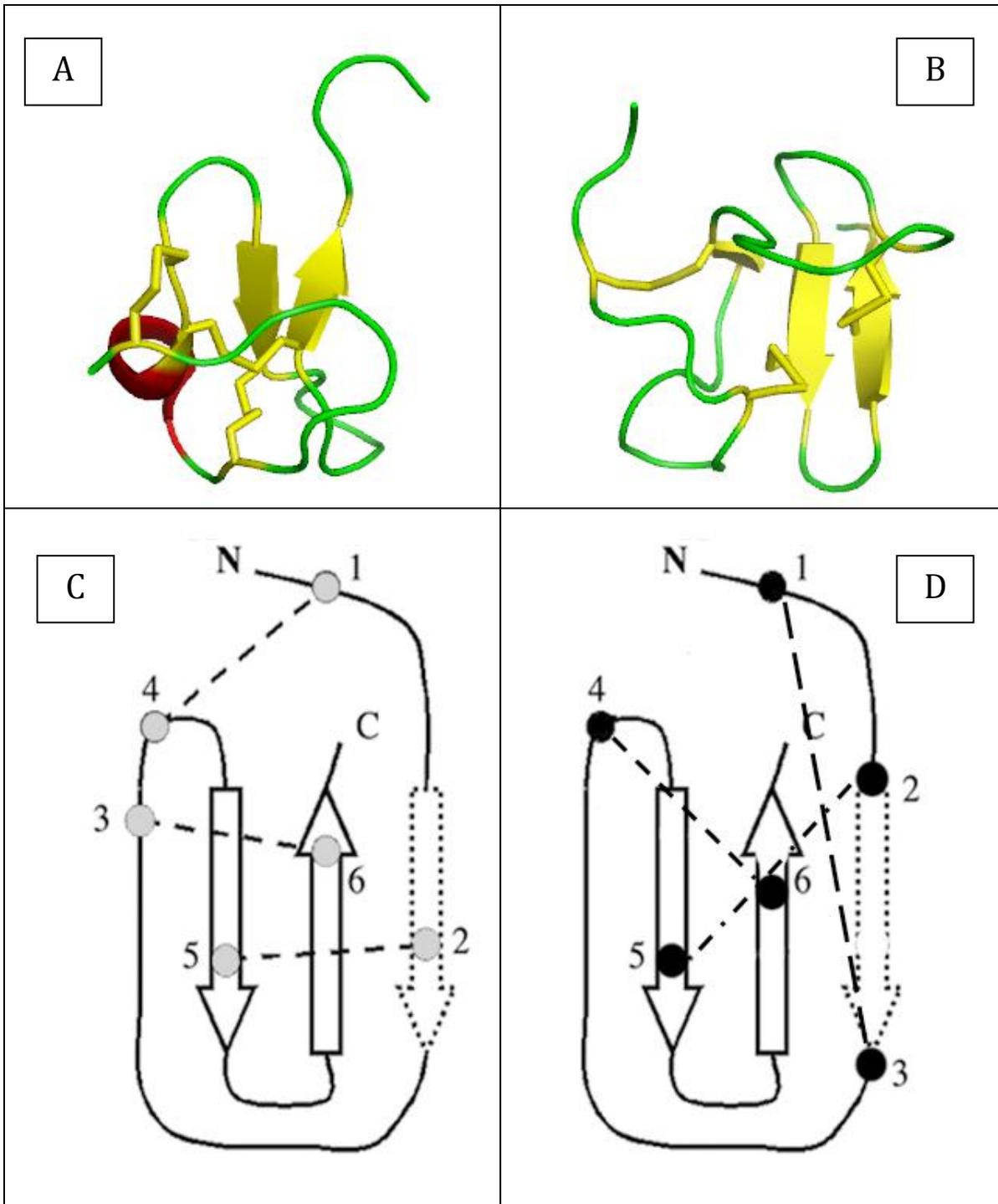


Figura 3. Estructura tridimensional de un péptido DDH y péptido ICK. . A. Toxina JzTx IX la cual es un péptido del tipo ICK (PDB: 2A2V). B. Toxina Ba1 la cual es un péptido del tipo DDH (PDB: 2KGH). Representaciones bidimensionales de estructuras ICK (C) y DDH (D). Imágenes generadas con PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.).

El motivo estructural DDH se encuentra presente en una amplia variedad de eucariontes. Lo cual sugiere que este tipo de estructuras basadas en un alto

número de puentes disulfuro evolucionó en un ancestro eucarionte tiempo antes de la divergencia de estos a plantas, animales y hongos (Wang *et al.*, 2000). Entre sus características estructurales principales se encuentra la presencia de una Gly o Pro presente en el centro del “loop” 3, el cual es seguido por un residuo de naturaleza hidrofóbica lo cual permite la estabilización del giro presente en esa área.

El motivo estructural ICK se encuentra en péptidos con distintas secuencias y funciones. Se encuentran distribuidos a través de distintos *phyla*. Estos péptidos se encuentran de manera preferencial en venenos de conos marinos y de arañas. La relación evolutiva que guardan entre así estos péptidos aun no está dilucidada. Los péptidos ICK que se encuentran en animales comparten características en común como son; 1) Una organización conservada del precursor; 2) Sus precursores se encuentran compuestos de tres segmentos bien definidos que incluyen a un péptido señal, un propéptido y el péptido maduro (Fig. 6); 3) Los genes codificantes contienen dos intrones intercalados entre las regiones de los tres dominios ya mencionados (Fig. 6); y 4) Un plegamiento tridimensional conservado. La superposición de estructuras de estos péptidos *in silico* muestra una gran similitud estructural sobre en zonas altamente conservadas del motivo.

Todas estas características diferencian los péptidos con motivo ICK provenientes de animales de aquellos péptidos ICK encontrados en otros *phyla* e incluso en virus en donde la organización de los genes y un procesamiento distinto del precursor hacen claro que no todos los péptidos con el motivo ICK pueden tener un origen común, por lo cual se sugiere que las estructuras similares encontradas en péptidos con motivos ICK sea el resultado de una evolución convergente (Zhu, 2003).

Una vez transcrito un péptido ICK se pliega y adopta una estructura tridimensional característica que es la que le da su nombre en la cual se puede observar la formación de una especie de nudo gracias a los puentes disulfuro que se forman.

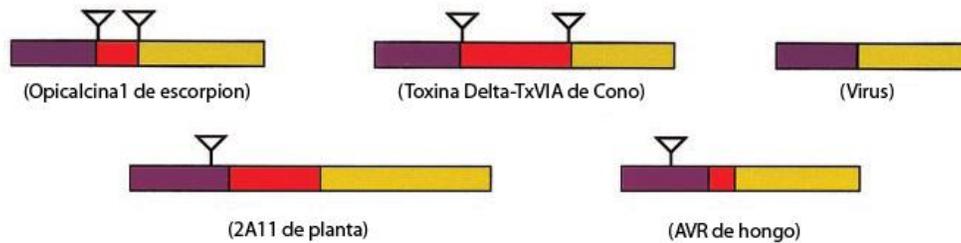


Figura 4. Estructura conservada de genes ICK. Formados por un péptido señal (morado), un propéptido (rojo) y una región que es el péptido maduro (amarillo), se representan por cada uno de los colores. Los intrones están representados por triángulos.

2.6 Estudios realizados con los venenos utilizados en el presente trabajo

La cantidad de estudios publicados en relación con las tres especies de arañas de interés para este proyecto es muy baja; por ejemplo, la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) arroja seis resultados de la búsqueda utilizando los nombres de las tres especies, siendo *Aphonopelma seemanni* la única especie que arroja resultados positivos. Solo dos estudios han tratado acerca de su veneno, uno de ellos es un análisis proteómico comparativo del veneno de *Aphonopelma seemanni* y otras especies de arañas nativas de Costa Rica (Herrero y Odell, 1988). Mientras que el segundo estudio lleva a cabo un análisis de las propiedades mionecróticas del veneno total en ratones (Herrero y Gutiérrez, 1984).

3. Hipótesis

El veneno de tarántulas contiene una gran diversidad de moléculas modificadoras y bloqueadoras de corrientes iónicas, de las cuales algunas podrían tener actividad analgésica.

4. Justificación

Se ha demostrado que péptidos provenientes del veneno de caracoles marinos, como el péptido omega-Conotoxina-MVIIA de *Conus magus*, tienen propiedades analgésicas (Wang et al., 1998). El péptido MVIIA bajo el nombre comercial de PRIALT (Ziconotide) y aprobado por la FDA, se usa actualmente para aliviar el dolor crónico. Este péptido de 25 aminoácidos y 3 puentes disulfuro pertenece a la familia estructural ICK (inhibitor cysteine knot) a la cual también pertenecen varias moléculas peptídicas encontradas en los venenos de arañas, por tanto es factible encontrar péptidos con efecto analgésico en estos venenos. Como apoyo a este proyecto se cuenta con una colección de venenos de arañas procedente del Aracnario del IBt. La información generada en el presente trabajo también representa un gran avance en el conocimiento que tenemos acerca de estas arañas y los efectos biológicos que puede producir los distintos componentes presentes en sus venenos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General:

Determinar si existen fracciones peptídicas provenientes del veneno de arañas con actividad analgésica mediante su comparación contra el desempeño de otros analgésicos de uso nosocomial.

5.2 Objetivos Particulares:

1. Purificación de las fracciones peptídicas de 3 venenos de arañas:
 - *Brachypelma verdezy*
 - *Aphonopelma seemanni*
 - *Cyclosternum fasciatum*
2. Ensayos biológicos con las fracciones obtenidas (“Hot-Plate”).
3. Re-purificación por HPLC de fracciones con actividad analgésica.

4. Ensayos biológicos (“Hot-Plate” y Formalina) de las fracciones re-purificadas.
5. Llevar a cabo la caracterización química de los péptidos con acción analgésica obtenidos.
6. Realizar una caracterización por medio de biología molecular, llevando a cabo una biblioteca de cDNA, a partir de RNA mensajero de las glándulas venenosas y obtener así la secuencia del mensajero correspondiente al péptido secuenciado.

6. Metodología

6.1. Estrategia experimental

Una representación general de los pasos que se siguieron durante la el desarrollo de este trabajo se muestra en la figura 7. Estos incluyen; A) La extracción del veneno, B) La separación por métodos cromatográficos (HPLC), C) Liofilización y cuantificación de las fracciones proteicas, D) Los ensayos biológicos (“Hot plate” y formalina) y E) La caracterización de las fracciones obtenidas.

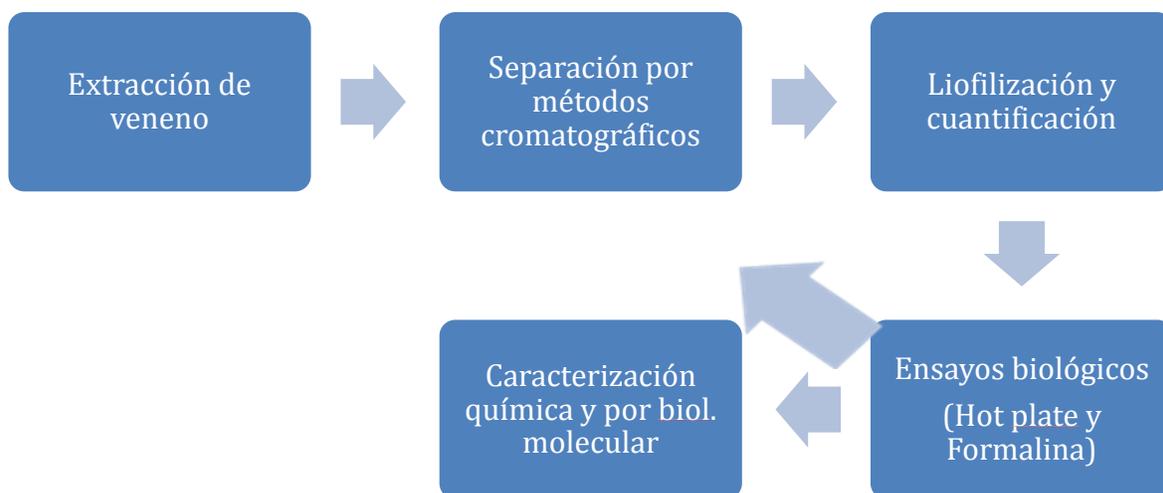


Figura 5. Estrategia experimental. Generalización de la metodología experimental en este proyecto.

6.2. Material biológico.

Las arañas a utilizar en este proyecto pertenecen a tres géneros distintos y son las siguientes; *Aphonopelma seemanni*, *Brachypelma verdezy* y *Cyclosternum fasciatum* (Figura 6).

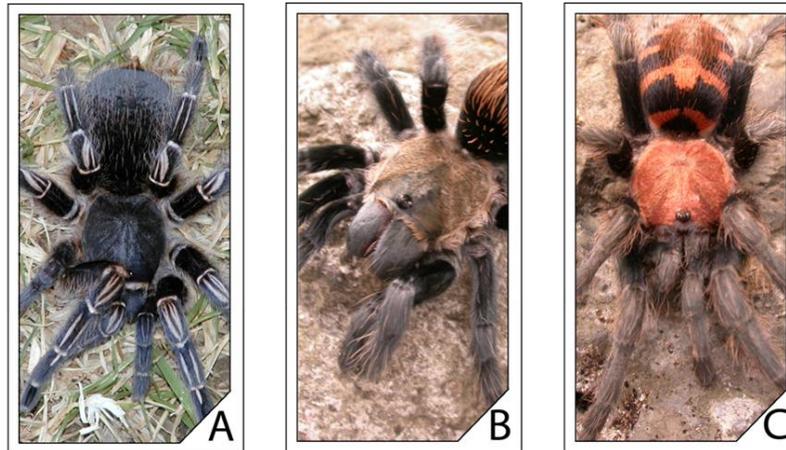


Figura 6. Especies de arañas usadas en el proyecto. Imágenes de individuos de las tres especies utilizadas en este proyecto. **A)** *Aphonopelma seemanni*. **B)** *Brachypelma verdezy*. **C)** *Cyclosternum fasciatum* (Imágenes proporcionadas por la M. en C. Herlinda Clement).

Estas tarántulas tienen una distribución localizada hacia el sur de la República Mexicana, extendiéndose por Centroamérica hasta llegar a Costa Rica, que es de donde se tienen la mayoría de los primeros reportes de clasificación taxonómica (Fig. 7) (Platnick, 2010).

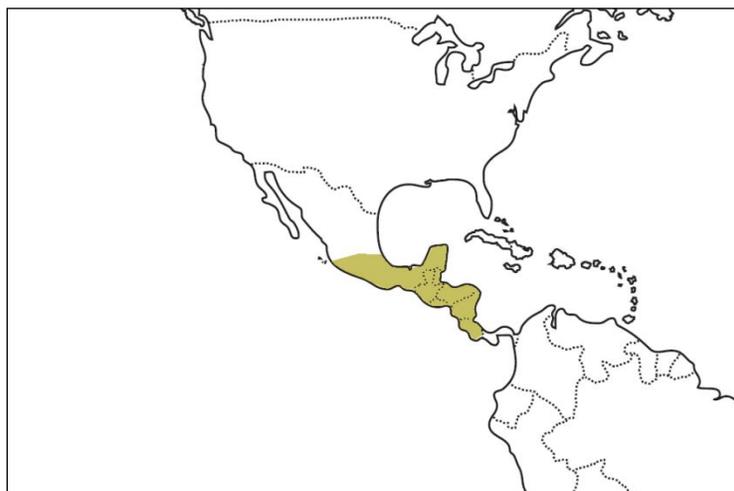


Figura 7. Distribución de las especies de arañas usadas en el proyecto. Las tres especies se encuentran ampliamente distribuidas en la zona marcada en color mostaza en la imagen.

Abarcando territorio desde el centro-sur de la Republica Mexicana, Guatemala, Belice, Honduras, Nicaragua, El Salvador y Costa Rica (Platnick, 2010).

6.3. Extracción de veneno.

La figura 8 muestra fotográficamente los pasos seguidos durante la extracción del veneno; A) Se adormece a la araña con CO₂. B) Se coloca en una esponja y se inmoviliza con una tarjeta de cartón sobre la zona anterior del tórax y abdomen, siendo afianzada con ligas para poder inmovilizarla suavemente. C) Una vez inmovilizada se le coloca una cánula de plástico en los colmillos y después se depositan unas cuantas gotas de una solución electrolítica en la zona de los quelíceros con el fin de optimizar el estímulo eléctrico durante la ordeña. D) Posteriormente se estimula eléctricamente la zona de los quelíceros para provocar una contracción de las glándulas venenosas provocando la liberación de gotas de veneno hacia la cánula. E) Una vez en la cánula, el veneno se succiona utilizando una micropipeta (o una pipeta Pasteur) para posteriormente guardarlo en un tubo eppendorf de 1.5 mL, el cual se conserva a una temperatura de - 20°C. Posteriormente el veneno es liofilizado y después almacenado nuevamente a - 20°C.

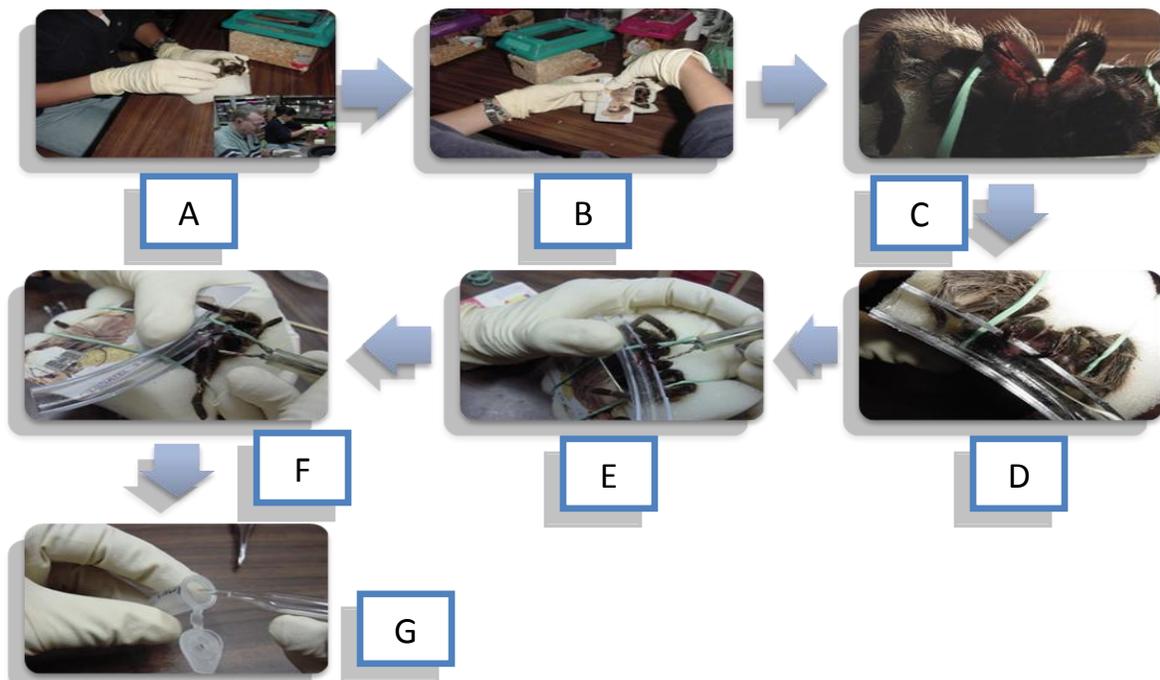


Fig. 8. Extracción del veneno. A) Sedación de la tarántula, B) Posicionamiento de la tarántula en la esponja, C) Inmovilización de la araña, D) Colocación de la cánula, E) Puesta de las gotas de

solución electrolítica sobre los quelíceros, **F**) Estimulación eléctrica y obtención del veneno en la cánula, **G**) Recolección y conservación de la muestra (Procedimiento e imágenes proporcionadas por la M. en C. Herlinda Clement).

6.4. Separación por métodos cromatográficos

La purificación de los venenos se realizó por HPLC fase reversa (rpHPLC) en un equipo de HPLC (Varian ProStar 325), usando como solvente A, 0.1% TFA (Ácido trifluoroacético) en H₂O, y como solvente B, 0.1% TFA en acetonitrilo. Los péptidos obtenidos se separaron con una columna semipreparativa C₁₈ (25 mm x 10 mm) realizando un gradiente de 0% a 60% de solvente B en un lapso de 60 min (1%/min) y con un flujo de 2 mL/min. Para cada evento cromatográfico se utilizaron 10 mg (peso seco) de veneno, los cuales fueron solubilizados en 250 µL H₂O con 0.1% TFA y centrifugados para eliminar partículas insolubles, antes de ser inyectados a la columna de separación (Corzo *et al.*, 2009).

6.4.1 Repurificación de péptidos

Las fracciones peptídicas obtenidas del primer paso cromatográfico y que pasaron por la prueba de tamizaje, se purificaron en una segunda ocasión por HPLC en columna analítica C₁₈ de fase reversa (4.6 x 250 mm, Vydac), con gradiente de solución B de 10-60% en 50 min con un flujo de 1 mL/min. El solvente A consistió de 0.1% TFA en H₂O, y el solvente B consistió de 0.1% TFA en acetonitrilo (Corzo *et al.*, 2009).

6.4.2 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se llevó a cabo resuspendiendo las muestras secas obtenidas de cada fracción de veneno en 200 µL de agua tetradesilada, tomando de esta muestra 100 µL y midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf, Biophotometer 6131). La concentración obtenida se calculó tomando en cuenta que una unidad de absorbancia es igual a 1 mg/mL de proteína.

6.5. Métodos biológicos

6.5.1. “Hot-Plate” método estándar

El ensayo de “Hot-Plate” en este trabajo fue con ratones machos cepa CD1 con un peso aproximado de 20 gramos. Para llevar a cabo la prueba de “Hot-Plate”, primero se llevaron a los ratones al área donde realizó la prueba treinta minutos antes de empezar. De esta manera los ratones se aclimataron al entorno, la hora de la inyección se mantuvo constante, en un periodo de las 19:00 y 20:00 horas (Espejo, 1993).

Posteriormente se inyectó el fármaco o fracción de veneno utilizado en el ratón por vía intraperitoneal, dejando pasar un tiempo de 30 ó 45 minutos después de la inyección antes de medir su acción analgésica.

Una vez transcurridos los 30 o 45 minutos, los ratones, individualmente, se colocaron sobre el aparato llamado “Hot-Plate” (Panlab s.l., LE7406), el cual se compone de una placa metálica (diámetro de 25.4 cm) con una temperatura de 55°C. El ratón se coloca sobre la placa metálica y se mide su tiempo de latencia, el cual es el tiempo que transcurre hasta observar una respuesta al dolor a partir de un estímulo térmico, dicha respuesta puede ser la lamida de las extremidades (anteriores o posteriores) o el salto al estímulo de calor (cualquiera que ocurriese primero). Cuando un ratón no generó una respuesta en un lapso mayor a 30 segundos, esto es, no mostró respuesta al dolor, se dió por terminada la prueba y el tiempo de latencia que se reportó fue de 30 s. Cada ratón se utilizó una sola ocasión y se realizaron al menos tres pruebas independientes. Posteriormente se realizó un análisis estadístico por medio del análisis de diferencias significativas (Malmberg, 1999).

6.5.2. Test de Formalina

Esta prueba se usa principalmente en casos de dolor persistente con daño a tejido, para lo cual se hace uso de la formalina (en una solución diluída de formaldehído), que tras ser inyectada en una de las extremidades traseras del animal modelo produce un dolor continuo. El dolor provocado por la formalina se divide en 2 fases temporales, las cuales pueden variar entre los modelos usados (ratones o ratas) y entre individuos. La fase aguda se presenta en un periodo de 5

a 20 minutos de haber sido inyectada la formalina y la fase crónica en un periodo de 20 a 40 minutos. En este ensayo la medida de la acción de una sustancia analgésica se basa en las muestras o señales de dolor que muestre el individuo durante estos períodos de tiempo. El análisis estadístico de los datos obtenidos se lleva a cabo por medio de diferencias significativas (Abbott *et al.*, 1999). El ensayo de formalina en este trabajo fue con ratones machos CD1 con un peso aproximado de 20 gramos. Inicialmente se marcaron los animales en la extremidad a inyectar (trasera derecha) y se mantuvieron en el contenedor por 30 minutos para que los animales se aclimataran a su entorno. Pasados los 30 minutos las soluciones de analgésicos control ó péptidos se inyectaron intraperitonealmente 15 minutos antes de inyectar la formalina en la extremidad marcada. La solución de formalina se inyecta de manera subcutánea en la mitad de la cara plantar (esto es para poder observar cuando se lame la pata). La observación de la primera fase se realizó del minuto 0 al 20 y la observación de la segunda fase fue entre los minutos 20 y 40. La respuesta al estímulo son las veces en que el ratón se lame la pata inyectada durante un minuto, cada cinco minutos hasta el término de la prueba.

6.6. Caracterización química de fracciones puras

Una vez purificados los péptidos con aparente actividad analgésica se determinaron sus masas moleculares por medio de un espectrómetro de masas. Posteriormente se determinó parcialmente la estructura primaria de los péptidos a partir del N-terminal por medio de la degradación de Edman (Beckman, LF3000 Protein sequencer).

Una vez conocida la secuencia parcial de aminoácidos de algún péptido se buscó la secuencia más probable de su gen en una biblioteca de cDNA, la cual fue previamente obtenida de RNA mensajeros presentes en las glándulas venenosas de las arañas bajo estudio en este proyecto.

6.7. Construcción de bibliotecas de cDNA

Se llevo a cabo la construcción de bibliotecas de cDNA a partir de glándulas de veneno de individuos de las tres especies. Se tomó como base el protocolo “Creator smart cDNA library construction kit user manual” (Clontech Laboratories Inc., 2009).

Para llevar a cabo el proceso primero se realizó una extracción de RNA procedente de las glándulas por medio de un kit de extracción de RNA. Con el RNA extraído se sintetizó la primera cadena de cDNA con el uso de una retro transcriptasa (Anexo 7.1). Teniendo el templado de cDNA se procedió a la amplificación del cDNA por medio de LD PCR (Reacción en cadena de polimerasa de larga distancia), tras la cual se observó la integridad y tamaño del material genético obtenido por medio de gel de agarosa 1% (Anexo 7.2). El material genético se purificó por medio de una columna de afinidad para separar los fragmentos de cDNA del resto de la muestra (Anexo 7.3).

El material obtenido se digirió con la enzima Sfil (Anexo 7.4), posteriormente, los fragmentos fueron purificados por medio de una columna de exclusión molecular (Anexo 7.5) y se ligaron con el vector pDNR-Lib (Anexo 7.6). Tras la ligación con el vector se transformaron por medio de electroporación en células de *E. coli* de las cepas DH5 α y XL1-Blue (Anexo 7.7). Las células transformadas se cultivaron en placas con medio LB (Luria-broth) con ampicilina a diferentes diluciones. A partir del número de colonias obtenidas se determinó la eficiencia de las bibliotecas. Una vez hechas las cuantificaciones se seleccionaron colonias al azar, con las cuales se realizaron reacciones de PCR de colonia para observar el tamaño del fragmento presente en dicho plásmido (Anexo 7.8). Las colonias seleccionadas se crecieron individualmente para extraer plásmido y mandar a la unidad de secuenciación (Anexo 7.8).

6.8. Obtención de secuencias por medio de RACE-PCR.

El procedimiento de Race-PCR inicia con una retrotranscripción del material genético de la araña utilizando un oligonucleótido adaptador (los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuenciación parcial del N-terminal por Edman), el cual permite enriquecer las fracciones con el material genético deseado. Posteriormente se usaron dos reacciones de PCR con oligonucleótidos adaptadores y oligonucleótidos dirigidos a la secuencia blanco, lo cual permite un enriquecimiento del material genético deseado. Una vez terminadas estas reacciones se realizó un gel de agarosa 1% para observar el material genético y separar y purificar el material deseado, el cual posteriormente fue ligado en el vector TOPO 2.1 para su posterior secuenciación (Los detalles del procedimiento se encuentran en el Anexo 7).

6.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en la prueba de “Hot Plate” y formalina se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 4. Los resultados se expresan con promedios y errores estándar. Los datos se analizaron estadísticamente usando un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, así como pruebas de “t” individuales para determinar si alguno de los grupos (n=3) fue significativamente distinto de aquellos correspondientes a los controles ($p < 0.05$).

7. Resultados

7.1 Cromatografía semipreparativa de los venenos en estudio.

Las separaciones cromatográficas de los venenos de *A. seemanni* (Anexo 1, figuras A y B), *B. verdezy* (Anexo 1, figuras C y D) y *C. fasciatum* (Anexo 1, figuras E y F) generaron 22, 30 y 18 fracciones, respectivamente, que posteriormente se secaron en un concentrador al vacío (Savant SpeedVac SVC 200H). Las fracciones se resuspendieron en volúmenes acuosos conocidos y fueron

cuantificadas espectrofotométricamente para poder llevar a cabo los ensayos biológicos.

Las fracciones de los tres venenos utilizados en este proyecto una vez purificados por HPLC se utilizaron para realizarse el ensayo de “Hot Plate” y seleccionar aquellas fracciones con actividad analgésica.

7.2 Pruebas de “Hot-Plate”

A continuación se presentan los resultados del tamizaje, obtenidos en la pruebas de “Hot-Plate” con cada uno de los tres venenos. Cabe mencionar que la concentración utilizada durante estas pruebas con las fracciones obtenidas, no fue equimolar, sino que se llevó a cabo una normalización con base en la cantidad de proteína total, que en este caso fue de 30 miligramos por cada veneno. Cada fracción fue diluída a 200 μL , y entonces 20 μL de este volumen fue utilizado para cada una de las pruebas biológicas por “Hot-Plate”. La cantidad restante fue almacenada para posteriormente, sí, de estas resultaba una fracción con actividad analgésica, repurificarla y confirmar la acción analgésica de las subfracciones puras. También parte del material almacenado sirvió para, determinar sus propiedades químicas como masa molecular y secuencia primaria. La concentración de proteína tanto de las fracciones como de los péptidos puros fue calculada en base a su absorbancia a 280 nm como ya fue anteriormente mencionado.

Los resultados con cada una de las fracciones de los venenos analizados muestran el cálculo de la cantidad total inoculada en cada caso (ver Tablas 3, 4 y 5). Las fracciones analgésicas fueron seleccionadas en base a sus tiempos de latencia, se seleccionaron aquellas que tuvieron ambos tiempos de latencia significativos ($p < 0.05$), a los 30 y 45 minutos con respecto a su control negativo.

7.2.1 Pruebas con el veneno de *Aphonopelma seemanni*

Para la prueba de “Hot-Plate” se analizaron las 22 fracciones obtenidas por cromatografía, de las cuales se observó que la fracción número 48.5 (Tabla 3) tuvo los mejores tiempos de latencia al compararlos con los tiempos de latencia obtenidos con los analgésicos control y con PBS (Figura 9).

Tabla 3. Dosis y efecto analgésico de fracciones proteicas del veneno de *Aphonopelma seemanni* inyectadas a ratones. Los ratones tuvieron un peso promedio de 20 gramos. Se inyectaron tres (n=3) ratones CD1 machos y se observó su efecto a los 30 y 45 minutos.

Fracción	Dosis (µg/g)	Efecto analgésico aparente		Fracción	Dosis (µg/g)	Efecto analgésico aparente	
		30 Minutos	45 Minutos			30 Minutos	45 Minutos
11	0.5	No	No	42	0.3	No	No
14	0.3	No	No	44A	1.4	No	No
19	9.1	No	No	44B	10.1	No	No
23	1.8	No	No	47	4.7	No	No
24	1.4	No	No	48.5	3.4	Si	Si
28	13.2	No	No	51	5.2	No	No
30	0.8	No	No	52	0.4	No	No
31	1.0	No	No	54	6.6	No	No
32	1.1	No	No	57	0.5	No	No
33	0.8	No	No	60	0.1	No	No
41	0.2	No	No	62	0.15	No	No

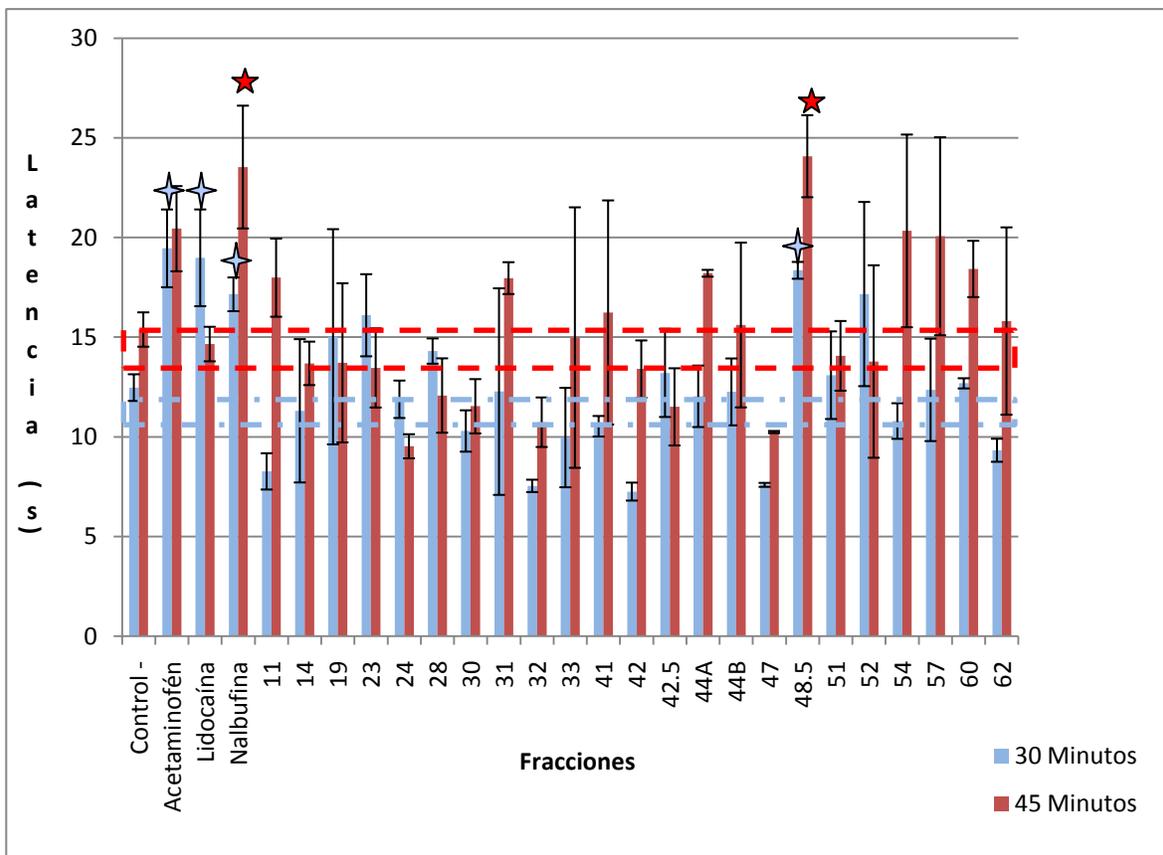


Figura 9. Tiempos de latencia en la prueba de Hot-plate con las fracciones del veneno de *Aphonopelma seemanni*. Resultados obtenidos en la prueba de Hot-plate (n=3), llevando a cabo cada experimento de manera independiente con ratones machos de la cepa CD1, los resultados son expresados en un tiempo de latencia (s) con su respectivo error estándar, para cada una de las fracciones purificadas a partir del veneno de *A. seemanni*. Los rectángulos indican el tiempo de latencia del control negativo, con una confianza del 95%. Las estrellas indican un diferencia significativa entre el control negativo y el dato de la muestra utilizada. Dichos datos fueron obtenidos por medio de una prueba de ANOVA, seguida de un análisis comparativo de Tukey y un análisis individual utilizando pruebas de t de student. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 4. Las concentraciones de los controles positivos son: acetaminofén (500 µg/g), lidocaína (30 µg/g) y nalbufina (300 µg/g).

7.2.2 Pruebas con el veneno de *Brachypelma verdezy*

Para el caso del veneno de la tarántula *Brachypelma verdezy* se analizaron las 30 fracciones purificadas por medio de HPLC de fase reversa, de las cuales se encontraron tres fracciones con una posible actividad analgésica siguiendo el criterio antes mencionado. Las fracciones corresponden a los tiempos de retención de 47, 48.5 y 55 minutos (Tabla 4). Los tiempos de latencia de estos péptidos se muestran en la figura 10 donde se comparan a todas las fracciones que pasaron por esta etapa de tamizaje y a los controles tanto positivos como negativos. Cabe

mencionar que la fracción 47 mostró una actividad tóxica y letal. Todos los ratones inyectados con la fracción completa (4 ratones) perecieron en un lapso de una hora después de la inyección, estas muertes parecen ser causadas por una deficiencia respiratoria.

Tabla 4. Dosis y efecto analgésico de fracciones proteicas del veneno de *Brachypelma verdezy* inyectadas a ratones. Los ratones tuvieron un peso promedio de 20 gramos. Se inyectaron tres (n=3) ratones CD1 machos y se observó su efecto a los 30 y 45 minutos.

Fracción	Dosis (µg/g)	Efecto analgésico aparente		Fracción	Dosis (µg/g)	Efecto analgésico aparente	
		30 Minutos	45 Minutos			30 Minutos	45 Minutos
7.5	0.02	No	No	42.8	1.1	No	No
11	3.6	No	No	43	1.25	No	No
13	0.1	No	No	46	1.5	No	No
13.5	2.6	No	No	47	7.4	Si	Si
16	6.4	No	No	48.5	6.2	Si	Si
18	21.4	No	No	50	0.2	No	No
23	1.4	No	No	51	0.3	No	Si
26	0.02	No	No	52	0.1	No	No
27	16.5	No	No	53	0.4	No	Si
32	0.6	No	No	55	0.3	Si	No
33	1.8	No	No	55.5	0.5	No	No
35	0.05	No	No	57	0.4	No	No
37	0.2	No	No	61	0.1	No	No
41	0.1	No	No	62	0.1	No	No
42	1.3	No	No	65	0.2	No	Si

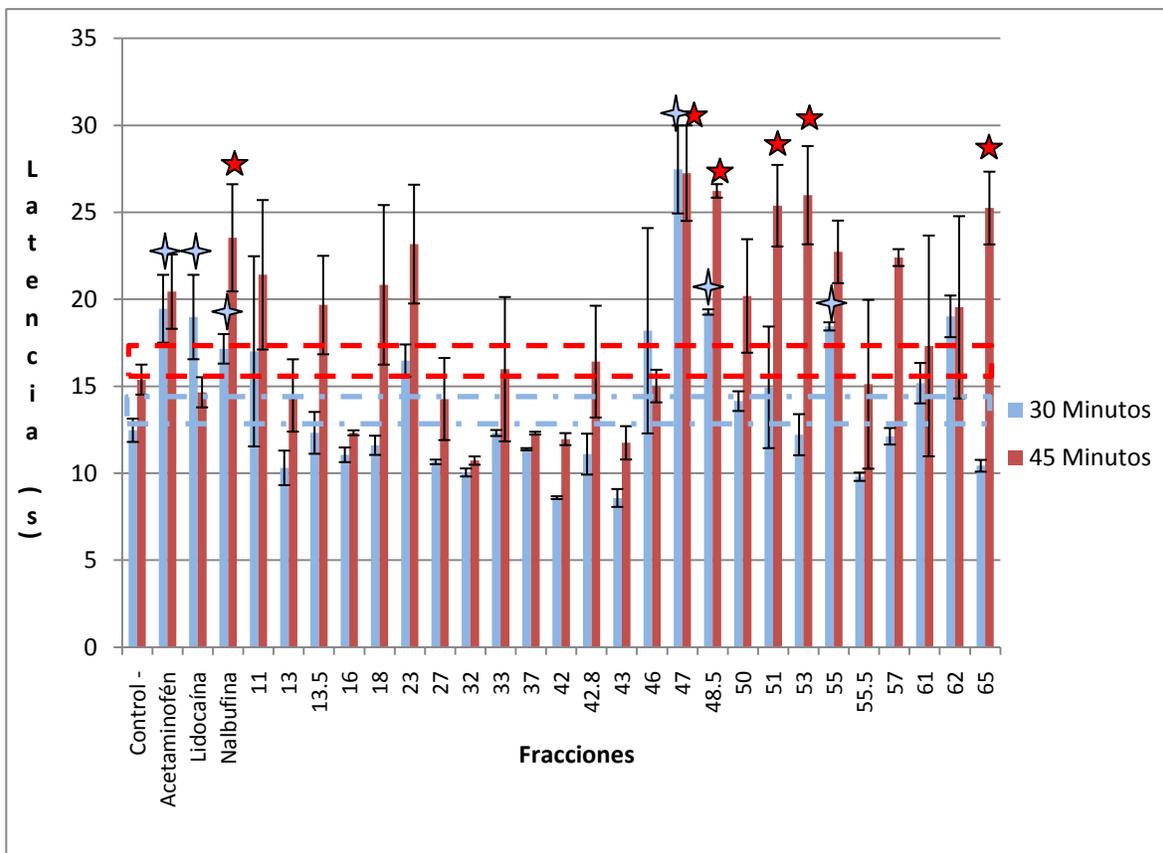


Figura 10. Tiempos de latencia en la prueba de Hot-plate con las fracciones del veneno de *Brachypelma verdezy*. Resultados obtenidos en la prueba de Hot-plate (n=3), llevando a cabo cada experimento de manera independiente con ratones machos de la cepa CD1, los resultados son expresados en un tiempo de latencia (s) con su respectivo error estándar, para cada una de las fracciones purificadas a partir del veneno de *B. verdezy*. Los rectángulos indican el tiempo de latencia del control negativo, con una confianza del 95%. Las estrellas indican un diferencia significativa entre el control negativo y el dato de la muestra utilizada. Dichos datos fueron obtenidos por medio de una prueba de ANOVA, seguida de un análisis comparativo de Tukey y un análisis individual utilizando pruebas de t de student. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 4. Las concentraciones de los controles positivos son: acetaminofén (500 µg/g), lidocaína (30 µg/g) y nalbufina (30 µg/g).

7.2.3 Pruebas con el veneno de *Cyclosternum fasciatum*

Por último se utilizó el veneno de la tarántula *Cyclosternum fasciatum*, de la cual se analizaron las 18 fracciones purificadas por medio de HPLC fase reversa y se procedió de la misma manera que ocurrió con los venenos anteriores (Tabla 5). Con respecto a este veneno, se puede observar en el anexo 1 correspondiente a la separación cromatográfica que la cantidad de fracciones presentes en el veneno de *C. fasciatum*, es menor que en los otros venenos y la mayoría se encuentran

acumulados en una zona de tiempo que comprende entre los 40 y 55 minutos de tiempo de retención.

Tabla 5. Dosis y efecto analgésico de fracciones proteicas del veneno de *Cyclosternum fasciatum* inyectadas a ratones. Los ratones tuvieron un peso promedio de 20 gramos. Se inyectaron tres (n=3) ratones CD1 machos y se observó su efecto a los 30 y 45 minutos.

Fracción	Dosis (µg/g)	Efecto analgésico aparente		Fracción	Dosis (µg/g)	Efecto analgésico aparente	
		30 Minutos	45 Minutos			30 Minutos	45 Minutos
12	0.9	No	No	49	1.1	No	No
20	0.2	No	No	49.5	5.2	No	No
24	0.7	No	Si	50	1.0	No	No
29	0.75	No	No	51	3.5	No	No
31	0.1	No	No	51.7	5.3	No	No
41	0.1	No	No	53	0.1	No	No
44	0.2	No	No	54	2.2	Si	Si
46	1.8	No	No	56	1.3	No	No
48	0.2	No	No	65	1.0	No	No

Como puede observarse en la tabla 5 y en la figura 11, la fracción que se encontró con una posible actividad analgésica fue la correspondiente al tiempo de retención de 54 minutos.

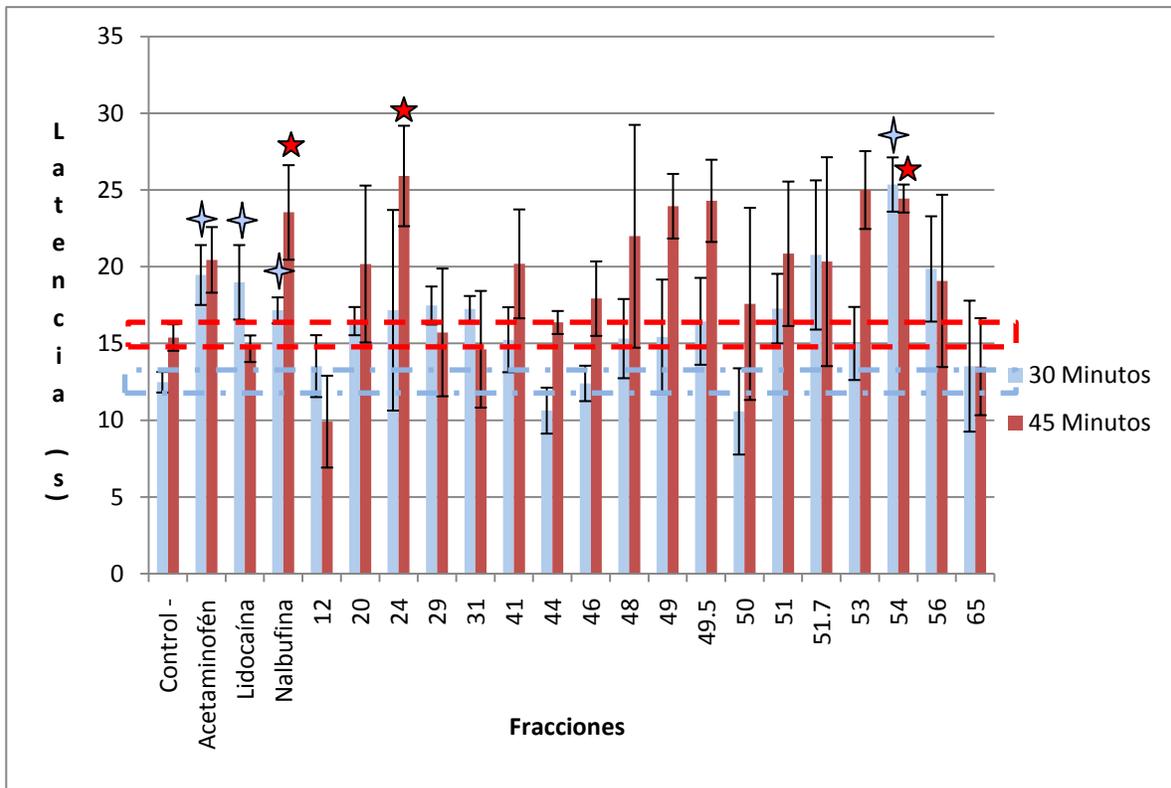


Figura 11. Tiempos de latencia en la prueba de Hot-plate con las fracciones del veneno de *Cyclosternum fasciatum*. Resultados obtenidos en la prueba de Hot-plate (n=3), llevando a cabo cada experimento de manera independiente con ratones machos de la cepa CD1, los resultados son expresados en un tiempo de latencia (s) con su respectivo error estandar, para cada una de las fracciones purificadas a partir del veneno de *C. fasciatum*. Los rectángulos indican el tiempo de latencia del control negativo, con una confianza del 95%. Las estrellas indican una diferencia significativa entre el control negativo y el dato de la muestra utilizada, siendo de color azul la que denota una diferencia en la prueba a los 30 minutos y roja para los 45 minutos. Dichos datos fueron obtenidos por medio de una prueba de ANOVA, seguida de un análisis comparativo de Tukey y un análisis individual utilizando pruebas de t student. Las concentraciones de los controles positivos son: acetaminofén (500 µg/g), lidocaína (30 µg/g) y nalbufina (30 µg/g).

7.2.4 Repurificación de fracciones peptídicas.

Se repurificaron cuatro fracciones peptídicas con resultados estadísticamente significativos en el ensayo del “Hot-plate”, correspondientes a los tiempos de retención 48.5 minutos del veneno de *Aphonopelma seemanni* y a los 47, 48.5 y 55.5 del veneno de *Brachypelma verdezy*. La nomenclatura que asignamos a cada una de ellas fue de dos letras iniciales (ej. “Bv” de **B**rachypelma **v**erdezy) de la especie seguidos de la letras “Tx”, para denotar el hecho de que se trata de aparentes toxinas. Por lo que las fracciones puras obtenidas a partir de esta repurificación fueron nombradas de la siguiente manera en las siguientes pruebas:

AsTx48, BvTx47, BvTx48 y BvTx55, como se puede notar fueron eliminados los números decimales que correspondían a su tiempo de retención inicial para facilitar su escritura. Las fracciones correspondientes a los tiempos de retención 48.5 minutos del veneno de *Aphonopelma seemanni* y a los 48.5 y 55.5 minutos del veneno de *Brachypelma verdezy* (AsTx48, BvTx48 y BvTx55) rindieron una subfracción mayoritaria (ver Anexo 3) por lo cual se consideró esta como la responsable de los efectos analgésicos observados. La fracción con tiempo de retención de 47 minutos del veneno de *Brachypelma verdezy* (BvTx47) rindió varias subfracciones pero se consideró también la subfracción mayoritaria como la responsable del efecto analgésico. La fracción correspondiente al tiempo de retención de 54 minutos del veneno de *Cyclosternum fasciatum* (cuyo péptido repurificado se iría nombrado CfTx54) rindió muy poco material, por lo cual no fue considerada para los siguientes ensayos.

7.2.5 Prueba de “Hot-plate” con péptidos puros

El ensayo de “Hot-plate” con péptidos puros confirmó las observaciones de las fracciones con actividad analgésica aparente del primer tamizaje. En estos resultados se observa un menor error estándar que aquellos obtenidos en las fracciones completas, lo cual indica que la presencia de otros residuos peptídicos en las fracciones completas pueden afectar el desempeño individual de cada uno de ellos, o bien tener un efecto sinérgico. Por ejemplo, la fracción completa de BvTx47 fue letal a los ratones bajo ensayo, sin embargo la subfracción mayoritaria después de la repurificación no tuvo ese efecto letal, pero sí un efecto analgésico. Una de las preguntas a resolver posteriormente es dar a conocer la mezcla, de cuales subfracciones de la fracción completa de BvTx47, que ejerce un efecto letal a los animales modelo.

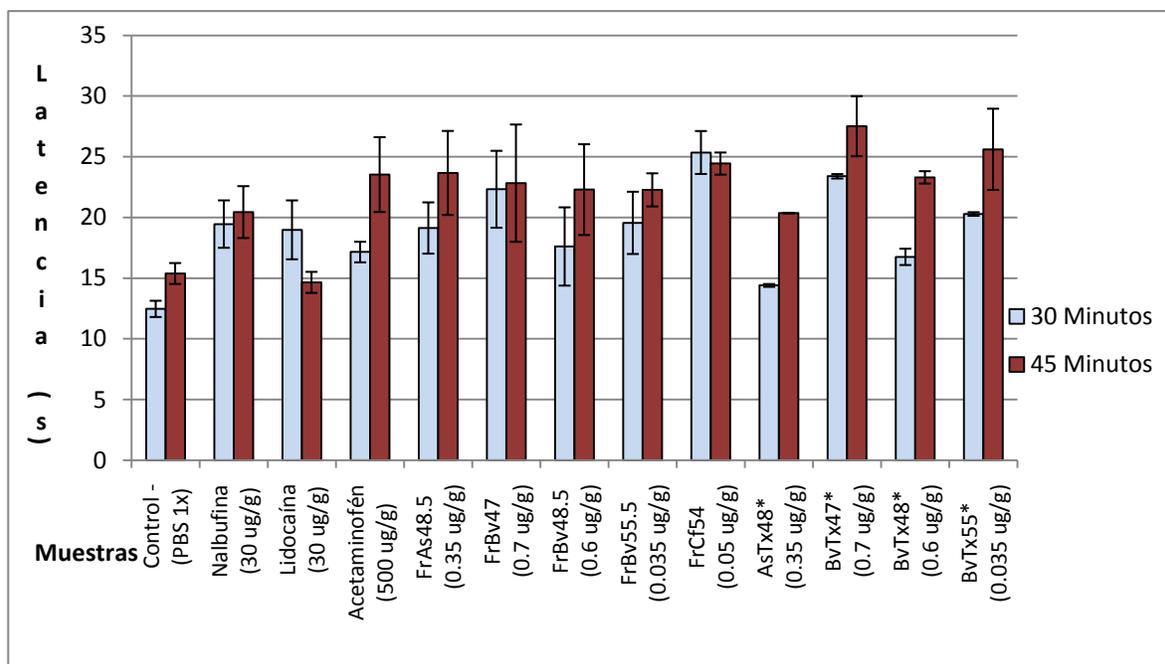


Figura 12. Tiempos de latencia en la prueba de “Hot-plate” con las fracciones repurificadas del veneno de las tres especies de arañas. Resultados obtenidos en la prueba de “Hot-plate” (n=3), llevando a cabo cada experimento de manera independiente con ratones machos de la cepa CD1, los resultados son expresados en un tiempo de latencia (s) con su respectivo error estándar, para cada una de las fracciones que pasaron el primer tamizaje y las fracciones puras se encuentran representadas con un asterisco después del nombre de la fracción (n=3). Las fracciones provenientes de la primera purificación, fueron acotadas con las letras Fr, seguidas de las letras iniciales de la especie.

7.3 Ensayo con formalina

De los cinco péptidos seleccionados en la prueba de tamizaje por medio de el ensayo de “Hot Plate”, solamente se probaron dos de ellos en el ensayo de formalina debido a la escasez de la fuente de los péptidos. En este ensayo se utilizaron péptidos puros, salvo por la fracción BvTx51 la cual se utilizó para observar el efecto de una fracción peptídica sin actividad significativa durante el tamizaje con “Hot plate”. Además de que se probaron otros tres ratones (n=3 para cada uno de estos casos) con una concentración igual que la utilizada durante los ensayos de “Hot Plate” para observar si existía algún cambio en su efecto biológico.

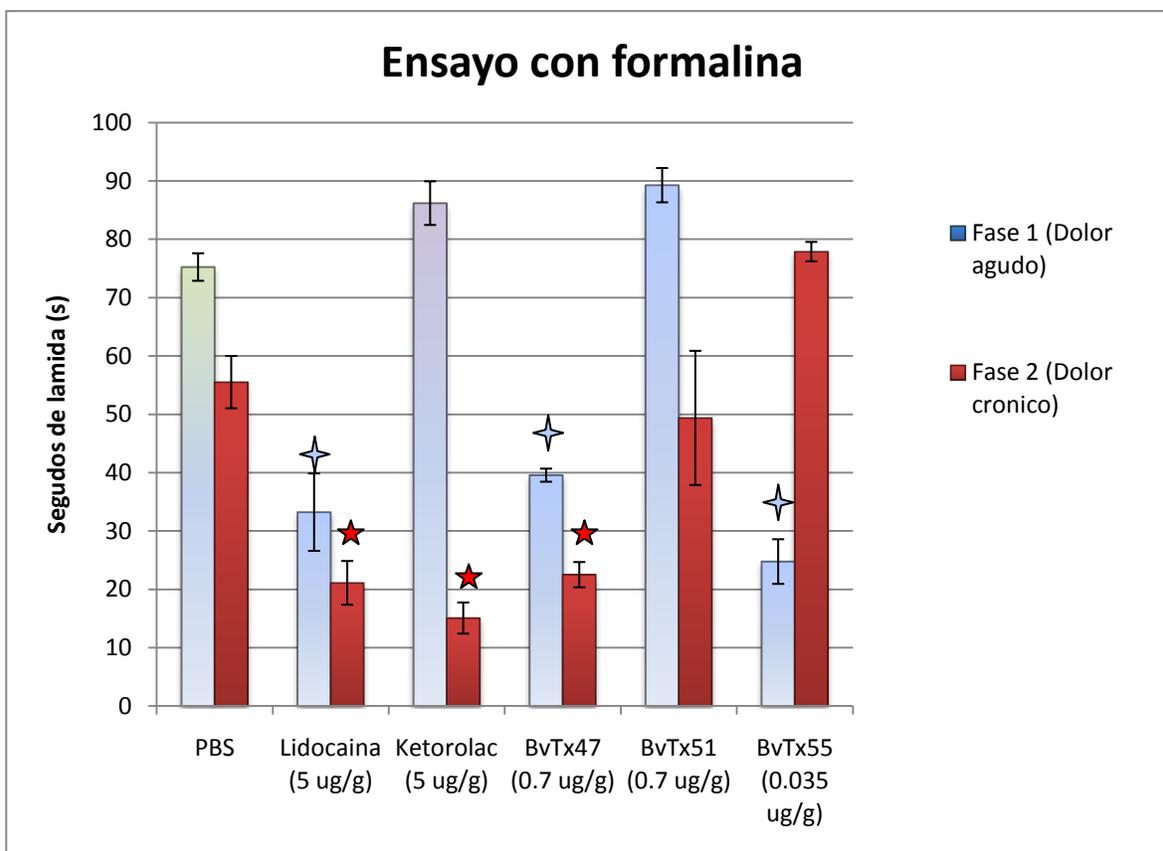


Figura 13. Segundos de lamida presentados en la prueba de formalina. Resultados obtenidos en la prueba de formalina (n=3), llevando a cabo cada experimento de manera independiente con ratones machos de la cepa CD1, los resultados son expresados en segundos de lamida con su respectivo error estándar, para los péptidos repurificados BvTx47 y BvTx55, así como la fracción completa BvTx51. Las estrellas indican una diferencia significativa entre el control negativo y el dato de la muestra utilizada, siendo de color azul la que denota una diferencia durante la fase de dolor agudo y roja para la fase de dolor crónico. Dichos datos fueron obtenidos por medio de una prueba de ANOVA, seguida de un análisis comparativo de Tukey (Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 4). El efecto analgésico del péptido BvTx47 en las dos fases del ensayo de formalina fue significativo ($p < 0.05$) de modo similar al que los analgésicos Lidocaína y Keterolaco lo fueron con respecto al control de solución salina (PBS). El péptido BvTx55 fue analgésico solamente en la fase 1 relacionada al dolor agudo. Por otro lado, la fracción BvTx51 que no mostró analgesia en la prueba de Hot Plate, y que en este ensayo fue utilizado como control negativo, no mostró efectos significativos ($p > 0.05$) en esta prueba.

7.4 Caracterización química

Por medio de degradación de Edman se determinó la secuencia parcial amino terminal de cuatro de los cinco péptidos repurificados con actividad analgésica (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencias amino terminal de péptidos con actividad analgésica. Secuencias obtenidas por medio de la degradación de Edman. La secuencia de BvTx47 fue completada posteriormente por medio de RACE-PCR.

Péptido	Secuencia amino terminal	Masa molecular experimental (Da)
AsTx48	CLGENVPCDKDRPNC...	4,844.7
BvTx47	TIFEVFSCDIKKEGKPKPKGKEK...	4,560.2
BvTx48	VLEGNVXXNNE...	3,722.0
BvTx55	ACSKQVGEKCKCKRNCECCGPVNVCG...	7,497.8
CfTx54	ND	ND

X representa aminoácidos no identificados. ND-no determinado

La tabla 6 también muestra los pesos moleculares experimentales obtenidos por medio de espectrometría de masas (Anexo 2). Con los datos recabados de la secuencia parcial de cuatro de los péptidos encontrados se llevó a cabo una búsqueda de identidad por medio de los programas Blastp y Blastn en la base de datos depositada en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estos resultados se pueden observar en las tablas 7, 8 y 9. No se observaron resultados satisfactorios con la secuencia de BvTx48.

Tabla 7. Comparación de la secuencia de AsTx48 con otros péptidos. Secuencias que comparten una mayor identidad con AsTx48 y las actividades biológicas observadas de cada péptido. Estas fueron determinadas con la ayuda del programa Blast.

Péptido	Secuencia	Actividad	Organismo	Referencia
AsTx48	CLGENVPCDK DRPNC	ND	<i>A. seemanni</i>	Este Trabajo
Asp3a	CLGENVPCDK DRPNCCKSKYE CLEPTGYGRC YASYYSYKKK TL	Inhibidor canal de calcio	<i>Aphonopelma sp.</i>	Nason <i>et al.</i> , 1994
Bs1	IFEVFSCDI EKEGKPKPKK GEKKCSGGWK CKIKLCLKI	ND	<i>B. smithi</i>	Corzo <i>et al.</i> , 2008

ND-no determinado

Tabla 8. Comparación de la secuencia de BvTx47 con otros péptidos. Secuencias que comparten una mayor identidad con BvTx47 y las actividades biológicas observadas de cada péptido. Estas fueron determinadas con la ayuda del programa Blast.

Péptido	Secuencia	Actividad	Organismo	Referencia
BvTx47	TIFEVFS ^C DIKKEGKPK ^C KPKGEK	ND	<i>B. verdezy</i>	Este Trabajo
Ba1	IIFEVFS ^C DIKKEGKPK ^C KPKGEKK ^C TGGWR ^C CKIKL ^C CLKI	Insecticida	<i>B. albiceps</i>	Corzo <i>et al.</i> , 2008
Bs1a	IIFEVFS ^C DIEKEGKPK ^C KPKGEKK ^C SGGWK ^C CKIKL ^C CLKI	ND	<i>B. smithi</i>	Kaiser <i>et al.</i> , 1994
Asp1a	IIFEVFS ^C DIEKEGKPK ^C KPKGEKK ^C TGGWK ^C CKIKL ^C CLKI	Insecticida	<i>E. californicum</i>	Savel-Niemann, 1989
Toxin like LFEC	LFEV ^C VIS ^C DIEKEGKPK ^C KPKGEKK ^C KPKGGWK ^C KFN ^C FLKV	ND	<i>C. crawshayi</i>	Diego-García <i>et al.</i> , 2010
Sequence 8	LFEV ^C LS ^C DIKKNKPK ^C KPKGEKK ^C SGGW ^C CKINF ^C CLKV	Canales de calcio	<i>Aphonopelma sp.</i>	Nason <i>et al.</i> , 1994
Sequence 3	LFEV ^C ALS ^C DIKKNKPK ^C KPKGEKK ^C SGGW ^C CKINF ^C CLKI	Canales de calcio	<i>Aphonopelma sp.</i>	Nason <i>et al.</i> , 1994

ND-no determinado

Tabla 9. Comparación de la secuencia de BvTx55 con otros péptidos. Secuencias que comparten una mayor identidad con BvTx55 y las actividades biológicas observadas de cada péptido. Estas fueron determinadas con la ayuda del programa Blast.

Péptido	Secuencia	Actividad	Organismo	Referencia
BvTx55	AS ^C SKQVGEK ^C CK ^C KRN ^C CE ^C CGP ^C VNV ^C CG	ND	<i>B. verdezy</i>	Este Trabajo
Magi-16	AS ^C SKQLGEK ^C CK ^C NKQ ^C CCGATV ^C CGTIWVGGKEVNK ^C CMSKT SNNWFLNKLGE ^C GMNAVANAFS ^C IS ^C CN	Insecticida	<i>M. gigas</i>	Satake <i>et al.</i> , 2004
Toxin like ACSKQ	AS ^C SKQIGEK ^C CEHD ^C QCCGATV ^C CGTIYVGGNAVEQ ^C CMSKT SNNAVLNTMGHGMNAVQNAFTSVM ^C CG	ND	<i>C. crawshayi</i>	Diego-García <i>et al.</i> , 2010
HW18g16s toxin like	AS ^C SKQIGDR ^C CKSN ^C DCCGTTVT ^C CGTIYVGGKEVNQ ^C CMDKS SDNAVLNGIGKGNFVKNSFS ^C FCV	ND	<i>O. huwena</i>	Jiang <i>et al.</i> , 2008
HNTX XVIII.2 precursor	MKLSIIIIIVT SLVIAVVAFP SKDSKAIEND KTEQRMEIVV QETARA ^C SKQ IGDK ^C KRNCE	ND	<i>O. hainana</i>	Tang <i>et al.</i> , 2010

ND-no determinado

7.5 Construcción de librerías de cDNA y Resolución de estructura primaria por medio de RACE-PCR

Se llevó a cabo un banco de cDNA de las glándulas de veneno de cada especie, de las cuales la eficiencias para *A. seemanni*, *B. verdezy* y *C. fasciatum* fué de 1.3×10^6 , 9×10^5 y 1.1×10^6 unidades de colonias formadas por 100 ng de plásmido, respectivamente. Estos bancos de cDNA fueron construidos con la finalidad de obtener los RNA mensajeros completos de los péptidos con actividad analgésica, y de esta manera encontrar la secuencia primaria completa de dichos péptidos. Se diseñaron oligonucleótidos para las secuencias N-terminal de los péptidos AsTx48, BvTx47, BvTx48 y BvTx55 en base al código de codones para aminoácidos mas utilizados por especies de la familia *Theraphosidae*.

Los oligonucleótidos diseñados para extraer los transcritos correspondientes a los péptidos analgésicos solo fueron eficaces para el transcrito que codifica a la BvTx47 del banco de cDNA de *B. verdezy*, ya que se obtuvo un fragmento de cDNA correspondiente a la secuencia de los aminoácidos restantes (Tabla 11). El peso molecular teórico de la secuencia primaria de BvTx47 corresponde al peso molecular experimental previamente obtenido. La única diferencia con el péptido Ba1 es en dos residuos, una treonina es el primer aminoácido del N-terminal de BvTx47 y una metionina precede a la última cisteína, en lugar de una leucina como en Ba1 (ver Tabla 8 y 11).

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para obtener transcritos de los péptidos analgésicos. Estos oligonucleótidos se diseñaron para la búsqueda de la secuencia completas de los péptidos seleccionados.

Péptido	Secuencia de oligonucleótidos (5' a 3')
AsTx48	GGA GAA AAC GTC CCA TGY GAC G E N V P C D
BvTx47	ATT CTC GAA TGT GTT TTC TCA TG I L E C V F S
BvTx48	GTT CTG GAA GGA AAC GTT V L E G N V
BvTx55	GCT TGY TCC AAR CAR GTN GGA GAA AAR TG A C S K Q V G E K

Tabla 11. Secuencia completa del péptido BvTx47 y su identidad con el péptido Ba1.

Péptido	Secuencia	Actividad	Peso Molecular (Da)	Referencia
BvTx47	TIFECVFS ^C DIKKEGKPC ^C KPKGEKKCTGGWRC ^C KIKM ^C CLKI	ND	4,560.2	Este Trabajo
Ba1	IFE ^C VFS ^C DIKKEGKPC ^C KPKGEKKCTGGWRC ^C KIKL ^C CLKI	Insecticida	4,548.2	Corzo <i>et al.</i> , 2008

Con respecto a los oligonucleótidos diseñados para extraer los transcritos de AsTx48, BvTx48 y BvTx55 hasta ahora no se han tenido resultados satisfactorios.

7.7 Estructura tridimensional propuesta en base a alta identidad con otros péptidos.

BvTx47 es similar a otros péptidos con una estructura tridimensional determinada, tal como en el caso de Ba1 (Corzo *et al.*, 2008) con la cual se tienen un 95% de identidad. Ba1 sirvió como base para generar distintos modelos tridimensionales del péptido BvTx47. Usando los servidores EsyPred (Lambert *et al.*, 2002) y Yasara (Krieger *et al.*, 2009) se crearon dos estructuras tridimensionales las cuales son únicamente predicciones de cómo podría ser la estructura tridimensional de BvTx47, el cual denota una muy alta similitud estructural con el modelo de Ba1 utilizado como base.

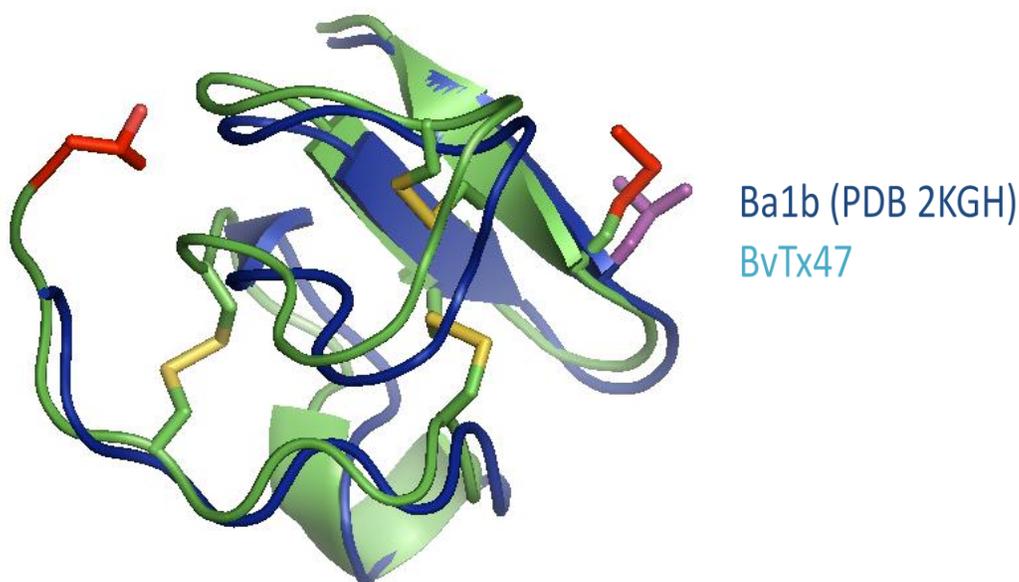


Figura 14. Modelos tridimensionales de BvTx47. La figura en color verde fue generada usando el software ESyPred y la figura en color azul es el modelo tridimensional del péptido insecticida Ba1 depositado en el PDB con el número de acceso 2KGH. Mientras que los residuos resaltados en rojo denotan tanto la adición así como las mutaciones presentes en BvTx47 con respecto a Ba1.

7.8 Actividad insecticida de BvTx47

Debido a la similitud que comparte la toxina BvTx47 con la toxina Ba1, se llevó a cabo un ensayo cualitativo para observar si BvTx47 también tiene una actividad insecticida en grillos (*Acheta domesticus*).

Tabla 12. Actividad insecticida de BvTx47. Dosis, concentraciones y efectos de dos péptidos similares en grillos. La actividad insecticida fue comprobada mediante la inyección de 20.6 μg de péptido BvTx47 por cada gramo de grillos. Esta concentración es equivalente a la concentración necesaria para matar el mismo tipo de insecto por parte de neurotoxinas insecticidas de araña y alacrán.

Muestra	A280	Conc. Final ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Vol. inyectado (μL)	Peso grillo (g)	Dosis ($\mu\text{g}/\text{g}$ de grillo)	Efecto biológico
Control (PBS)	0.0	0.0	10	0.044	0.0	No
BvTx47	0.069	0.07	10	0.029	20.6	Sí*
Ba1	0.690	0.7	3	0.17	12.1	Sí**

Nota: * = Muerte instantánea. ** = Parálisis a los 3 minutos y muerte tras 10 minutos.

8. Discusión.

8.1 Cromatografías.

Durante la cromatografía semipreparativa se obtuvieron una gran variedad de fracciones, tanto de poliaminas como de proteínas, esto encaja bien con las descripciones de otros trabajos acerca del contenido promedio de estos componentes en el veneno de araña (Escoubas y Rash, 2004); por ejemplo, nuestros datos indicaron de 50 a 80 péptidos por veneno. Varias fracciones estaban compuestas por más de un péptido (3 y 4 péptidos por fracción) en su mayoría lo cual nos arroja un número similar al esperado en el veneno de este tipo de arácnidos (Tang *et al.*, 2010).

8.2 Ensayos biológicos.

Tras llevar a cabo el tamizaje de las fracciones obtenidas en base al ensayo del “Hot plate” en cada uno de los venenos, se seleccionaron estadísticamente aquellas fracciones con una mayor actividad analgésica aparente, a los 30 y 45 minutos de inyectadas. Este primer tamizaje no arrojó resultados absolutos, ya que pudieron existir algunas fracciones con propiedades analgésicas las cuales no pudieron identificarse por medio del ensayo de “Hot Plate” debido a que tal vez actúan sobre otro tipo de nociceptores cuya actividad no pueda ser observada de por este ensayo. Así mismo, debido a las concentraciones normalizadas en base al veneno, algunas de ellas tal vez no se encontraron en cantidades suficientes para ejercer su efecto analgésico. Así que bajo las condiciones de tamizaje utilizadas dichas fracciones seleccionadas (AsTx48, BvTx47, BvTx48, BvTx55 y CfTx54) son las que representaron un mejor prospecto para un análisis posterior y mas detallado.

Tras obtener los péptidos con actividad analgésica en la prueba de tamizaje, se procedió a llevar a cabo un repurificación de las fracciones para probar su actividad biológica en su estado puro. En el caso de las fracciones AsTx48, BvTx48 y BvTx55 solo se obtuvo una subfracción mayoritaria (Anexo 3). Mientras que en el caso de BvTx47 se obtuvieron mas subfracciones, así como poliaminas,

de las subfracciones se eligió a la número 6, la cual representa el 11.9% del total de la fracción (Anexo 3).

En los resultados de las pruebas de tamizaje se observaron errores estándar muy altos, estas altas variaciones de la media son consecuencia de varios factores biológicos, de los cuales se trató de minimizar el genotipo del individuo (se utilizaron la cepa de ratones CD1) y el sexo (ratones machos) (Fillingim y Gear, 2004). Sin embargo el umbral al dolor propio del individuo (Fillingim y Gear, 2004) y el que se trate de una prueba que es *per se* susceptible a una alta variabilidad provoca altas desviaciones de la media (Souza *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2005). Errores estándar altos también se han observado en ensayos por vía intratecal, usando péptidos analgésicos de acción comprobada como en el caso del Prialt o conotoxina MVIIA (Wang *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005).

Las variaciones en nuestros primeros ensayos también se pudieron deber a que las fracciones probadas contienen más de una molécula, lo cual puede observarse en el caso de la fracción BvTx47, que al ser probada como una fracción completa es letal para los ratones, mientras que la subfracción mayoritaria obtenida tras la repurificación de la fracción completa (que fue la utilizada para el resto de los ensayos como péptido puro) tiene un efecto analgésico. Este tipo de variaciones se hacen evidentes en los resultados mostrados en la figura 12 donde se lleva a cabo una comparativa que incluye a los péptidos repurificados de las fracciones analgésicas, BvTx47 a una concentración de 0.7 µg/g tiene un efecto analgésico. En dicha figura se puede observar como el error estadístico en los tiempos de latencia se reduce a consecuencia de una mayor pureza de las muestras utilizadas. Cabe mencionar que tras finalizar las pruebas de tamizaje por medio del ensayo de “Hot plate” se eligieron estadísticamente cinco fracciones distintas con un posible efecto analgésico.

Con respecto a la concentración de péptido necesario para inducir un efecto analgésico en los animales, nuestros únicos puntos de referencia y comparación fueron los analgésicos utilizados como control positivo y los datos en la literatura de ensayos de analgésicos peptídicos como el Prialt en la prueba de “Hot plate”

(Tabla 11). Por ejemplo, la concentración del péptido Prialt que ejerce un efecto analgésico *via* intratecal en ratón es de 0.03 µg/h (Wang *et al.*, 1999). También se tomó como referencia los estudios con diferentes extractos y compuestos donde se manejan condiciones similares a las que se han manejado en esta investigación (Malairajan *et al.*, 2006; Oyemitan *et al.*, 2008; Spessoto *et al.*, 2003; Tanko *et al.*, 2008). En base a esos datos y a la concentración obtenida de cada fracción tras purificar 30 mg totales de veneno de cada especie se decidió primeramente inyectar el 10% de la cantidad total de cada fracción y observar si existía un efecto biológico de las fracciones administradas por una *via* intraperitoneal. Los resultados fueron alentadores, ya que se han realizado otros estudios como en el caso de la Psalmotoxina-1 con la cual no se obtiene ningún efecto analgésico al llevar a cabo una inoculación intraperitoneal (Mazzuca *et al.*, 2007). Mientras que para observar un efecto de GsMTx4 se requirió una inoculación intraperitoneal a concentración de 270 µg/kg de rata (Park *et al.*, 2008). En el estudio con Psalmotoxina-1 también se lleva a cabo la prueba de “Hot plate”, solo que en este caso las inoculaciones fueron por *via* intratecal e intracerebro-ventricular administrándose 0.01 nmol/ratón (Mazzuca *et al.*, 2007). Además manejaron ratones *knock-out*, lo que implica que la población utilizada tiene muy poca variabilidad genética, lo cual aunado al tipo de inoculaciones realizadas, estas permiten observar un efecto biológico con una menor cantidad de muestra y también una menor variabilidad de datos, debido a las condiciones utilizadas (Mazzuca *et al.*, 2007). Dichas condiciones son similares en varios de los estudios realizados con péptidos analgésicos (Chen *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008), estos no se utilizaron en este trabajo debido a que se siguieron los protocolos estándar de las metodologías utilizadas las cuales son usadas mas ampliamente (Malairajan *et al.*, 2006; Oyemitan *et al.*, 2008; Spessoto *et al.*, 2003; Tanko *et al.*, 2008). Como puede observarse en la figura 12, usando fracciones con mayor pureza se obtuvieron resultados mas consistentes y con menor variabilidad, similares los observados en el trabajo que se llevó a cabo con la Psalmotoxina-1 (Mazzuca *et al.*, 2007).

La prueba de formalina es una de las pruebas mas utilizadas en la prueba de analgésicos, junto con la prueba de “Hot plate” y también ha sido utilizada para probar péptidos analgésicos de origen animal (Mazzuca *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). Con estas pruebas se pudo confirmar la existencia de una actividad analgésica por parte de los péptidos BvTx47 y BvTx55. Con el péptido BvTx47 se pudo observar un efecto analgésico bastante marcado y muy similar al provocado por la lidocaína. Los resultados obtenidos por medio de esta prueba nos han llevado a reafirmar que el péptido puro BvTx47 tiene un efecto analgésico sobre ratones. Estos resultados también indican la existencia de un efecto analgésico por parte del péptido BvTx55 durante la primera fase del ensayo con formalina (fase de dolor agudo), lo que junto con los resultados obtenidos en “Hot plate”, nos permite inferir que BvTx55 tiene una acción mas rápida y menos duradera que BvTx47, lo cual también se pudo observar en las pruebas de “Hot plate” (Figura 10 y 12) donde a los 30 minutos de inyectada presentó un mejor desempeño decayendo su analgesia a los 45 minutos, al igual que ocurrió con la prueba de “Hot-plate”. Otros estudios realizados con péptidos analgésicos utilizan otras vias de administración tales como la intratecal e intracerebro ventricular (Mazzuca *et al.*, 2007; Chen 2005), por lo que han utilizado cantidades más pequeñas de péptido (Tabla 11). Sin embargo usando cantidades diez veces menores que las usadas durante las pruebas de tamizaje hemos podido observar resultados favorable con BvTx47 y BvTx55 con las concentraciones utilizadas (0.7 µg/g y 0.03 µg/g, respectivamente).

Con estos ensayos biológicos no solo se pudo observar un efecto analgésico por parte de algunos péptidos presentes en los venenos, sino también la presencia de fracciones y/o péptidos los cuales pareciesen tener un efecto agonista sobre algún tipo de canal que se encarga de la transmisión de señales nociceptivas (Cromer y McIntyre, 2007).

8.3 Caracterización de péptidos.

Es de particular importancia el hacer notar la alta plasticidad que parece presentar el péptido BvTx47, ya que ha mostrado una actividad analgésica en dos ensayos

que estimulan distintos tipos de nociceptores. Sin embargo cabe la posibilidad de que el péptido BvTx47 afecte un receptor específico, aunque se ha observado que generalmente las neurotoxinas del veneno de arácnidos, especialmente las de las arañas, pueden ser promiscuas; esto es, tener afinidades relativamente altas por uno o mas receptores celulares. Esta promiscuidad ya es bien conocida en otras toxinas que forman parte del veneno de tarántulas (Redaelli *et al.*, 2004; Karamaju *et al.*, 2010).

La comparación de los resultados de actividad analgésica obtenidos con nuestros péptidos, con aquellos obtenidos por otros grupos de investigación, es difícil debido a la forma en la que la mayoría lleva a cabo los estudios analgésicos con dichos péptidos, en donde la vía de administración es distinta y las cantidades utilizadas también lo son (Chen *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2008; Roerig y Howse, 1998; Mazzuca *et al.*, 2007) (Tabla 11). Con respecto a las comparaciones entre distintos reportes de péptidos analgésicos, se pueden observar dos datos interesantes, el primero es la concentración de la dosis administrada en los animales, la cual es bastante baja comparada con los 140 µg por ratón que utilizamos para la fracción completa de BvTx47, pero posteriormente esta representó la decima parte de esa fracción es decir 14 µg en la prueba de formalina, y el segundo, son las inoculaciones, las cuales se realizan principalmente de manera intratecal o intracerebro ventricular (ICV) y que *per se* requieren de una menor cantidad de muestra presente para poder llevar a cabo un efecto biológico debido a la sensibilidad que presentan los lugares de inoculación.

Tabla 13. Datos de analgesia de péptidos provenientes de animales ponzoñosos. Dosis y condiciones reportadas para varios péptidos con actividad analgésica.

Péptido analgésico	Dosis	Condiciones	Referencia
Prialt	0.03 µg/h	Prueba de "hot plate" de larga duración, inoculación intratecal.	Wang <i>et al.</i> , 1998
PcTX1	0.01 nmol	Prueba de "hot plate", inoculación ICV e intratecal, usando ratones <i>knock-out</i> .	Mazzuca <i>et al.</i> , 2007
ProTX II	0.1 mg/kg y 0.01 mg/kg	Modelo de dolor inflamatorio en rata	Schmalhofer <i>et al.</i> , 2008
HWTX-1	1 µg/kg	Ensayo de formalina con inoculación intratecal.	Chen <i>et al.</i> , 2005
Phα1β	30 a 300 pmol	Prueba "hot plate" con inoculación intratecal	Souza <i>et al.</i> , 2008
ω-Aga-IVA	25 ng/ratón	Inoculación intratecal	Roerig y Howse, 1998
GsMTx4	270 µg/kg	Prueba de "hot plate" en rata, vía de inoculación no especificada	Park <i>et al.</i> , 2008
BvTx47	0.7 µg/g	Prueba de "hot plate" y formalina con inoculación intraperitoneal	Este trabajo

ND-no determinado

Tras resolver la secuencia primaria completa de BvTx47 se pudo determinar que este péptido no pertenece a la familia estructural de los péptidos ICK, debido a como se encuentran colocadas sus cisteínas dentro de su estructura primaria, además de compartir una alta identidad con los péptidos Ba1 y Bs2 los cuales pertenecen a una familia estructural distinta de péptidos llamados DDH (Corzo *et al.*, 2009). Estos también presentan tres puentes disulfuro pero en un acomodo totalmente distinto al de los péptidos del tipo ICK. Presentando lo siguientes puentes disulfuro: Cisteína I – Cisteína III, Cisteína II – Cisteína V y Cisteína IV – Cisteína VI (Wang *et al.*, 2000, Liang *et al.*, 2008).

Existen cerca de 30 péptidos de este tipo reportados en venenos de diferentes tarántulas y se conoce la actividad biológica específica de algunos de ellos entre los cuales se encuentran tres de los péptidos que comparten una mayor identidad con el péptido BvTx47 (Tabla 8) entre ellos Ba1 la cual muestra un efecto insecticida sobre grillos (*Acheta domesticus*), el cual también se pudo observar con la toxina BvTx47 en un ensayo preliminar (Tabla 10). Además de generarse una serie de modelos tridimensionales tomando como base el péptido Ba1 y que nos permiten observar una gran similitud estructural entre estos y otros péptidos (Nason *et al.*, 1994). Sin embargo son muy pocos los péptidos analgésicos, de los

cuales se sabe su blanco específico y su modo de acción (Nason *et al.*, 1994). Nason y colaboradores (1994) publicaron una patente que establece que un grupo de nueve distintos péptidos bloquean canales de calcio, varios de estos péptidos comparten una secuencia muy parecida a la de BvTx47 y AsTx48 (Tabla 8). En dicho trabajo se lleva a cabo una metodología de marcaje llamada fura2 y donde usaron nifedipina y verapamil (drogas para el tratamiento de males cardíacos como angina de pecho) como controles positivos, a pesar de mencionar que son bloqueadores de canales iónicos de calcio no se muestra ningún resultado sobre el blanco de estos péptidos. Además de que se trata del único caso reportado de péptidos con estructura DDH. Así mismo, la manera en que se llevo a cabo la determinación del tipo de receptores en los cuales actúan, arroja resultados muy ambíguos y permite determinar el tipo específico de receptor blanco. Es por ello que bien podríamos especular que el péptido BvTx47 encontrado en este trabajo pudiese tener el mismo blanco propuesto por Nason *et al.*, pero por ahora se deben llevar a cabo experimentos que den resultados más concluyentes.

Un resultado interesante con miras a conocer un poco acerca de los posibles receptores de BvTx47 es su efecto insecticida. Hasta ahora los receptores nociceptivos más acordes con el efecto insecticida pudieran ser los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v). Es conocido que la identidad entre los Na_v de insecto y mamífero puede ser de hasta un 60%, por lo cual una aproximación a conocer el blanco de BvTx47 en los ratones sería observar el efecto de este péptido en subtipos de Na_v asociados al dolor como Na_v 1.7, 1.8 y 1.9.

Mientras tanto la secuencia obtenida para la toxina BvTx55 nos indica que esta si se trata de un péptido de la familia estructural ICK siendo del subtipo que tiene una lazo largo en el asa número 5 y pertenece a una subfamilia nombrada del tipo ACSKQ (Diego-García *et al.*, 2010), de la cual no se sabe mucho acerca de sus formas de actuar sobre el sistema nervioso.

Durante la construcción de las bibliotecas de cDNA se hicieron esfuerzos para obtener la mayor eficiencia posible ya que los primeros intentos daban resultados con órdenes de magnitud de entre 10^3 y 10^4 UFC (unidades formadoras de

colonia/ng de plásmido transformado) los cuales son órdenes de magnitud muy bajos para una biblioteca de cDNA (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008) así que se siguieron mejorando hasta obtener bibliotecas con órdenes de magnitud de entre 10^5 y 10^7 UFC, las cuales están en una eficiencia similar a otras bibliotecas de cDNA de arácnidos (García-Diego *et al.*, 2010).

8.4 Estructura tridimensional.

Con respecto a los modelos tridimensionales generados para el péptido BvTx47 por medio de los servidores Yasara y EsyPred, nos muestran un dato importante, el cual es que este péptido solo cuenta con dos hojas beta en su estructura tridimensional, siendo estas dos hojas beta las que forman el núcleo hidrofóbico del BvTx47. La pérdida de la tercera hoja beta no se ha observado en la estructura tridimensional de otras toxinas que comparte una alta identidad con BvTx47, tal es el caso de Ba1 (Corzo *et al.*, 2009) y Huwentoxina II (Shu *et al.*, 2001), entre otras. El modelo estructural de BvTx47 podría explicar el hecho de que esta toxina, no tan rígida como las otras, en particular tenga un rango de acción lo suficientemente amplio como para poder reconocer diferentes receptores nociceptivos y generar analgesia a diferentes estímulos, ya sean térmicos (“Hot Plate”), mecánicos (primera fase del ensayo de formalina) o químicos (segunda fase del ensayo de formalina). Sin embargo solo podremos comprobar esta hipótesis hasta obtener la estructura tridimensional real o conocer los nociceptores sobre los cuales actúa BvTx47.

9. Conclusiones y perspectivas.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que los venenos de las tres arañas contienen péptidos con actividad analgésica, la cual pudiera abarcar varios tipos de nociceptores (sensibles al calor, mecanoreceptores o quimiorreceptores). A partir del tamizaje del veneno de las tres especies de terafósidos, se determinó la secuencia de un péptido con propiedades analgésicas el cual ha sido llamado BvTx47, proveniente del veneno de la especie *Brachypelma verdezy*. Este es un péptido que forma parte de una familia estructural llamada DDH, la cual es común entre los péptidos presentes en los venenos de arañas y que es similar a otros péptidos reportados con actividad insecticida. Otros cuatro péptidos provenientes de los venenos de las especies *B. verdezy* (2), *A. seemanni* (1) y *C. fasciatum* (1) resultaron también con propiedades analgésicas, sin embargo sus secuencias aminoacídicas de no han sido determinadas.

Perspectivas

Con base en los resultados proponemos;

1. Determinar la estructura de los cuatro péptidos restantes.
2. Determinar el receptor o receptores blanco de estos péptidos, debido a sus características estructurales y de actividad se sugieren canales Na_v y Ca_v .
3. Producir la BvTx47 mediante síntesis química o expresión heteróloga con el propósito de realizar más ensayos biológicos.
4. Observar si péptidos insecticidas como Ba1 tienen efectos analgésicos, tal y como los tiene BvTx47.

10. Referencias

1. Abbott, F. V., Ocvirk, R., Najafee, R., and Franklin, K. B. (1999) Improving the efficiency of the formalin test., *Pain* 83, 561-9.
2. Adriaensen, H., Gybels, J., Handwerker, H. O., and Van Hees, J. (1980) Latencies of chemically evoked discharges in human cutaneous nociceptors and of the concurrent subjective sensations., *Neuroscience letters* 20, 55-9.
3. Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008) Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 1498-508.
4. Bourinet, E., and Zamponi, G. W. (2005) Voltage gated calcium channels as targets for analgesics., *Current topics in medicinal chemistry* 5, 539-46.
5. Brooks, J., and Tracey, I. (2005) From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways., *Journal of anatomy* 207, 19-33.
6. Burgess, S.M., and Perl E.R. (1967) Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin, *Journal of physiology* 190, 541-62.
7. Buschmann, H., Christoph, T., Friderichs, E., Maul, C., Sundermann, B., and Ed, J. L. (2002) Analgesics : from chemistry and pharmacology to clinical application, *Pharmacology*, pp 3-527.
8. Cain, D. M., Khasabov, S. G., and Simone, D. a. (2001) Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study., *Journal of neurophysiology* 85, 1561-74.
9. Chan, T.K., Geren C.R., Howell D.E. and Odell G.V. (1975) Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. *Toxicon* 13, 61-66.
10. Chen, J.-Q., Zhang, Y.-Q., Dai, J., Luo, Z.-M., and Liang, S.-P. (2005) Antinociceptive effects of intrathecally administered huwentoxin-I, a selective N-type calcium channel blocker, in the formalin test in conscious rats., *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 45, 15-20.
11. Corzo, G., Bernard C., Clement H., Villegas E., Bosmans F., Tytgat J., Possani L. D., Darbon H., and Alagón A. (2009) Insecticidal peptides from the theraphosid spider *Brachypelma albiceps*: An NMR-based model of Ba2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794, 1190-96.
12. Cromer, B.A. and McIntyre P., (2008) Painful toxins acting at TRPV1. *Toxicon*

51, 163-73.

13. Davis, KD. and Pope G., (2002) A Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* 98, 179-85.
14. Diao, J. (2003) cDNA sequence analysis of seven peptide toxins from the spider *Selenocosmia huwena*, *Toxicon* 42, 715-723.
15. Diego-García, E., Peigneur, S., Waelkens, E., Debaveye, S., and Tytgat, J. (2010) Venom components from *Citharischius crawshayi* spider (Family *Theraphosidae*): exploring transcriptome, venomics and function. *Cell Mol Life Sci* 67, 2799-813.
16. Domer, F. (1990) Characterization of the analgesic activity of ketorolac in mice., *European journal of pharmacology* 177, 127-35.
17. Donier, E., Rugiero, F., Jacob, C., and Wood, J. N. (2008) Regulation of ASIC activity by ASIC4--new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay., *The European journal of neuroscience* 28, 74-86.
18. Escoubas, P., and Rash, L. (2004) Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists., *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 43, 555-74.
19. Espejo, E. F., and Mir, D. (1993) Structure of the rat's behaviour in the hot plate test., *Behavioural brain research* 56, 171-6.
20. Fernandes-Pedrosa, M. de F., Junqueira-de-Azevedo, I. de L., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Kobashi, L.S., Almeida, D.D., Ho, P.L., and Tambourgi, D.V. (2008) Transcriptome analysis of *Loxocles laeta* (*Araneae, Sicariidae*) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics* 12, 279.
21. Fillingim, R. B., and Gear, R. W. (2004) Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings., *European journal of pain (London, England)* 8, 413-25.
22. Garcia Fajardo, L. E., Martinez Linares, M. P., and González Olaya, H. L. (2010) Inflamación y dolor: Cambios en el sistema nervioso periférico y central, *MedUNAB* 4.
23. Henriksen, G., and Willoch, F. (2008) Imaging of opioid receptors in the central nervous system., *Brain : a journal of neurology* 131, 1171-96.
24. Herrero, M.V. and Gutierrez J.M. (1984) The micronecrotic effect of the venom of *Aphonopelma seemanni* (*Araneae: Theraphosidae*) of Costa Rica in the white mouse. *Rev Biol Trop*, 32(1), 173-5.

25. Herrero, M.V. and Odell G.V. (1988) Characteristics of the venoms and digestive secretions of *Aphonopelma seemanni* and *Sphaerobothria hoffmanni* (Araneae: Theraphosidae) of Costa Rica]. *Rev Biol Trop* 36(2A), 241-6.
26. Isbister, G. (2003) Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines, *Toxicon* 41, 519-524.
27. Jones, R.C., Xu L., and Gebhart G.F. (2005) The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J Neurosci* 25(47), 10981-9.
28. Kamaraju, K., Gottlieb, P. a, Sachs, F., and Sukharev, S. (2010) Effects of GsMTx4 on bacterial mechanosensitive channels in inside-out patches from giant spheroplasts., *Biophysical journal*, Biophysical Society 99, 2870-8.
29. Kauer, J. a, and Gibson, H. E. (2009) Hot flash: TRPV channels in the brain., *Trends in neurosciences* 32, 215-24.
30. Koltzenburg, M., Stucky C.L., and Lewin G.R. (1997) Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol* 78(4), 1841-50.
31. Krieger, E., Joo K., Lee J., Lee J., Raman S., Thompson J., Tyka M., Baker D., and Karplus K. (2009) Improving physical realism, stereochemistry, and side chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* 77(9), 114-22.
32. Kwan, K.Y., and Corey D.P. (2009) Burning cold: involvement of TRPA in noxious cold sensation. *J Gen Physiol* 1(33), 251-256.
33. Lambert C., Leonard N., De Bolle X., and Depiereux E. (2002) ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* 18(9), 1250-1256
34. Leipold, E., DeBie H., Zorn S., Borges A., Olivera B.M., Terlau H., and Heinemann S.H. (2007) muO conotoxins inhibit NaV channels by interfering with their voltage sensors in domain-2. *Channels (Austin)* 1(4), 253-62.
35. Lewin, G.R., and Mendell M., (1994) Regulation of cutaneous C-fiber heat nociceptors by nerve growth factor in the developing rat. *J Neurophysiol* 71, 941-49.
36. Lewin, G.R., and Moshourab R., (2004) Mechanosensation and pain. *J Neurobiol* 61, 30-44.
37. Lewin, G.R., Lu Y., and Park T.J. (2009) A plethora of painful molecules. *Curr Opin Neurobiol* 14, 443-49.

38. Livett, B. G., Sandall, D. W., Keays, D., Down, J., Gayler, K. R., Satkunanathan, N., and Khalil, Z. (2006) Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor., *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 48, 810-29..
39. Malairajan, P., Geetha G., Narasimhan S., and Jessi Kala Veni K. (2006) Analgesic activity of some Indian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 106, 425-8.
40. Malmberg, a B., and Yaksh, T. L. (1994) Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14, 4882-90.
41. Matthews, E.A. and Dickenson A.H. (2001) Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. *Pain* 92(1-2), 235-46.
42. Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gélot, A., Cupo, A., Zimmer, A., Zimmer, A. M., Eschaliier, A., and Lazdunski, M. (2007) A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms., *Nature neuroscience* 10, 943-5.
43. McGivern, J. G. (2007) Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain., *Neuropsychiatric disease and treatment* 3, 69-85.
44. Mense, S., (2009) Algesic agents exciting muscle nociceptors. *Exp Brain Res* 196, 89-100.
45. Milenkovic, N., Wetzel C., Moshourab R., and Lewin G.R. (2008) Speed and temperature dependences of mechanotransduction in afferent fibers recorded from the mouse saphenous nerve. *J Neurophysiol* 100, 2771-83.
46. Nason, D., Phillips D., Saccomano N., and Volkmann R. *Calcium channel blocking polypeptides from theraphosidae Aphonopelma*. Patente: WO/1994/10196; PCT/US93/09069.
47. Norton, R.S. and Pallaghy, P.K. (1998) The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* 36, 1573-83.
48. Oyemitan, I.A., Iwalewa E.O., Akanmu M.A., and Olugbade T.A. (2008) Antinociceptive and antiinflammatory effects of essential oil of *Dennettia tripetala* G.Baker (*annonaceae*) in rodents. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 5, 355-62.
49. Page, A.J., Brierley S.M., Martin C.M., Martinez-Salgado C., Wemmie J.A., Brennan T.J., Symonds E., Omari T., Lewin G.R., Welsh M.J., and Blackshaw L.A. (2004) The ion channel ASIC1 contributes to visceral but not cutaneous

mechanoreceptor function. *Gastroenterology* 127, 1739-47.

50. Park, S. P., Kim, B. M., Koo, J. Y., Cho, H., Lee, C. H., Kim, M., Na, H. S., and Oh, U. (2008) A tarantula spider toxin, GsMTx4, reduces mechanical and neuropathic pain., *Pain* 137, 208-17.
51. Platnick, N., *The world spider catalog V10.0*. American Museum of Natural History, <http://research.amnh.org/oonopidae/catalog> ,(Accesado el 26 de Noviembre de 2009).
52. Premkumar, L. S., and Sikand, P. (2008) TRPV1: a target for next generation analgesics., *Current neuropharmacology* 6, 151-63.
53. Price, M.P., McIlwrath S.L., Xie J., Cheng C., Qiao J., Tarr D.E., Sluka K.A., Brennan T.J., Lewin G.R., and Welsh M.J. (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 2001. 32, 1071-83.
54. Rajendra, W., Armugam, A., and Jeyaseelan, K. (2004) Toxins in anti-nociception and anti-inflammation., *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 44, 1-17.
55. Riedel, W. and Neeck, G. (2001) Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol* 60, 404-15.
56. Redaelli, E., Cassulini, R. R., Silva, D. F., Clement, H., Schiavon, E., Zamudio, F. Z., Odell, G., Arcangeli, A., Clare, J. J., Alagón, A., Vega, R. C. R. de la, Possani, L. D., and Wanke, E. (2010) Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na⁺ and K⁺ ion channels., *The Journal of biological chemistry* 285, 4130-42.
57. Roerig, S. and Howse K., (1996) Omega-agatoxin IVA blocks spinal morphine/clonidine antinociceptive synergism. *Eur J Pharmacol* 314, 293-300.
58. Rush, A.M., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2007) Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 579, 1-14.
59. Rycroft, B.K., Vikman K.S., and Christie M.J. (2007) Inflammation reduces the contribution of N-type calcium channels to primary afferent synaptic transmission onto NK1 receptor-positive lamina I neurons in the rat dorsal horn. *J Physiol* 580, 883-94.
60. Satake, H., Villegas E., Oshiro N., Terada K., Shinada T., and Corzo G. (2004) Rapid and efficient identification of cysteine-rich peptides by random screening of a venom gland cDNA library from the hexathelid spider

Macrothele gigas. *Toxicon* 44, 149-56.

61. Schalle, J., Kampfer U., Schurch S., Kuhn-Nentwig L., Haeberli S., and Nentwig W. (2001) CSTX-9, a toxic peptide from the spider *Cupiennius salei*: amino acid sequence, disulphide bridge pattern and comparison with other spider toxins containing the cystine knot structure. *Cell Mol Life Sci* 58, 1538-45.
62. Schanbacher, F., Lee C.K., Hall J.E., Wilson I.B., Howell D.E., Odell G.V. (1973) Composition and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. *Comp Biochem Physiol* 44, 389-96.
63. Schmalhofer, W. A., Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M. G., Weinglass, A. B., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., Koltzenburg, M., and Priest, B. T. (2008) ProTx-II , a Selective Inhibitor of Na V 1 . 7 Sodium Channels , Blocks Action Potential Propagation in Nociceptors, *Molecular Pharmacology* 74, 1476-1484.
64. Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjork, E., and Handwerker, H. (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15, 333-41.
65. Sherrington, C.S. and Laslett, E.E. (1903) Observations on some spinal reflexes and the interconnection of spinal segments. *J Physiol* 29, 58-96.
66. Smith, E.S. and Lewin, G.R. (2009) Nociceptors: a phylogenetic view. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195, 1089-106.
67. Souza, A.H., Ferreira, J., Cordeiro Mdo. N., Vieira, L.B., De Castro, C.J., Trevisan, G., Reis, H., Souza, I.A., Richardson, M., Prado, M.A., Prado, V.F., and Gomez, M.V. (2008) Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain* 140, 115-26.
68. Spessoto, M.A., Ferreira, D.S., Crotti, A.E., Silva, M.L., and Cunha W.R. (2003) Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine* 10, 606-9.
69. Tanko, Y., Magaji, G.M., Yerima, M., Magaji, R.A., and Mohammed, A. (2008) Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of aqueous leaves extract of *Ocimum gratissimum* (labiate) in rodents. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 5, 141-6.
70. Terlau, H. and Olivera, B.M. (2004) Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological reviews* 84, 41-68.
71. Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., and Campbell, J.N. (1992) Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* 38, 397-421.

72. Vallbo, A.B., and Hagbarth, E. (1968) Mechoreceptor activity recorded from human peripheral nerves. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 25, 407.
73. Villarejo Díaz, M. (2001) Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Rev. Hosp. Met.* 1, 65-97.
74. Wang, X., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M.W., Howden, M.E., Nicholson, G.M., Christie, M.J., and King, G.F. (2000) Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nature structural biology* 7, 505-13.
75. Wang, Y., Wu, J., Lin, Q., Nauta, H., Yue, Y., and Fang, L. (2008) Effects of general anesthetics on visceral pain transmission in the spinal cord. *Molecular pain* 4, 50.
76. Wang, Y.X., Bezprozvannaya, S., Bowersox, S.S., Nadasdi L., Miljanich, G., Mezo, G., Silva, D., Tarczy-Hornoch, K., and Luther, R.R. (1998) Peripheral versus central potencies of N-type voltage-sensitive calcium channel blockers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357, 159-68.
77. Weidner, C., Schmelz, M., Schmidt, R., Hansson, B., Handwerker, H.O., Torebjork, H.E. (1999) Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 50, 10184-90.
78. Wen S., Wilson, D.T., Kuruppu, S., Korsinczy, M.L., Hedrick, J., Pang, L., Szeto, T., Hodgson, W.C., Alewood, P.F. and Nicholson, G.M. (2005) Discovery of an MIT-like atracotoxin family: spider venom peptides that share sequence homology but not pharmacological properties with AVIT family proteins. *Peptides* 26, 2412-26.
79. Wood, D.L.A., Miljenovic, T., Cai, S., Raven, R.J., Kaas, Q., Escoubas, P., Herzig, V., Wilson, D., and King G.F. (2009) ArachnoServer: a database of protein toxins from spiders. *Bmc Genomics* 10, 375
80. Woolf C.J. and Ma Q. (2007) Nociceptors – noxious stimulus detectors. *Neuron* 55, 353-64.
81. Zhan J., Chen, X., Wang, C., Qiu, J., Ma, F., Wang, K., and Zheng, S. (2003) A fusion protein of conotoxin MVIIA and thioredoxin expressed in Escherichia coli has significant analgesic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311, 495-500.
82. Zhang, M.M., Green, B.R., Catlin, P., Fiedler, B., Azam, L., Chadwick, A., Terlau, H., McArthur, J.R., French, R.J., Gulyas, J., Rivier, J.E., Smith, B.J., Norton, R.S., Olivera, B.M., Yoshikami, D., and Bulaj, G. (2007) Structure/function characterization of micro-conotoxin KIIIA, an analgesic, nearly irreversible blocker of mammalian neuronal sodium channels. *J Biol Chem* 282, 30699-706.

83. Zhu, S., Darbon, H., Dyason, K., Verdonck, F., and Tytgat, J. (2003) Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *FASEB J*, 17, 1765-7.

Anexo 1. Purificación del veneno por HPLC de fase reversa.

El veneno de cada especie presenta una huella cromatográfica diferente. Se muestran dos cromatogramas por especie, los cuales representan venenos de muestras obtenidas independientemente.

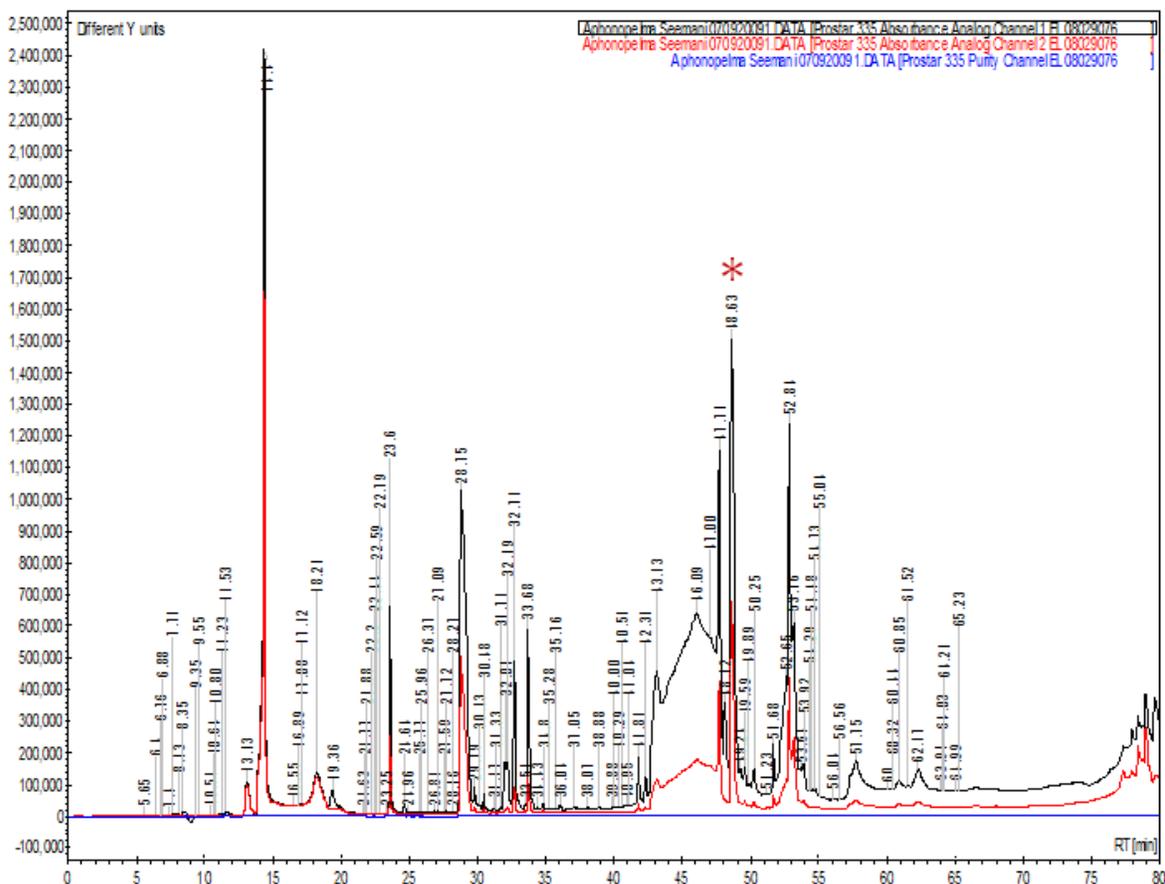


Fig. A. Cromatograma del veneno de *Aphonopelma seemanni* (I). El cromatograma aquí mostrado es muy similar a los demás realizados con el veneno de esta tarántula.

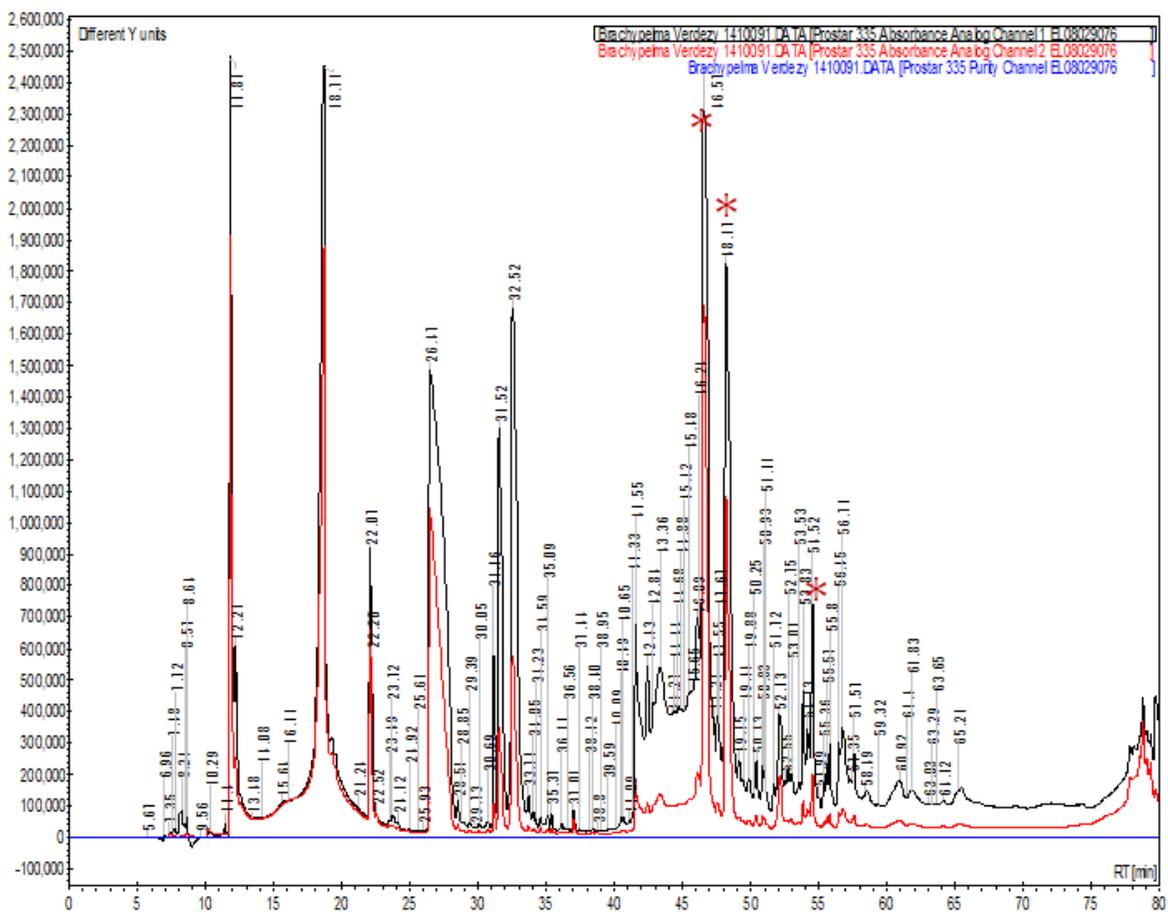


Fig. C. Cromatograma del veneno de *Brachypelma verdezy* (I). Los asteriscos indican los picos correspondientes las fracciones utilizadas posteriormente en la Repurificación, la línea superior indica una lectura a 230 nm, mientras que la inferior una lectura de 280 nm.

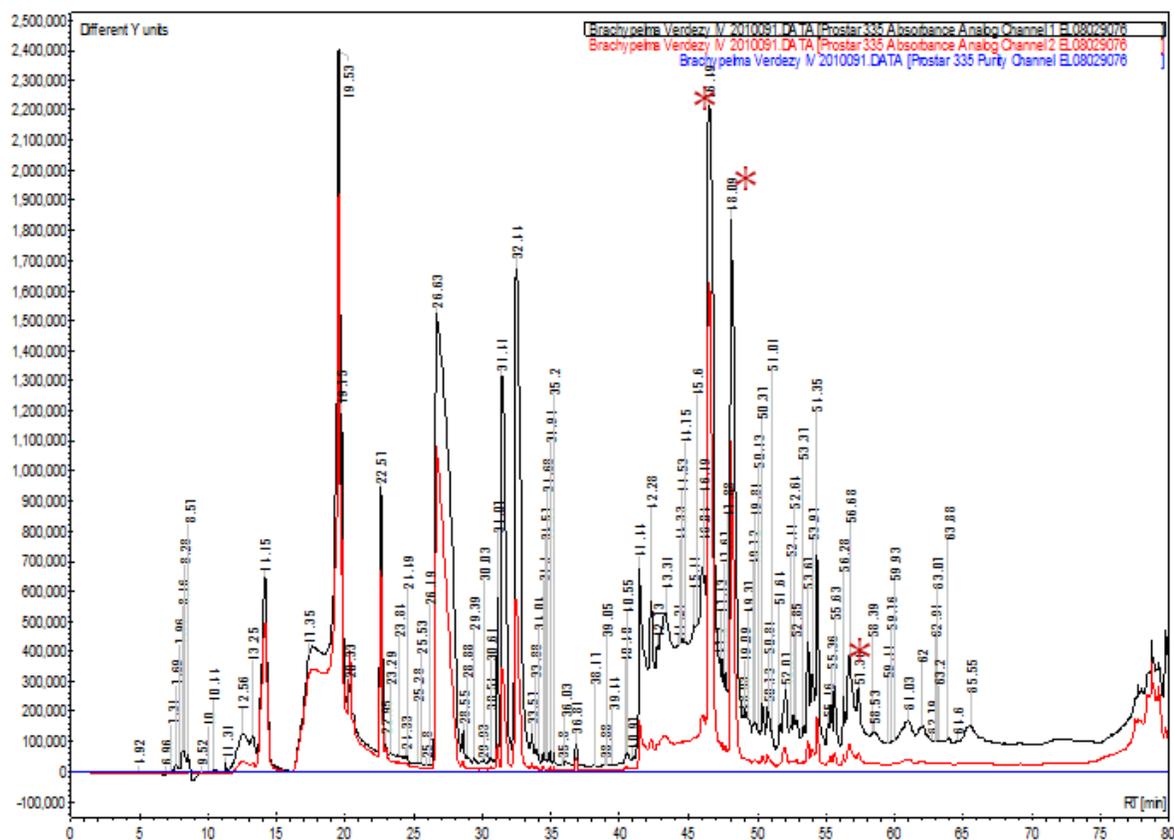


Fig. D. Cromatograma del veneno de *Brachypelma verdezy* (II).

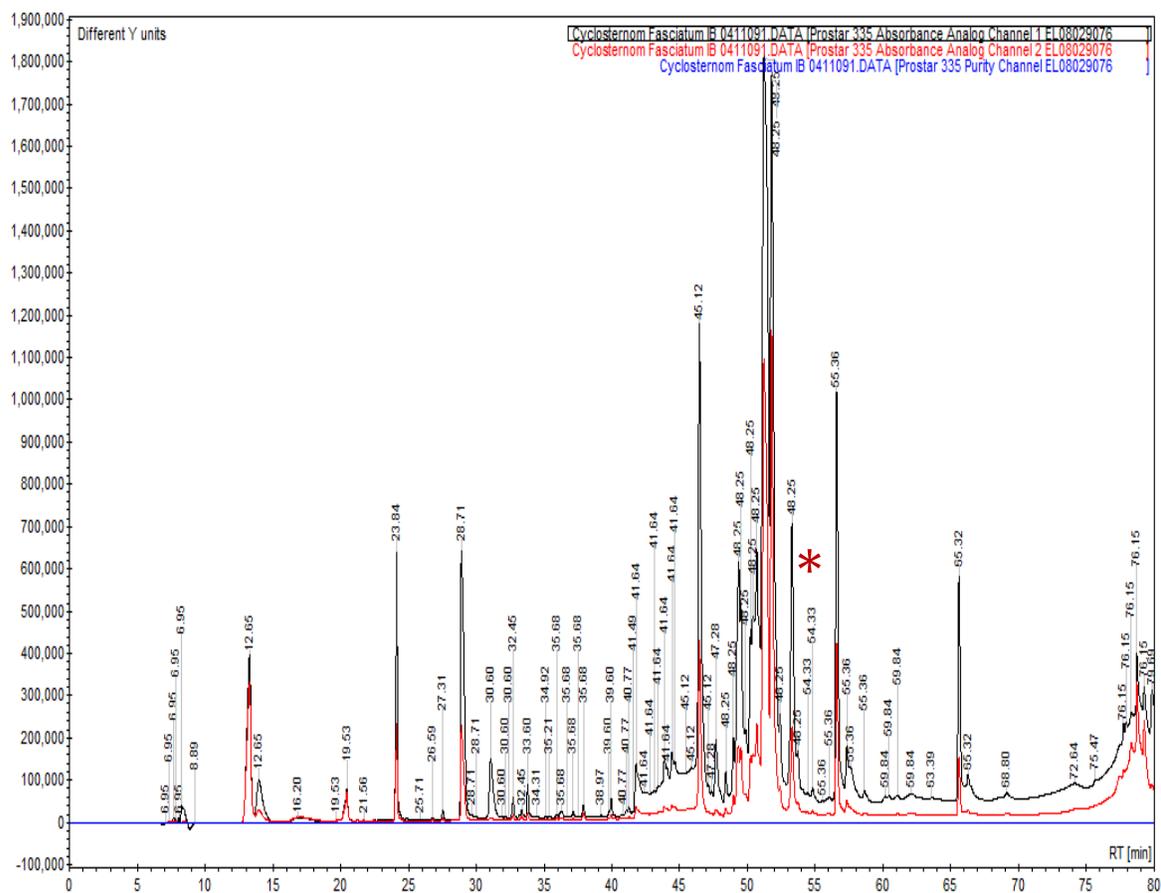


Fig. E. Cromatograma del veneno de *Cyclosternum fasciatum* (I).

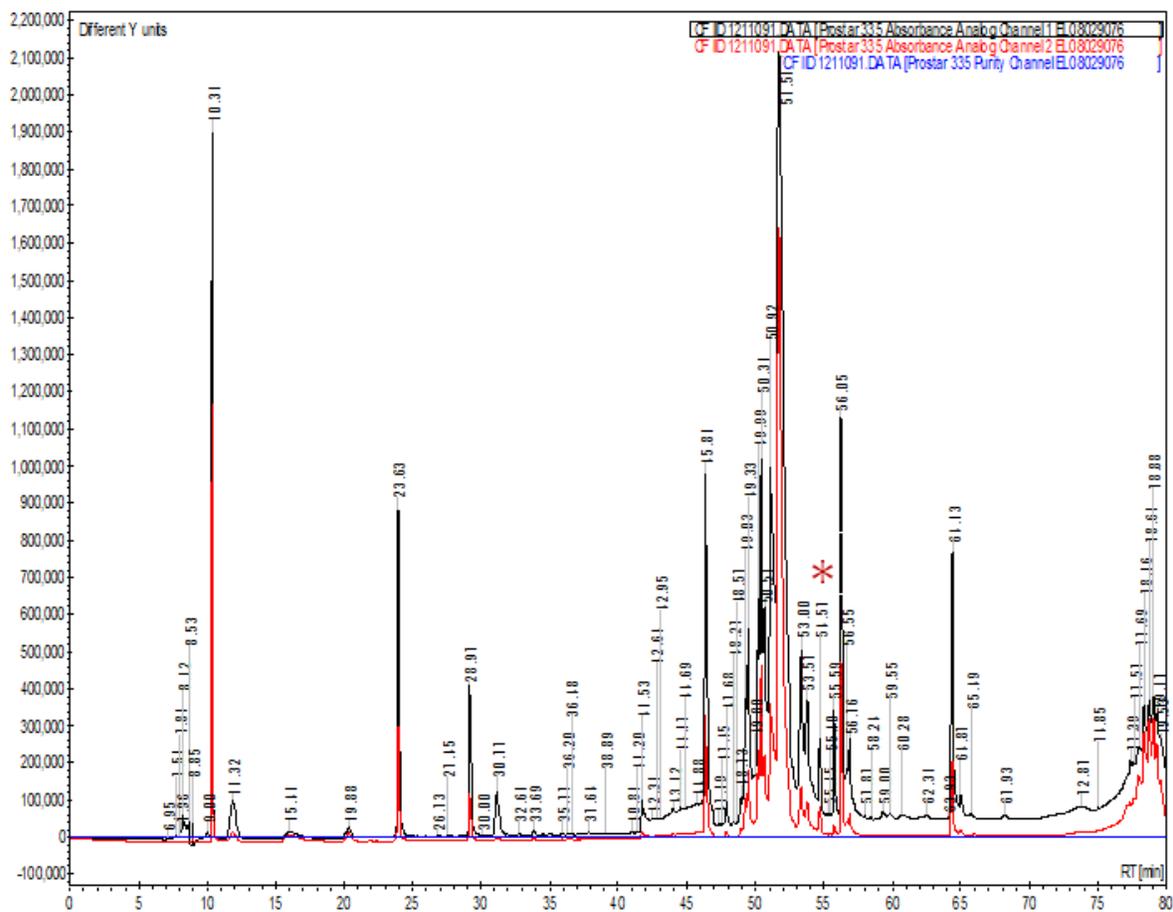


Fig. F. Cromatograma del veneno de *Cyclosternum fasciatum* (II).

Anexo 2. Espectrometría de masas

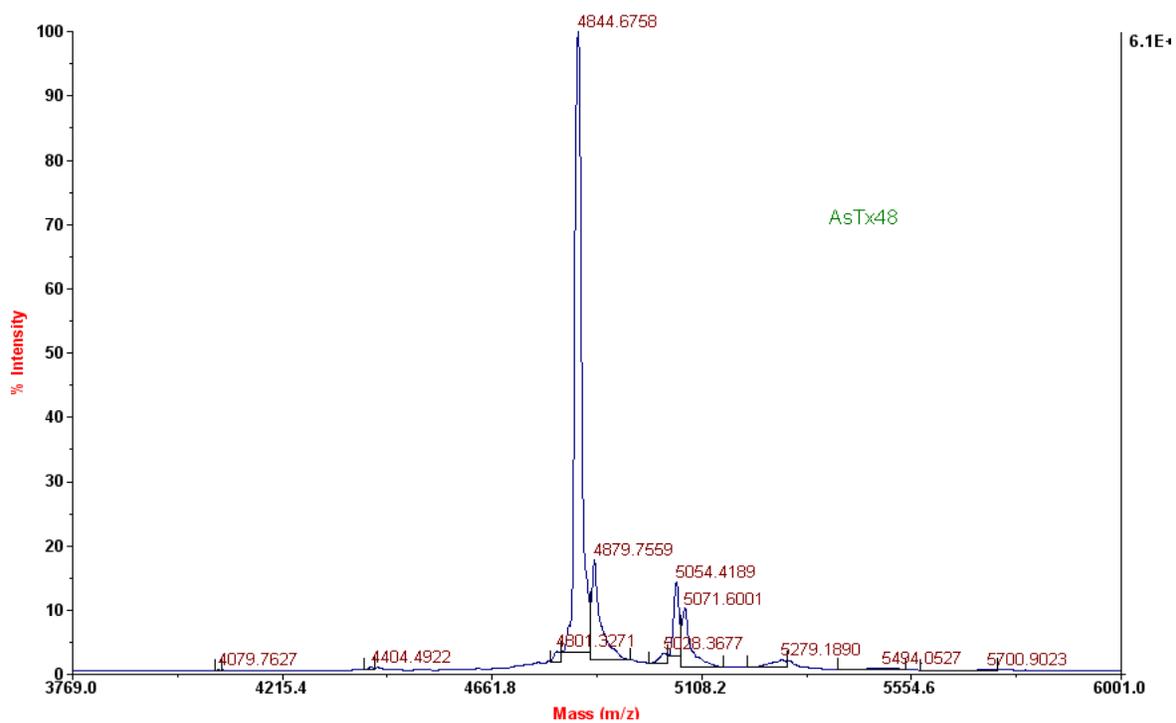


Figura G. Resultados obtenidos por medio de espectrometría de masas para el péptido AsTx48.

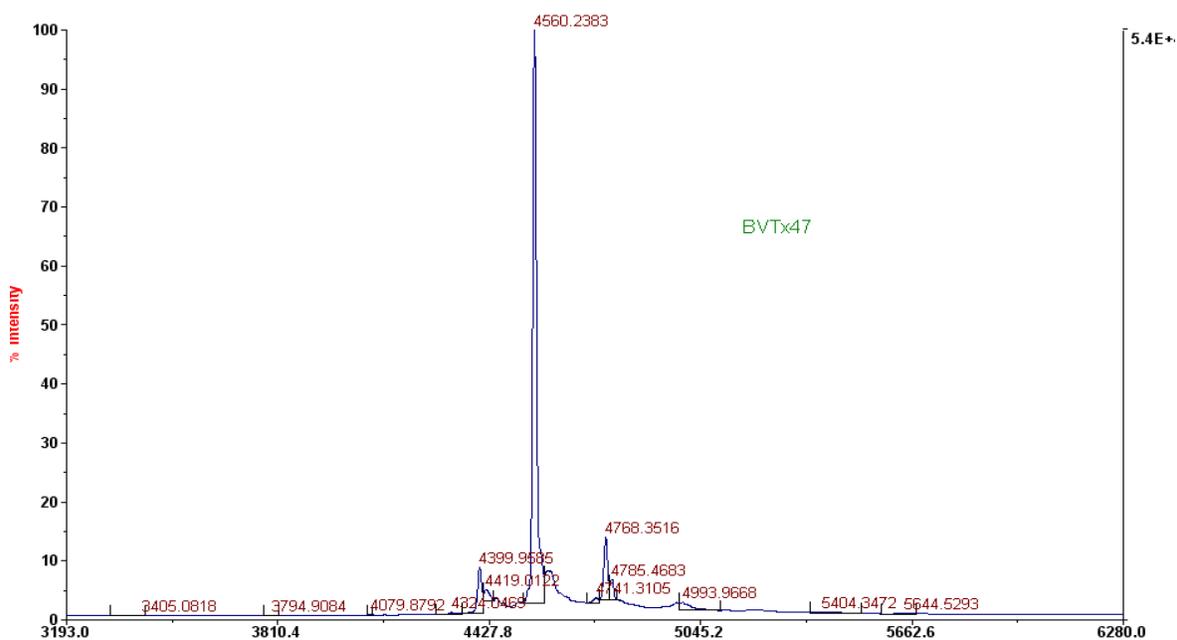


Figura H. Resultados obtenidos por medio de espectrometría de masas para el péptido BvTx47.

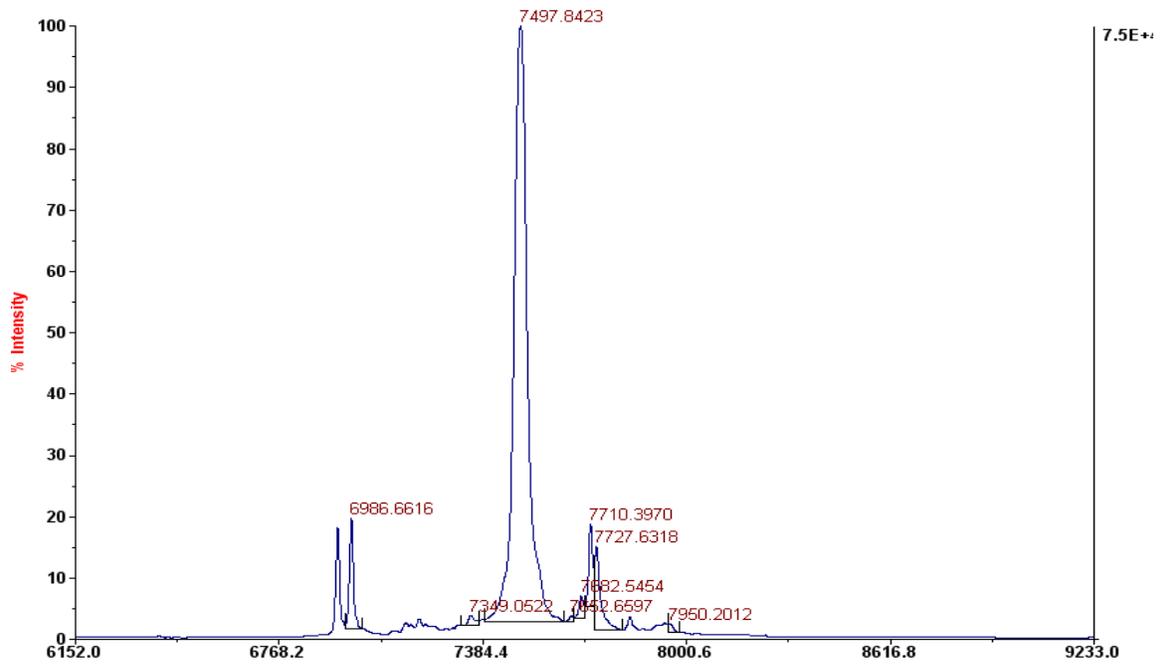


Figura I. Resultados obtenidos por medio de espectrometría de masas para el péptido BvTx55.

Anexo 3. Fracciones repurificadas

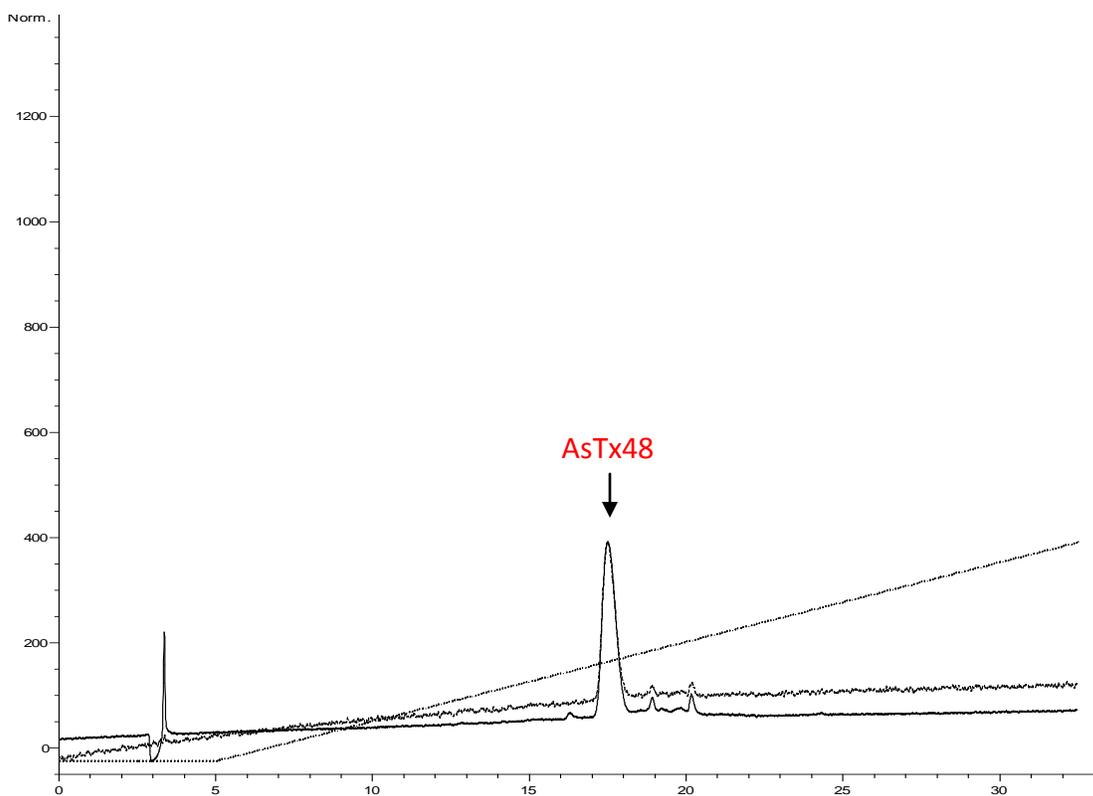


Figura J. Fracción AsTX48 repurificada

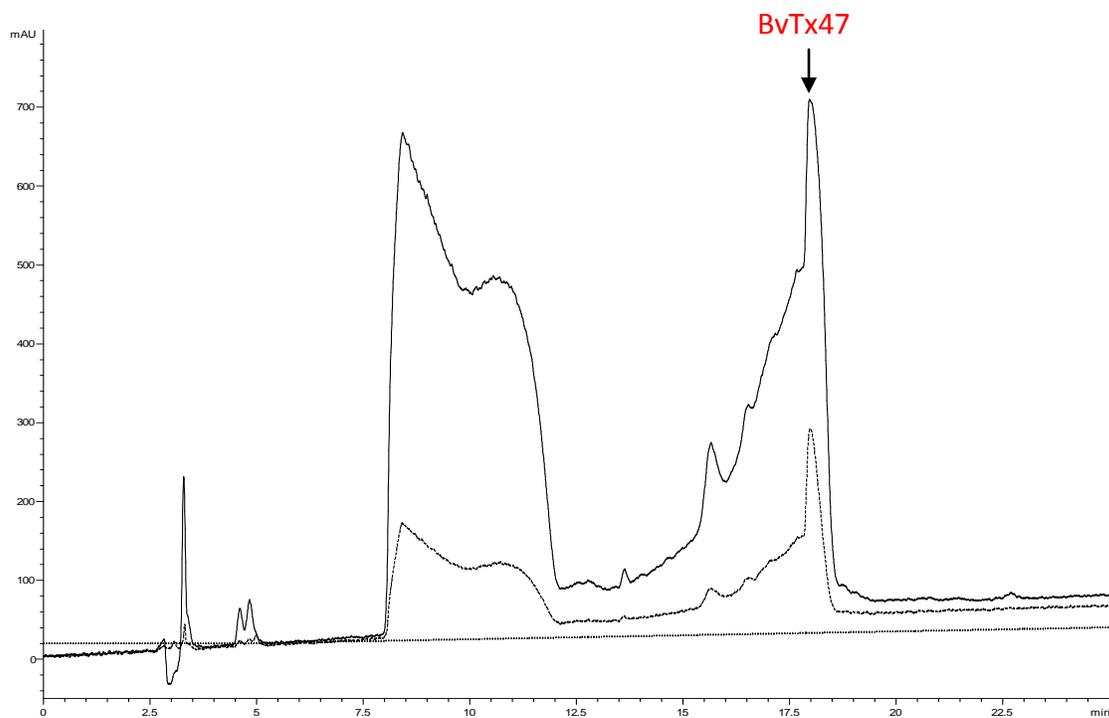


Figura K. Fracción BvTx47 repurificada.

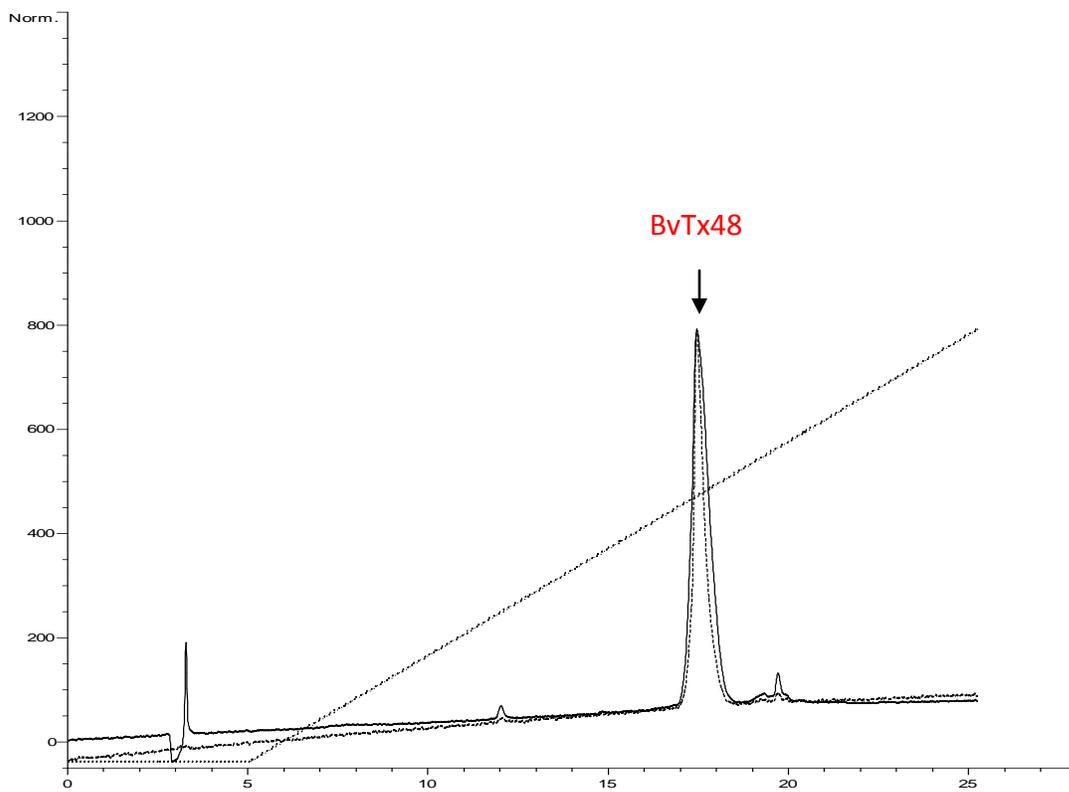


Figura L. Fracción BvTx48 repurificada

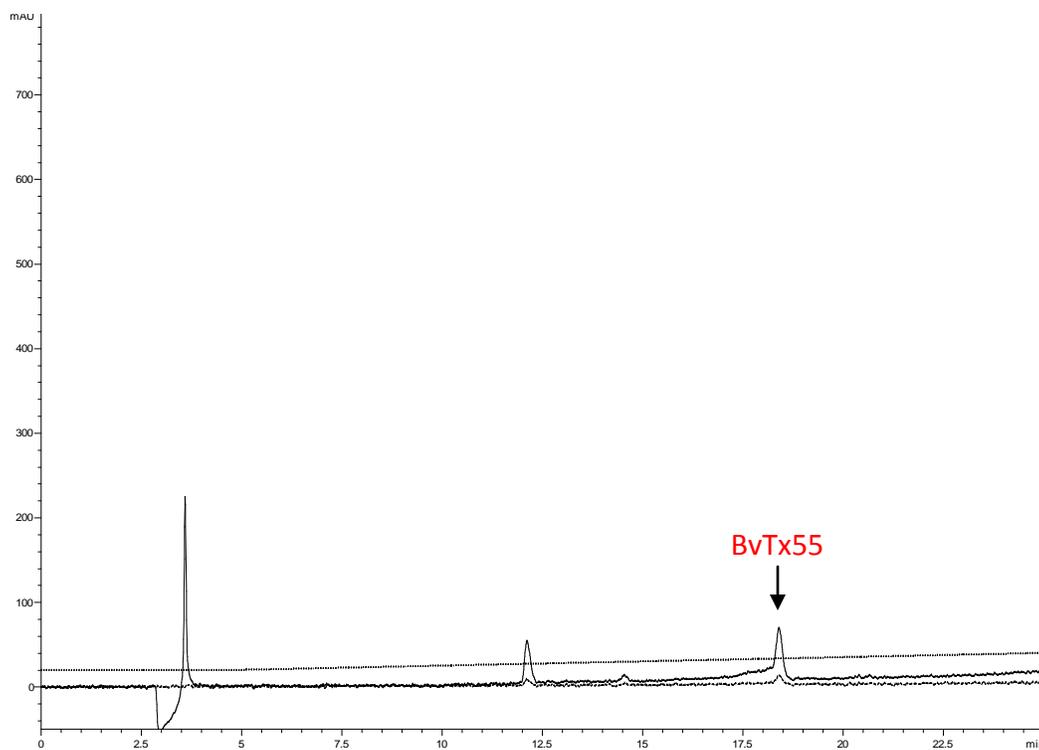


Figura M. Fracción BvTx55 repurificada

Anexo 4. Protocolos utilizados para la realización de bibliotecas de cDNA.

Protocolo 1. Obtención de células electrocompetentes.

- Preparación de células electrocompetentes

Materiales:

2 matraces de 2.8 L.

10 tubos de ensayo chicos para seguir la cinética de crecimiento de las células.

6 botellas de 500 ml para centrifuga, estériles.

Juego de pipetas de 10 mL, estériles.

2 tubos Oak Ridge, estériles.

Probeta de 1 L, estéril.

2 botellas de 1 L estériles para el HEPES 1 mM.

Centrífuga refrigerada Beckman J2-Mi con rotor para botellas de 500 mL (JS-10).

Centrífuga refrigerada con rotor para tubos Oak Ridge (JA-20).

Hielo seco.

Guantes de látex desechables.

Soluciones:

1 L de medio SB separado en volúmenes de 500 ml en cada matraz de 2.8 L.

Esterilizar.

100 mL de glicerol al 10% estéril.

2 L Hepes 1 mM preparado de un stock 100 mM. Autoclavear.

SB:

900 mL H₂O

35 g bacto-tryptona

20 g extracto de levadura

5g NaCl

Mezclar hasta disolver

pH 7.5 con NaOH 5N

H₂O hasta 1 L

HEPES 100 mM:

2.3 g HEPES

90 ml H₂O"

pH 7.0 con NaOH 5N

H₂O hasta 100 ml

Esterilizar.

Procedimiento:

- Inocular una colonia o 20 μ L de células del vial de glicerol en 20 ml de medio más antibiótico (en el caso de XL1-Blue, LB/Tc 20 μ g/ml). Incubar ON a 37 C, 250 rpm. Tomar en un tubo de ensayo chico 2 ml de SB como control.
- Inocular 5 ml del ON en cada matraz de 2.8 L con 500 ml de SB.
- Incubar a 37°C, 250 rpm hasta alcanzar una OD600nm de 0.5-0.6. Se deben realizar lecturas cada 30 min después de las 2 horas de puesto el cultivo.
- Enfriar todo el material y las soluciones que se vayan a utilizar. Enfriar las centrífugas.
- Una vez alcanzado el valor de OD, enfriar los matraces por 15 min en hielo agitando.
- A partir de este paso se debe trabajar a 4°C (cuarto frío) y lo más rápido posible.
- Transferir el cultivo a las 6 botellas de 500 mL.
- Centrifugar por 15 min, 3300 rpm, 4°C, máx. aceleración y desaceleración.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet con cuidado en 150 mL de HEPES 1 mM por botella (900 ml totales).
- Distribuir las células resuspendidas en 4 botellas.
- Centrifugar por 15 min, 4500 rpm, 4°C, máx. aceleración y desaceleración.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet con cuidado en 100 mL de HEPES 1 mM por botella (400 ml totales).
- Distribuir las células resuspendidas en 2 botellas.
- Centrifugar por 15 min, 4500 rpm, 4°C, máx. aceleración y desaceleración.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet con cuidado en 20 mL de glicerol al 10%.

- Transferir las células a un tubo Oak Ridge y centrifugar por 15 min, 4500 rpm, 4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet con cuidado en 1.2 mL de glicerol al 10%.
- Transferir alícuotas de 110 µL a tubos eppendorf de 1.5 mL pre-enfriados en hielo seco. Dejar una de las alícuotas en hielo para determinar la eficiencia de electroporación de las células
- Guardar a -70°C.
- Electroporar 100 µL de células con 10 µL pUC18 (1 ng/µL) como control de electroporación y platearlas en una dilución de 1:1000 y 1:10000.

Anexo 5. Preparación de medio SOC.

Para la preparación de un litro de medio SOC:

5. 20 g de triptona.
6. 5 g de extracto de levadura.
7. 0.5 g de NaCl.
8. 10 ml de KCl 250 mM

A esto se agregan 950 ml de agua destilada, el pH se ajusta a 7.0 con NaOH y se esteriliza en autoclave, una vez fuera y frío se agregan 10 ml de MgCl₂ 1M y 10 mL de una solución de glucosa 2M (estéril).

Anexo 6. Oligonucleótidos utilizados para la búsqueda de los RNA mensajeros en las librerías

Para llevar a cabo esta sección se requirió de uso de un primer reverse único usado en todos los casos (CDS III/3') y un oligonucleótido único para cada uno de los péptidos, construidos a partir de las secuencias

BV48F

GTT CTG GAA GGA AAC GTT

T_m: 60.67 °C

Tm (2): 52 °C

BV55F

GCT TGY CAA NNN GCT GAA GCT

Tm: 68.1 °C

Tm (2): 65.98 °C

BV55FW1

GCH TGY TCY AAR CAG GTH GGA GAA

Tm: 67.33 °C

Tm (2): 71.00 °C

BV55FW2

GCH TGY AGC AAR CAG GTH GGA GAA

Tm: 68.04 °C

Tm (2): 72.00 °C

ADAP3

GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGT TTT TTT TTT TTT

Tm: 70.14 °C

Tm (2): 131.00 °C

INNER

CGC GAA TCC GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG

Tm: 70.03 °C

Tm (2): 92.00 °C

OUTER

GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA CT

Tm: 65.11 °C

Tm (2): 66.00 °C

Oligonucleótidos utilizados para secuenciación.

T7 PRIMER

TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

M13 FORWARD (KIT TOPO TA CLONING)

GTA AAA CGA CGG CCA G

M13 REVERSE

TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC

Anexo 7. Protocolo de realización de bibliotecas de cDNA

7.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA

Se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo de 1.5 mL estéril: 1) 3µL de la muestra de RNA obtenida de las glándulas de veneno de cada una de las tarántulas, siendo la concentración mínima de 0.5 µg totales y sin una cantidad máxima establecida. 2) 1µL del oligonucleótido SMART IV (Clontech). 3) 1µL del oligonucleótido CDS III/3' (Clontech).

Estos se mezclaron en una centrífuga y se puso en incubación durante dos minutos a 72 °C, tras los cuales se puso a enfriar el tubo en hielo por otros dos minutos.

Una vez hecho esto se añadieron los siguientes reactivos: 1) 2 µL de buffer de primera cadena 5X (Clontech). 2) 1 µL de DTT (20 mM) (Clontech). 3) 1 µL de una mezcla de dNTP's (10 mM). 4) 1 µL de transcriptasa reversa SMART Scribe™ MMLV.

Tras mezclar todos los componentes presentes en el tubo se incubó la mezcla 42°C durante una hora. Pasada la hora de incubación el tubo se guardó a -20 °C.

7.2 Amplificación de cDNA por LD PCR

Para la amplificación por LD PCR se mezclaron los siguientes reactivos: 1) 2 µL de cDNA de primera cadena, 80 µL de agua desionizada, 10 µL de buffer para PCR *Advantage 2* 10X (Clontech), 2 µL de dNTP's 50 X (Clontech), 2 µL Oligonucleótido 5' PCR (Clontech), 2 µL Oligonucleótido CDS III/3' PCR (Clontech), 2 µL Mezcla de DNA polimerasa *Advantage 2* 50X (Clontech).

Dependiendo del número de muestras primero se llevaba a cabo una mezcla con todos los componentes a excepción del cDNA de primera cadena. Con esta amplificación por LD PCR se utilizó el mayor número de ciclos recomendado en el kit a pesar de no ajustar con los datos presentes en el manual del kit utilizando 26 ciclos del siguiente programa en el termociclador: 95°C por un minuto y 26 ciclos: 95°C por 15 segundos, 68°C por 6 minutos y un holding final de 4°C.

Una vez completados los ciclos en el termociclador se analizó el resultado llevando a cabo una cuantificación tanto espectrofotométrica en el nanodrop (Nanodrop™, modelo ND1000 a una longitud de onda de 260 nm), como separando la muestra en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, tras el cual se debía de observar una mancha luminosa de material genético entre los 0.1 y 4 kb con algunas bandas más definidas que indican los pesos de los mensajeros más abundantes en la célula.

7.3 Purificación de producto de PCR por sistema de columnas.

Al tubo que contenía el total del producto de PCR se agregaron 150 µL de binding buffer (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) y 75 µL de isopropanol, agitándose fuertemente y colocándose en un tubo con un filtro de alta pureza el cual se encontraba conectado a un tubo colector. Dicho tubo se centrifugó a 13,400 rpm por 75 segundos descartándose el contenido del tubo colector. Se depositaron 250 µL de buffer de lavado (High Pure PCR Product Purification Kit,

Roche) en el tubo con el filtro y se centrifugó por 75 segundos a 13,400 rpm descartándose posteriormente el contenido del tubo colector. Se hizo un lavado extra del tubo con filtro pero ahora con un volumen de 200 μ L de buffer de lavado. La elución del DNA se llevo a cabo con un volumen de 80 μ L de agua estéril tetradestilada y centrifugándose por 75 segundos a 13,400 rpm este paso se repitió 3 veces guardándose el tubo colector con los 80 μ L eluidos a -20°C.

7.4 Digestión con la enzima de restricción Sfil

El total del material genético purificado por el paso anterior se utilizó para digerirlo con la enzima Sfil, mezclando los siguientes reactivos: 79 μ L de cDNA purificado, 10 μ L de buffer de enzima Sfil 10X (Clontech), 10 μ L de enzima Sfil y 1 μ L de BSA 100X.

Una vez mezclado se incubó a 50°C durante dos horas, tras la cuales se guardó la reacción a -20°C.

7.5 Fraccionamiento del cDNA por tamaño.

Para llevar a cabo el fraccionamiento se preparó una columna CHROMA-SPIN 400. La columna se invirtió varias veces hasta resuspender completamente la matriz. Una vez resuspendida la matriz y removidas todas las burbujas la columna se colocó en un soporte universal y se dejo gotear el buffer de almacenamiento que contenía la columna, con un flujo de una gota cada 40 a 60 segundos. Una vez drenado todo el buffer de almacenamiento se agregaron 700 μ L de buffer de columna, el cual también se dejó drenar. Una vez que se terminó de drenar se agregaron 100 μ L que contienen la muestra digerida con Sfil y dos μ L de xilencianol al 1%, una vez absorbidos en la columna se agregaron otros 100 μ L de buffer de columna con los que se lavo el tubo que contenía la reacción de digestión. Después de que el resto de la muestra se absorbiera completamente se agregaron otros 600 μ L de buffer de columna, unas vez colocados se empezaron a colectar todas las gotas posibles hasta que drenó el total del buffer de columna (entre 15 y 16 gotas colectadas). Se tomó una alícuota de 3 μ L de cada una de las gotas y se llevó a cabo una corrida en un gel de agarosa 1% para observar donde

se concentra la mayor cantidad de material genético con los mejores tamaños (entre 500 pb y 1 kb o más). Una vez seleccionados los tubos con el mejor contenido de DNA, este se precipitó agregando los siguientes reactivos: 0.1 volúmenes de acetato de sodio (3 M a pH de 4.8), 1.3 μL de glucógeno y 2.5 volúmenes de etanol al 95% (-20°C).

Una vez bien mezclado se puso en incubación el tubo a -20°C durante toda la noche para obtener la mayor cantidad de DNA posible. Al día siguiente se tomó la muestra y se centrifugó a 13,400 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se dejó secando al aire en un periodo de 10 a 15 minutos, resuspendiendo finalmente la muestra en un volumen de 7 μL de agua desionizada y guardándolo a -20°C.

7.6 Ligación del cDNA de doble cadena y el vector pDNR-LIB

Para este paso se mezclaron los siguientes reactivos: 1 μL de cDNA, 1 μL de pDNR-LIB (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0.5 μL de buffer de ligación 10X (Clontech), 1 μL de ATP (10 mM), 0.5 μL de T4 DNA ligasa y 1.5 μL de agua desionizada.

Esta mezcla se dejó incubando toda la noche a 16°C. Al día siguiente se llevó a cabo la precipitación de DNA agregando 95 μL de agua estéril DEPC, 1.5 μL de glucógeno y 280 μL de etanol al 95%, una vez mezclado se dejó incubar a -70°C durante toda la noche. Se tomó el tubo y se centrifugó a 134,00 rpm por 20 minutos, tras lo cual se retiró el sobrenadante y se dejó secar la muestra por entre 10 y 15 minutos, resuspendiendo el precipitado resultante en un volumen de 5 μL de agua DEPC.

7.7 Transformación usando células DH5 α

Se utilizó una alícuota de 100 μL de células DH5 α electrocompetentes (ver anexo 4) y todo el volumen contenido en la muestra que se ligo (5.5 μL), esta mezcla se depositó en celdillas de electroporación de 1 mm pre-enfriada en hielo, con la cual se electroporó por medio de un choque eléctrico de 1,800 mV. Inmediatamente las células se pusieron en agitación por una hora y a 37°C con medio SOC de

recuperación (ver anexo 5). Tras transcurrir una hora en el medio de recuperación se tomaron alícuotas de 10, 50 y 100 μL con las cuales se sembró de manera uniforme en placas de agar con medio LB y cloramfenicol a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dejando en incubación a 37°C durante toda la noche y contando todas las colonias obtenidas por caja al día siguiente.

7.8 Reacciones de PCR de colonia

Se seleccionaron al azar 400 colonias obtenidas tras la transformación de las células DH5 α por cada una de las bibliotecas construidas, las cuales se analizaron por medio de reacciones de PCR de colonia para poder determinar el tamaño del inserto presente en cada una de las clonas revisadas. Para poder llevar a cabo el PCR de colonia, primero se pico una colonia aislada y la cantidad de células obtenidas se resuspendió en 5 μL de agua tetradestilada, para posteriormente tomar un μL y mezclarlo con los siguientes reactivos (cantidad por reacción individual, se preparó una mezcla suficiente para 20 reacciones): 4.08 μL de agua tetradestilada estéril, 0.5 μL de buffer para PCR (Roche), 0.2 μL de dNTP's (10 mM), 0.1 μL Oligonucleótido Fw M13, 0.1 μL Oligonucleótido Rev M13 y 0.02 μL Taq polimerasa (Roche).

Una vez mezclados todos los componentes se utilizó el siguiente programa en el termociclador: Tiempos pre-PCR; 94°C por 4 minutos, 45°C por 3 minutos y 72°C por 1 minuto 30 segundos. Treinta y dos ciclos; 94°C por 50 segundos, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Tiempos finales; 72°C por 7 minutos y 4°C por tiempo indefinido

Después de completada la reacción se tomó todo el volumen y se mezcló con 5 μL de buffer de carga para gel de DNA y se corrió un gel de agarosa al 1% por 20 minutos, para posteriormente observar las bandas obtenidas en el transiluminador de luz UV. Todas aquellas colonias que mostraron un inserto mayor a 500 pb, con los 4 μL de células suspendidas en agua se dejaron crecer durante toda la noche en 3 mL de medio LB con cloramfenicol a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para al día siguiente llevar a cabo la extracción de plásmido.

7.9 Extracción de plásmido

Para la extracción de plásmido se utilizó el kit de purificación de Roche “*High pure plasmid isolation kit*”. Al finalizar el protocolo se prepararon reacciones de PCR para mandar a la unidad de secuenciación, utilizándose los siguientes reactivos: 15 µL de plásmido y µL de oligonucleótido T7 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'). Se cuantificó el resto de las muestras y se guardaron en a -20°C.

Anexo 8. Obtención de secuencias por medio de RACE-PCR.

El procedimiento de Race-PCR inicia con una retrotranscripción del material genético de la araña utilizando el siguiente procedimiento: 10 µL RNA de glándula de veneno de araña y 2 µL del oligonucleótido ADAP3.

Estos se mezclaron y se incubaron por 10 minutos a 70°C, dejándose reposar la mezcla un minuto en hielo para agregar lo siguiente: 2 µL de buffer de PCR, 2 µL de DTT 20 mM, 2 µL de una mezcla de desoxirribonucleotidos 10 mM y 2 µL de MgCl₂ 25 mM.

Se incubó esta mezcla por 5 minutos a 42°C y posteriormente se agregó 1 µL de retrotranscriptasa. Al ser agregada la retrotranscriptasa se dejó incubando toda la mezcla por 50 minutos a 42°C.

Al terminar la anterior incubación, se preparó una primera reacción de PCR con los siguientes reactivos: 5 µL Buffer de PCR 10X, 3.5 µL de una mezcla de desoxirribonucleotidos, 1.5 µL Oligonucleótido “Outer”, 1.5 µL Oligonucleótido “xFW”*, 1 µL desoxirribonucleotidos, 1 µL Taq polimerasa y 36.5 µL de agua.

* Nota: El oligonucleótido utilizado tiene un nombre particular dependiendo de la secuencia que se busca y una secuencia distinta (Anexo 7).

La mezcla de reacción se utilizó con el siguiente programa en el termociclador: Tiempos pre-PCR; 94°C por 15 segundos, 50°C por 1 minuto 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Treinta ciclos; 94°C por 15 segundos, 53°C por 30 segundos,

72°C por 30 segundos. Tiempos finales; 72°C por 7 minutos y 4°C por tiempo indefinido.

Finalizada la primera reacción de PCR se llevó a cabo la segunda reacción de PCR, para el cual se utilizaron las siguientes condiciones: 5 µL Buffer de PCR 10X, 3.5 µL de una mezcla de desoxirribonucleotidos, 1.5 µL Oligonucleótido “Inner”, 1.5 µL Oligonucleótido “xFW”*, 1 µL desoxirribonucleotidos, 1 µL Taq polimerasa y 36.5 µL de agua.

* Nota: El oligonucleótido utilizado tiene un nombre particular dependiendo de la secuencia que se busca y una secuencia distinta (Anexo 7).

La mezcla de reacción se utilizó con el siguiente programa en el termociclador: Tiempos pre-PCR; 94°C por 15 segundos, 50°C por 1 minuto 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Treinta ciclos; 94°C por 15 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Tiempos finales; 72°C por 7 minutos, 4°C por tiempo indefinido.

Al terminar la segunda reacción de PCR se tomaron 3 µL muestra para observarla en un gel de agarosa 1.5% para comprobar la existencia de bandas enriquecidas en el peso molecular esperado.

El material genético enriquecido y obtenido con estas dos reacciones de PCR se clono en el vector TOPO 2.1 siguiendo las instrucciones del proveedor (Anexo 7).

Para la extracción de plásmido se utilizó el kit de purificación de Roche “*High pure plasmid isolation kit*”. Al finalizar el protocolo se prepararon reacciones de PCR para mandar a la unidad de secuenciación, utilizándose los siguientes reactivos: 15 µL de plásmido y 1 µL de oligonucleótido M13 Forward (5'- GTA AAA CGA CGG CCA G -3').

Se cuantificó el resto de las muestras y se guardaron en a -20°C.