



6
2ej

Universidad Nacional Autónoma de México

"PURIFICACION Y MARCAJE DE TOXINAS DEL ALACRAM Centruroides
noxius PARA EL ESTUDIO DE CANALES IONICOS DE MEMBRANAS
EXCITABLES."

T E S I S

Que para obtener el título de
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

p r e s e n t a

GILDA MARIA VILLARREAL MOLINA

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E .

INTRODUCCION

I. Antecedentes históricos de los estudios sobre los venenos de alacrán.....	1
II. Caracterización estructural del veneno del alacrán <u>Centruroides noxius</u>	4
III. Papel de los canales de sodio y de potasio en la excitabilidad celular.....	8
IV. Neurotoxinas que actúan en canales de sodio dependientes de voltaje en membranas excitables	10
V. Canales de potasio. Neurotoxinas que los afectan	16
VI. Movilidad de los canales iónicos membranales	22
OBJETIVOS.....	26

MATERIAL Y METODOS

I. Purificación de las toxinas del veneno total de <u>Centruroides noxius</u>	27
II. Conjugación de ferritina al anticuerpo monoclonal BNTX-4.....	29
III. Preparación de resina de afinidad con NTX y purificación del complejo anticuerpo monoclonal BNTX-4-ferritina.....	30
IV. Preparación del tejido de la corteza cerebral de rata para su observación al microscopio electrónico.....	31
V. Preparación de los sinaptosomas cerebrales de ratón para su observación al microscopio electrónico.....	31
VI. Obtención de sinaptosomas cerebrales de rata para los experimentos de unión.....	32
VII. Tinciones y preparación del material biológico para su observación al microscopio electrónico.....	33
VIII. Obtención de toxinas marcadas con cromóforos fluorescentes.....	33
IX. Marcado de las toxinas NTX y Gamma con 125I.....	35
X. Geles de isoelectroenfoque.....	36
XI. Experimentos para verificar la actividad de las toxinas modificadas: ensayos de unión.....	38
XII. Experimentos de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo.....	39

RESULTADOS

I. Purificación de péptidos del alacrán <u>Centruroides noxius</u> , bloqueadores específicos del canal de K ⁺ (fracción II-11, NTX o noxiustoxina) y de Na ⁺ (II-9.2.2 y II-10).....	43
a) Separaciones iniciales del veneno soluble.....	43

b) Purificación de la toxina II-9.2.2.....	47
c) Purificación de la toxina II-10.....	53
d) Purificación de NTX.....	55
II. Marcaje del anticuerpo BNTX-4 con ferritina para estudios de microscopia electrónica.....	58
III. Cromatografías de los derivados fluorescentes de las toxinas NTX, II-9.2.2 y II-10.....	59
IV. Espectroscopia de barrido de los derivados fluorescentes de las toxinas II-9.2.2, II-10 y NTX.....	70
V. Enfoque isoelectrico de NTX-RI y NTX-RII.....	70
VI. Desplazamientos de las toxinas derivatizadas.....	74
VII. Radiomarcado de la noxiustoxina.....	75
VIII. Experimentos de fotoblanqueo.....	80
DISCUSION.....	83
RESUMEN.....	94
BIBLIOGRAFIA.....	95
LISTA DE ABREVIATURAS.....	101

INTRODUCCION.

I. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LOS ESTUDIOS SOBRE LOS VENENOS DE ALACRAN.

Los primeros estudios sobre el veneno de los alacranes surgieron a raíz del problema que se presentaba en algunas poblaciones de México, Centroamérica, Africa del norte y en el Oriente Medio. Los individuos intoxicados presentan: hiperexcitabilidad, salivación, disnea, convulsiones, parálisis y muerte. Los venenos y toxinas de alacranes causan secreción de neurotransmisores, arritmias en corazón, disparos repetitivos y despolarización de neuronas, y muchos otros efectos (37, 44, 65).

En el siglo XVI, en la Nueva España, Francisco Hernández (28), hace referencia a algunas plantas que los nativos utilizaban para aliviar los síntomas de las picaduras producidas por los alacranes. Entre éstas se encontraban: ichcaxihuitl (algodón), aocoxochitl (flor de pino del agua), hoitziloxitlanethina (o árbol que mana resina), etc..

En el siglo XVIII, el ayuntamiento de la ciudad de Durango hace un llamado a los vecinos en la "Gazeta de México", en mayo de 1785, para contribuir con "dos, cuatro u ocho reales al mes para que los muchachos que los coxan se les pague medio real de cada

docena, que deberán matarse a presencia del Sindico Procurador, para por este medio poder disminuir los respectivos daños que se padecen desde fines de este mes hasta el octubre."... El zelo del presente Gobierno, empleado en promover las felicidades del Público, a más de proporcionarle cuantos auxilios penden de su arbitrio se ha ofrecido a contribuir con lo que falte para pagar los Alacranes que se maten, prometiendo también de su sueldo el premio de 500 ps. al que descubra algún secreto con que se logre extinguir tan malignos insectos."

Dos meses después, el 12 de julio de 1785, la "Gazeta de México" publica un "secreto" que dice:

"Secreto para matar los alacranes. Se tomará una parte de raspadura o rasura de cuerno de Ciervo, otra igual de Fresno, y otra de Azufre, y se mezclarán."

"Se pondrá un brasero con lumbre bien encendida en cada pieza de las que tenga la casa, y en cada uno se echará de dicha mixtura la cantidad que se quisiere para llenar de humo toda la casa y mueran los Alacranes."(38).

La cantidad de veneno dada por una picadura que puede provocar un cuadro clínico dramático es muy pequeña. El veneno debe tener componentes muy activos. Por lo tanto, es de mucho interés el estudio sistematizado de los venenos de estos arácnidos, y de los efectos fisiopatológicos que producen en los organismos afectados.

En 1899 Altamirano (2), y en 1923 Ocaranza (41), publican los

primeros reportes científicos sobre los efectos tóxicos de alacranes mexicanos.

En 1944, Efrén del Pozo y su grupo, empiezan a caracterizar los efectos tóxicos de los venenos de algunos alacranes mexicanos (Centruroides suffusus suffusus, C. limpidus limpidus, C. limpidus tecomanus, y C. noxius). Este último es considerado como el más venenoso de los alacranes mexicanos. Después, estos investigadores comienzan a identificar los mecanismos mediante los cuales se producen los efectos sobre el sistema respiratorio, vasomotor, músculo estriado (fibrilación, contracción, etc.) así como su relación con la innervación periférica y/o central (50, 51, 52, 53).

En 1948, Del Pozo sugiere que la purificación de los componentes de estos venenos sería muy deseable para dilucidar su modo de acción (51).

Estudiando alacranes norafricanos (de la familia Buthidae), el grupo de Miranda, en Europa, en 1958, proporciona datos muy importantes para la purificación de los componentes tóxicos de los venenos de alacrán. Reportan que las toxinas son de bajo peso molecular, solubles en agua, y que sometidos a electroforesis a pH 8.6 migran hacia el cátodo (39).

En México, desde 1977 el grupo de Possani ha publicado una serie de artículos en los que caracteriza bioquímicamente al veneno de alacranes del género *Tytilus* (Brasil) y *Centruroides*.

(México) (21, 44, 45, 46, 47, 48).

Puede afirmarse que a medida que se obtengan una mayor cantidad de información sobre estos compuestos, podrán usarse mejor como herramientas en estudios de Biología Celular y Neurobiología.

II. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS TOXINAS DEL VENENO DEL ALACRAN Centruroides noxius (26, 44, 45).

La letalidad de las toxinas se determina por inyección intraperitoneal en ratones albinos. Para venenos de alacranes latinoamericanos la dosis letal media (DL50) varía entre 0.25 y 1.35 ug/g de peso corporal. La DL50 de C. noxius es de 0.26 ug/g (45).

El veneno obtenido por estimulación eléctrica del telson de los alacranes contiene de 30 a 50% de material higroscópico y gelatinoso. El veneno de los alacranes se compone principalmente de proteínas y péptidos de diferentes pesos moleculares, entre los que se encuentran hialuronidasas. Contienen también aminoácidos libres, sales inorgánicas, nucleótidos y lípidos. Se encuentran en mayor proporción varias familias de polipéptidos básicos con un peso molecular de alrededor de 7,000 daltones y con actividades neurotóxicas. Aquí se distinguen básicamente tres grupos de familias: aquellas que afectan tejidos excitables en mamíferos, crustáceos e insectos.

El método general de purificación de toxinas de alacrán

(10) consiste básicamente en:

- a) Extracción con agua bidestilada para eliminar mucoproteínas, que podrían interferir en los siguientes pasos de purificación.
- b) Cromatografía de exclusión por peso molecular en columnas de Sephadex G-50 (amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 8.6). Este paso permite una separación gruesa de muchos componentes.
- c) Cromatografía de intercambio iónico (se utiliza el mismo amortiguador que en el inciso anterior), en intercambiadores de aniones y luego cationes. Este paso permite el aislamiento y purificación finales de muchas proteínas neurotóxicas activas en mamíferos, insectos o crustáceos. También en algunos casos se obtiene una mejor resolución eluyendo con un gradiente salino.

Para el veneno de C. noxius se obtienen, de acuerdo al esquema general mencionado, tres fracciones principales en Sephadex G-50:

Fracción I.- Componentes de alto peso molecular (entre ellos hialuronidasas).

Fracción II.-Contiene los polipéptidos tóxicos, de peso molecular entre 3000 y 15000 daltones. Constituye entre el 63 y el 71% del veneno soluble.

Fracción III.-Polipéptidos de bajo peso molecular y sustancias diversas que absorben a 280nm.

Posteriormente la fracción II se cromatografía en columnas de intercambio iónico en carboximetilcelulosa (CMC) con un gradiente de NaCl. Se separan así, 14 componentes, con una alta reproducibilidad, aunque en ocasiones, la posición de los componentes menos básicos (II-1 a II-5) puede variar, dependiendo

de las características de la columna (tamaño), volumen del gradiente, o cantidad de proteína aplicada. La parte más constante del cromatograma lo constituyen las toxinas II-8 a II-14. El porcentaje de proteínas tóxicas en esta fracción es del 77%. Por lo tanto, del 48 al 55% del veneno total soluble está representado por algún tipo de proteína tóxica.

A continuación mencionaré brevemente las acciones de algunas toxinas de la fracción II (45) :

II-5.- Es tóxico para crustáceos.

II-6.-Es tóxico para crustáceos aunque menos tóxico para mamíferos.

II-8.-Es letal para ratón.

II-9.2.2.- Obtenido por recromatografía de II-9, es letal para ratón y bloquea canal de Na⁺.

II-10.-Es tóxico para mamíferos, bloquea canal de Na⁺ en experimentos de fijación de voltaje en axón gigante de calamar (12).

II-11.- Es letal para mamíferos, bloquea el canal de K⁺ dependiente de voltaje en axones de calamar gigante, y canal de K⁺ dependiente de Ca⁺⁺ en túbulos T de músculo esquelético de conejo (12, 14, 64).

Las toxinas de alacrán son moléculas muy compactas y termoestables, y poseen entre 36 y 70 residuos de aminoácidos (45). El grupo del Dr. Possani ha secuenciado algunas de estas toxinas. A continuación se presenta la secuencia N-terminal de los péptidos II-9.2.2., II-10 (ambas con un peso

molecular -PM-, aproximado de 7,000 daltones) y II-11 (PM aproximado: 4,200 daltones) de Centruroides noxius, y de la toxina gamma de Tityus serrulatus, péptidos de interés en el presente trabajo:

- C.n.II-9.2.2. Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Asp-Lys-Asn-Thr-Gly-Cys-Lys-Tyr-Glu-Cys-Leu-Lys-Leu-Gly-Asp-Asn-Asp-Tyr-Cis-Leu-Arg-Glu-Cys-Lys-Gln-Gln-Gly-Tyr-Lys-Gly-Ala-Gly-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Ala-Phe-Ala-Cys-Trp-Cys (46)
- C.n.II-10 Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Asn-Leu-Tyr-Thr-Gly-Cys-Lys-Tyr-Glu-Cys-Phe-Lys-Leu-Gly-Asp-Asn-Asp-Tyr-Cys-Leu... (12, 46)
- C.n.II-11 Thr-Ile-Ile-Asn-Val-Lys-Cys-Thr-Ser-Pro-Lys-Gln-Cys-Ser-Lys-Pro-Cys-Lys-Glu-Leu-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ala-Gly-Ala-Lys-Cys-Met-Asn-Gly-Lys-Cys-Lys-Cys-Tyr-Asx-Asn (47)
- T.s.gamma Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Met-Asp-His-Glu-Gly-Cys-Lys-Leu-Ser-Cys-Phe-Ile-Arg-Pro-Ser-Gly-Tyr-Cys-Gly-Arg-Glu-Cys-Gly-Ile-Lys-Lys-Gly-Ser-Ser-Gly-Tyr-Cys-Ala-Trp-Pro-Ala-Cys-Tyr-Cys-Tyr-Gly-Leu-Pro-Asn-Trp-Val-Lys-Val-Trp-Asp-Arg-Ala-Thr-Asn-Lys-Cys (48)

El Dr. Possani ha demostrado por experimentos de desnaturalización seguidos por dispersión óptica rotatoria que las toxinas de los alacranes mexicanos son moléculas muy compactas y están estabilizadas por cuatro puentes disulfuro, que corresponden a las ocho cisteínas de las moléculas (45).

Los datos obtenidos mediante caracterización espectroscópica de 5 toxinas (T.serrulatus II-5.3., C.elegans II.6.1., II.7.1., C.noxius II.9.2.2., II.10.2) demuestran que son reversibles a la desnaturalización térmica y contienen de 20 a 22% de estructura beta plegada, y de 4 a 11% de alfa hélice. (Para C.noxius

II.9.2.2 es de 22 y 11% respectivamente) (45, 49, 66).

El uso de neurotoxinas como herramientas en la Neurobiología ha aumentado en los últimos años. Se han hecho grandes esfuerzos en la búsqueda de toxinas que se unan específicamente a ciertos receptores. Estas toxinas pueden usarse para aislar y marcar estos receptores.

Antes de abordar este tema, mencionaré brevemente algunos conceptos básicos de los receptores que son de interés en este trabajo: los canales de sodio y de potasio.

III. PAPEL DE LOS CANALES DE SODIO Y DE POTASIO EN LA EXCITABILIDAD CELULAR (29).

Esta sección es por necesidad muy breve, y solamente aborda de manera muy general el papel de los canales iónicos en la regulación de las corrientes de membrana y de los fenómenos de activación de tejidos excitables.

Uno de los mecanismos más importantes de la Fisiología Celular es la permeabilidad selectiva de la membrana celular (por medio de canales iónicos), tanto en reposo como durante el potencial de acción. Otros mecanismos incluyen proteínas transportadoras que

requieren de energía (ATPasas) así como acarreadores de iones.

Por ejemplo: entre los primeros descubrimientos de gran importancia está el que la membrana celular en reposo es prácticamente impermeable a los iones sodio, y que al iniciarse el potencial de acción, la membrana abruptamente comienza a permitir el paso de estos iones. Este cambio drástico de permeabilidad se debe a la operación de canales específicos que se abren y permiten el paso de los iones sodio.

Los canales iónicos son poros macromoleculares que se encuentran atravesando las membranas celulares. Son moléculas excitables, que responden de manera específica a diferentes estímulos: cambios del potencial de membrana, estímulos químicos (por ejemplo neurotransmisores), deformaciones mecánicas, etc.

Una característica importante del poro abierto es la permeabilidad selectiva, permitiendo sólo a un determinado grupo de iones fluir pasivamente a través de los canales, por su gradiente electroquímico, y a una velocidad mayor de diez millones de iones por segundo.

Otra propiedad fundamental de los canales iónicos es la "acción de compuerta". Es decir, tienen un sensor (que es una o varias moléculas que están asociadas al canal) que detecta un estímulo específico y que va a permitir que los canales se abran o se cierren, permitiendo o no el flujo de iones.

Los canales que son sensibles a compuestos químicos o a neurotransmisores poseen sitios de unión a estos compuestos. Por ejemplo, para que los canales de potasio dependientes de calcio se abran, requieren que se unan a cada uno de ellos, desde el espacio intracelular, dos o tres iones calcio.

Todos los canales sensibles a voltaje o a transmisores que se han estudiado, tienen diversas cinéticas de apertura-cierre; pueden presentar diferentes en el estado abierto o cerrado. Por lo tanto, pueden retrasarse, inactivarse o desensibilizarse en el curso del tiempo.

Las neurotoxinas, compuestos químicos e iones en el medio pueden alterar la respuesta de los sensores a cambios en el potencial de membrana.

IV. LAS NEUROTOXINAS QUE ACTUAN EN CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN MEMBRANAS EXCITABLES (8, 15, 27, 29, 56).

El canal de Na^+ es el responsable de la corriente despolarizante en una gran variedad de tejidos excitables.

Una gran cantidad de toxinas ejercen sus efectos tóxicos modificando las propiedades de los canales de Na^+ involucrados en la generación de los potenciales de acción de las neuronas,

corazón y músculo esquelético.

A este canal se unen específicamente 4 clases de neurotoxinas, probablemente en 4 sitios distintos del canal. Estas toxinas han ayudado enormemente a la caracterización, purificación y reconstitución de proteínas integrales que conforman a este canal.

La primera clase incluye la tetrodotoxina (TTX), y la saxitoxina (STX). Estas son guanidinas heterocíclicas pequeñas y tienen carga positiva. Muestran gran afinidad por el canal, y presentan constantes de disociación de orden nanomolar. Se unen a la parte externa del canal e inhiben la entrada de Na^+ . Puede ser que el sitio de unión se encuentre en o alrededor del extremo externo del poro del canal (15).

La segunda clase incluye a neurotoxinas alcaloides como la veratridina, la grayanotoxina y la aconitina; y a la toxina de sapo batracotoxina (BTX). Estos son compuestos policíclicos liposolubles (27). BTX y veratridina son moléculas pequeñas (PM 538 y 674 respectivamente) liposolubles, que pueden interaccionar con el canal tanto por su lado externo como por el interno. Estas toxinas disminuyen el umbral de activación del canal, en 50 mV. Además eliminan tanto la inactivación rápida como la lenta (sólo la BTX), lo cual da lugar a la activación persistente de los canales. También disminuyen la selectividad y la conductancia de estos canales. En ensayos de reacción competitiva, se ha demostrado que tienen un sitio común de unión.

Debido a que alteran tanto la activación como la inactivación del canal, el sitio de unión de estas toxinas al receptor podría estar localizado en una región importante para ambos procesos (15).

Existe un tercer sitio diferente de unión a estos canales, con el cual interactúan algunos péptidos aislados a partir de venenos de alacranes (toxinas alfa) (por ejemplo, en este sitio se unen péptidos de Androctonus australis Hector (Kd=0.7 nM) y Leiurus quinquestriatus quinquestriatus, la tityustoxina del alacrán brasileño Tityus serrulatus), y de anémonas marinas. Estas toxinas hacen más lenta o bloquean la inactivación del canal; liberan neurotransmisores de sinaptosomas (Kd=30 nM) y además tienen efectos aditivos en el bloqueo en presencia de neurotoxinas del tipo de la BTX.

En una revisión publicada en 1980 (15), Catterall resume las propiedades de los sitios receptores de neurotoxinas en el canal de sodio. Estas se presentan la tabla I.

TABLA I. Sitios receptores a neurotoxinas en el canal de sodio.

Sitio receptor de la toxina	Ligandos	Efecto fisiológico
I	Tetrodotoxina Saxitoxina	Inhíben el transporte iónico.
II	Veratridina Batracotoxina Aconitina Grayanotoxina	Alteran la activación e inactivación. Causan activación persistente.
III	Toxinas de alacrán y de anémonas marinas	Inhíben la inactivación Incrementan la activación persistente causada por la veratridina, batracototoxina, aconitina y grayanotoxina.

Las toxinas del tipo beta del alacrán americano actúan sobre un cuarto sitio de unión del canal, y tienen efectos sobre la activación del canal. Por ejemplo: el veneno del alacrán norteamericano Centruroides sculpturatus, y el de Centruroides suffusus (toxina II) (citado en la referencia 8).

Lazdunski (citado en 8) propone un quinto sitio de unión al canal por otro bloqueador de este canal: la toxina gamma de Tityus serrulatus, con una K_d de 2.3×10^{-12} para la toxina nativa, y de 4 a 5.5×10^{-12} para la toxina yodada.

También se sabe que la toxina II-10 de C. noxius bloquea de manera selectiva al canal de sodio:

En 1984 Carbone, Possani y colaboradores (12) publican un estudio sobre los efectos de la toxina II-10 de C. noxius en las corrientes de Na⁺ y K⁺ en experimentos de fijación de voltaje en axón gigante de calamar.

Observan que la toxina II-10 de C. noxius produce, sin afectar las corrientes de potasio, los siguientes cambios en las de sodio:

- En corrientes separadas farmacológicamente (por bloqueo selectivo de canales específicos mediante el uso de drogas), concentraciones bajas de la toxina (0.28-1 uM) producen una baja en el pico de la corriente de entrada de Na⁺, con un efecto insignificante en su inactivación.

- A concentraciones mayores (>3 uM), se reduce drásticamente el pico de la conductancia y el curso del tiempo de su inactivación.

- A concentraciones altas (10 uM), la toxina produce una depresión selectiva de los picos de corriente de entrada de sodio, sin causar ningún efecto en las corrientes de potasio. A esta concentración, también modifica las constantes de velocidad en la transición del estado inactivado al segundo estado abierto del canal.

En ensayos de competencia se ha demostrado que las toxinas: gamma de T. serrulatus, II-9.2.2 y II-10 de C. noxius compiten por el mismo sitio de unión al canal de sodio.

Es mediante algunos de los agentes bloqueadores del canal de sodio que ha sido posible localizar, aislar y purificar este canal; y con esto ha sido posible deducir algunas de sus características básicas:

En el músculo esquelético de rata el canal de Na^+ tiene un peso molecular (PM) de 315 kD, está formado por una proteína de PM aproximado de 250 kD, una subunidad de 47 kD y 2 subunidades de 38 kD. Los canales de sodio de membranas sinaptosomales de cerebro de rata están constituidos por un péptido alfa (PM 260 kD), y 2 subunidades más pequeñas, beta 1 (39 kD) y beta 2 (37 kD). La subunidad alfa está unida por puentes disulfuro a la subunidad beta 2.

La proteína de 260 kD está involucrada en la activación por BTX, unión de toxinas de alacrán y en el proceso de conducción .

Aún no ha sido determinado el papel que juegan las 2 subunidades pequeñas.

La conductancia del canal en su estado abierto es de 12-18 pico-Siemens (pSi).

Tiene la siguiente secuencia de selectividad iónica: $\text{Na}^+ > \text{Li}^+$
> $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$. También es permeable a algunos cationes orgánicos como: amonio, hidroxilamonio, guanidina (26). Esto

sugiere que el tamaño mínimo del filtro selectivo del poro es de 3 X 5 angstroms.

V. CANALES DE POTASIO. NEUROTOXINAS QUE LOS AFECTAN (29, 31, 32, 35, 36, 42, 49).

Julio Bernstein postula en 1902 una permeabilidad selectiva a K^+ en membranas de células excitables. Puede considerársele como el que abre el camino al descubrimiento de los canales de K^+ . Existe una gran diversidad de canales de K^+ , y con esto se modulan las funciones de las células excitables.

Los canales de K^+ , de cualquier tipo, en estado abierto, estabilizan el potencial de membrana: lo acercan al potencial de equilibrio del K^+ , y lo alejan del umbral de disparo. También acortan los potenciales rápidos, finalizan periodos de actividad intensa, disminuyen la velocidad de los disparos repetitivos y generalmente, cuando están abiertos, también disminuyen la excitabilidad celular.

Los diferentes tipos de canales de K^+ se distinguen más por sus propiedades de compuerta que por su farmacología o selectividad iónica.

A continuación se describen brevemente los principales tipos de canales de potasio dependientes de voltaje que se conocen:

- Canal de Potasio Rectificador Retardado.

Las dos características más importantes de los potenciales de acción axonal son tal vez su gran velocidad de conducción, así como su brevedad y rápida recuperación. Se requiere de adecuadas propiedades de cable y una densidad óptima de canales de Na⁺ de activación rápida, para que se logren altas velocidades de conducción. La brevedad requiere de la inactivación rápida de canales de Na⁺ y una alta permeabilidad al K⁺. En la mayoría de las células excitables con potenciales de acción cortos (de 1 a 10 ms de duración a 20 C), la alta permeabilidad al K⁺ se logra a través de canales de K⁺ "rectificadores retardados", que se activan rápidamente. Los ejemplos de células que tienen este tipo de canal de K⁺ son: axones, motoneuronas, músculo esquelético rápido de los vertebrados.

La toxina II-11 de *C. noxius* bloquea al canal de potasio dependiente de voltaje en axón gigante de calamar (12, 13).

En 1982 Carbone y colaboradores (12) publican la acción de la toxina II-11 (noxiustoxina o NTX) de *C. noxius* en axones del calamar *Loligo vulgaris*, en experimentos de fijación de voltaje.

Esta toxina disminuye el pico de la permeabilidad de los canales de K⁺ dependientes de voltaje, sin afectar su cinética de apertura-cierre. Este efecto es dosis dependiente, y no afecta la permeabilidad al sodio. La constante de disociación que tiene la

noxiustoxina en este sistema es de 300 nM. Este es el primer polipéptido encontrado que bloquea de manera selectiva a los canales de K⁺.

Sitges, Bayón y Possani en 1986 (61) publican que la NTX, mismo componente II-11 mencionado anteriormente, induce la liberación del neurotransmisor GABA (Ácido gamma-amino-butírico) en sinaptomas perfundidos de cerebro de ratón. Este efecto depende de la presencia de Ca⁺⁺ extracelular para acoplar este estímulo con la liberación de este neurotransmisor.

- Canales que determinan una corriente saliente transitoria de K⁺.

Las membranas excitables muchas veces tienen el papel de codificar señales nerviosas. Transforman el promedio de todas las influencias inhibitorias y excitatorias a un código de patrones de diparos de potenciales de acción. La intensidad del estímulo modula gradualmente la respuesta. A mayor corriente, mayor velocidad de disparo. Este sistema de código modulado por la frecuencia es el más utilizado por el sistema nervioso. Después de cada disparo, la membrana se hiperpolariza un poco, y posteriormente se va despolarizando lentamente hasta alcanzar el umbral de disparo otra vez. Las membranas codificadoras disparan a la velocidad que refleja la intensidad del estímulo y es lo suficientemente lenta como para no fatigar a las neuronas y músculos que le siguen.

Estas membranas codificadoras poseen un tipo adicional de canal de K^+ , que se activa transitoriamente en los rangos subumbrales de los potenciales de membrana. Se ha denominado a la corriente de esta canal como corriente A, corriente transitoria rápida de potasio, corriente transitoria hacia fuera y corriente de inactivación rápida.

- Canal de K^+ dependiente de calcio, $K(Ca)$ (29, 31, 35).

Existen muchos tipos de canales de potasio activados por calcio. Están ampliamente distribuidos en diferentes células y tejidos, y tienen un papel importante en la secreción, disparos repetitivos, y repolarización de los potenciales de acción.

Todos estos canales se activan con calcio intracelular. Pueden ser de conductancia pequeña o grande, pueden ser muy selectivos o solamente selectivos a cationes, o bien dependientes o independientes de voltaje.

A continuación se describe el canal de K^+ activado por calcio de conductancia unitaria grande (29, 31):

Está presente en las membranas de los túbulos T de musculo esquelético. Ha sido posible incorporar a estos canales a

bicapas lipídicas planas a partir de músculo esquelético de rata, conejo, sinaptosomas de cerebro, músculo liso y células cromafines (59).

La densidad de este canal en la membrana del túbulo T es muy baja. Es muy selectivo para K^+ . La conductancia de cada canal es de 230 pSi. Probablemente esta elevada conductancia y su alta selectividad se debe a la presencia de poros multiiónicos en el canal. Para activarlo, el calcio se une del lado cis (intracelular). Se activan también por despolarización.

El número de iones calcio para abrir al máximo el canal es distinto en diferentes canales, y varía desde dos en el canal de túbulo T hasta cuatro en los canales de miotubo.

Estos canales son altamente selectivos; en túbulos T, músculo liso y en células cromafines tiene la siguiente secuencia: $Tl^+ > K^+ > Rb^+ > NH_4^+$

Los siguientes compuestos son bloqueadores del canal:

- a) Litio y sodio por la parte interna;
- b) Cesio en los túbulos T, tanto desde la parte cis (interna) como desde la parte trans (externa);
- c) Tetraetilamonio y nonilmetilamonio en los túbulos T;
- d) El calcio a una concentración mayor de 1 mM, del lado cis;
- e) Bario del lado cis induce un incremento en la frecuencia de cierre del canal;
- f) Caribdotoxina, que es un péptido básico de Leiurus

quinquestratus quinquestratus, con un peso molecular aproximado de 4,800 daltones, bloquea el canal por el lado externo. Presenta una K_d de 1.8 nM (64);

g) Noxiustoxina, del alacrán mexicano Centruroides noxius, posiblemente actúa en el mismo sitio de la caribdotoxina.

En experimentos con bicapas lipídicas planas que contienen un solo canal, Valdivia, Smith, Coronado y Possani (64) demuestran que la NTX afecta al canal de K^+ activado por Ca^{++} de túbulos T de músculo esquelético de rata. En la presencia de 800 nM de NTX desde el lado trans ("extracelular") se reduce la probabilidad de apertura del canal de $K^+(Ca^{++})$ de 0.85 en condiciones control, a 0.44 ante la presencia de la toxina. A partir de curvas dosis-respuesta, se estima que la constante de disociación de la NTX, es de 450 nM para este canal. El mismo grupo de investigadores compara la secuencia de la NTX con otro bloqueador del canal de $K^+(Ca^{++})$, la CTX o caribdotoxina (es una proteína purificada a partir del alacrán Leiurus quinquestriatus quinquestriatus, que también bloquea a este canal, pero con una K_d mucho menor, de 1.8 nM). Se encuentra un 60% de homología en el decapeptido de la región C-terminal de ambas toxinas.

VI. MOVILIDAD DE LOS CANALES MEMBRANALES.

En 1972 Singer y Nicolson (60) proponen el modelo del mosaico fluido para las membranas plasmáticas celulares, y sugieren a estas como una especie de solución bidimensional de proteínas globulares integrales dispersas en una matriz lipídica fluida.

Hoy en día está bien establecido que la mayor parte de los lípidos de la membrana celular se encuentra en estado fluido en condiciones fisiológicas, que muchas proteínas son móviles, y que su movilidad en el plano de la membrana tiene gran importancia fisiológica (por ejemplo: la agregación de algunos receptores a hormonas en microagregados para luego ser endocitados) (1, 6).

Sin embargo, parece ser que en tejidos diferenciados una gran fracción de las proteínas membranales son inmóviles y no están distribuidas al azar (6).

Existen funciones fisiológicas importantes que ocurren en la superficie de las células, y dependen de interacciones dinámicas de las moléculas embebidas en la membrana plasmática, unas con otras, y con moléculas y estructuras intra y extracelulares (23). Por ejemplo: los receptores nicotínicos de acetilcolina en fibras de músculo esquelético están concentrados en la zona terminal de innervación; también receptores de otros neurotransmisores en otras membranas postsinápticas están concentrados en estas áreas

(1).

La membrana celular del músculo tiene dos componentes: sarcolema (membrana de superficie) y el sistema transverso de túbulos T (STT). Algunas proteínas tienen una distribución desigual en ambos (1, 22):

-Los receptores de acetilcolina están confinados a la placa neuromuscular del sarcolema.

-La mayoría de los canales de calcio residen en el STT y su concentración en esta zona es 3 veces mayor a la del sarcolema.

-La densidad promedio de la bomba de Na^+/K^+ en el sarcolema es 15 veces mayor que en STT.

- Los canales iónicos involucrados en la excitación (canales de Na^+ y de K^+ dependientes de voltaje) son más abundantes en el sarcolema. Puede ser que se necesitan corrientes iónicas grandes a lo largo del sarcolema para obtener una velocidad adecuada para la conducción del impulso a través de las fibras musculares (que tienen varios cm de largo). Por otro lado no se requieren velocidades tan altas de conducción en STT ya que ocurre en distancias de pocas decenas de μm .

En una distancia de menos de 20 μm la concentración de los canales de Na^+ pueden incluso variar 2 veces. En los túbulos T la

densidad de los canales de Na^+ es de aproximadamente la mitad de la que hay en sarcolema. Se ha sugerido que la transición entre ambas zonas es gradual, y que la menor densidad se encuentra en la porción central del túbulo T.

Kimón Angelides reporta en 1986 (3) la segregación de los canales de sodio en cocultivos de músculo innervado. Estos canales se encuentran co-localizados con los receptores de acetilcolina en la región de la unión neuromuscular.

La densidad promedio de los canales de K^+ dependientes de voltaje en el sistema transverso de túbulos T (STT) es 0.4 veces la del sarcolema.

El canal de K^+ rectificador de la corriente de entrada puebla ambas porciones con la misma densidad.

No se sabe aún la distribución de los canales de potasio dependientes de calcio.

Para que la segregación se mantenga, las proteínas membranales deben estar inmovilizadas (por ejemplo por su unión a estructuras celulares fijas) o debe existir una fuerza organizadora que continuamente regrese a las moléculas que se han alejado (6, 23).

Se requiere de interacciones entre las moléculas de la membrana

plasmática, o con componentes citoplasmáticos para la formación de estructuras especializadas. Estas estructuras están involucradas en varias funciones e incluyen, por ejemplo: fibronectina (que son fibras extracelulares de glicoproteína, que contribuyen a la formación de una matriz conectiva pericelular), regiones recubiertas de la membrana plasmática que pueden contener receptores de varios tipos como por ejemplo la proteína clatrina que puede mediar endocitosis de una gran variedad de complejos ligando-receptor (por ejemplo: insulina, factor de crecimiento epidermial, lipoproteínas de baja densidad y alfa-2 macroglobulina) (23).

OBJETIVOS DE ESTA TESIS.

- a) Obtener toxinas del veneno del alacrán de Nayarit (C. noxius) en forma homogénea, especialmente las toxinas II-11, II-10 y II-9.2.2.
- b) Marcar a estas toxinas con sondas fluorescentes y/o cuerpos densos a la microscopia electrónica (ferritina).
- c) Caracterizar las toxinas marcadas.
- d) Mediante el uso de las toxinas mencionadas en los incisos anteriores, desarrollar técnicas que permitan visualizar la localización de sus receptores y estudiar la movilidad de éstos en cocultivos de músculo estriado innervado de rata, y/o en la corteza de cerebro de ratón.
- e) Especial atención será dada a la movilidad de canales de K⁺ reconocidos por la NTX.

MATERIAL Y METODOS.

I. PURIFICACION DE LAS TOXINAS DEL VENENO TOTAL DE Centruroides noxius (46).

a) Obtención del veneno.

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica del telson del alacrán C. noxius. El material hidrosoluble se obtuvo por centrifugación a 8,000 rpm por 10 minutos. El precipitado se lavó nuevamente en agua bidestilada, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron recuperados y liofilizados. Se guardaron a -20°C hasta su uso.

b) Separaciones cromatográficas.

El veneno soluble liofilizado fue resuspendido en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. Se aplicaron alícuotas de esta solución en una columna de Sephadex G-50 para separar los componentes del veneno con base en sus pesos moleculares. La fracción tóxica a mamíferos (ratones) fue separada sucesivamente en varias columnas de intercambio iónico catiónico, de carboximetilcelulosa, todas ellas equilibradas y eluidas en un amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, y de fosfatos de sodio 50 mM a un pH de 6.0 y/o 8.0. La separación se obtuvo mediante el uso de gradientes lineales de cloruro de sodio. Parte de esta estrategia ya había sido descrita anteriormente (46).

c) Ensayos de toxicidad.

El seguimiento de la purificación de las toxinas se hizo mediante un bioensayo sencillo, que consiste en inyectar ratones albinos (cepa CD1) de 18 a 25 gramos de peso corporal con cantidades variables (25-200 μ l conteniendo de 5 a 50 μ g de proteína) de las diferentes fracciones cromatográficas. La inyección se realiza por vía intraperitoneal, subcutánea o intracraneal. Normalmente se utilizó la inyección intraperitoneal. La letalidad de las fracciones se definió con base en el comportamiento del animal: letal significa que el animal inyectado presentó excitabilidad, salivación, disnea, convulsiones, parálisis de los miembros posteriores, muerte; tóxico significa que el ratón presentó alguno de los síntomas mencionados, pero se recuperó al cabo de un día después de la inyección; y no tóxico significa que el ratón se comportó como los controles inyectados con solución salina o con los amortiguadores respectivos.

d) Criterios de pureza de las toxinas.

La homogeneidad de las toxinas se verificó por: comportamiento cromatográfico (simetría de los picos del cromatograma); electroforesis en geles de acetato urea y de SDS poliacrilamida de 10 a 20%; y secuenciación automatizada de los aminoácidos de la porción N-terminal de los péptidos (46, 54, 55, 67).

II. CONJUGACION DE FERRITINA AL ANTICUERPO MONOCLONAL BNTX-4 (5, 34).

El anticuerpo monoclonal contra la fracción II-11 utilizado fue preparado en el laboratorio del Dr. Possani por la Bióloga Rocío Sánchez.

Se añadieron 0.14 ml de una solución de NaCl 150 mM que contenían 14.04 mg de ferritina libre de Cd⁺⁺ (Polysciences) al anticuerpo monoclonal (Acm) BNTX-4 (7.2 mg) para una solución final de 0.21 ml de NaCl 0.5 M preparada en amortiguador de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.4. Con agitación muy suave se añadió gota a gota glutaraldehído (Polysciences) de una solución stock al 0.5% hasta alcanzar una concentración final de 0.05%. Después de una hora de agitación a temperatura ambiente se añadió lisina hasta alcanzar una concentración final de 0.1 M, para neutralizar los sitios activos del glutaraldehído. La mezcla se incubó por una hora más a la misma temperatura y se dializó toda la noche contra NaCl 0.5 M en amortiguador de fosfatos 0.05% M pH 7.4 a 4°C. El sobrenadante se guardó a 4°C hasta ser utilizado de nuevo. Antes de aplicarlo a la columna de afinidad se dializó contra el amortiguador de corrida: Tris-HCl 0.5 M pH 7.95.

III. PREPARACION DE LA RESINA DE AFINIDAD CON NTX Y PURIFICACION DEL COMPLEJO ANTICUERPO MONOCLONAL BNTX-4-FERRITINA.

El acoplamiento de la toxina NTX a resina de Affigel-10 se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories).

Se resuspendió 2.035 mg de NTX liofilizada en 5.5 ml de agua bidestilada. El pH de la toxina se ajustó a 8.0 con amortiguador de bicarbonato de sodio 0.2 M. Se tomaron 5 ml de Affigel-10. Sobre un matraz quitasato se colocó un embudo para filtrar al vacío la suspensión del affigel al añadir primero aproximadamente 10 ml de alcohol isopropílico, luego se añadieron aprox. 15 ml de H₂O previamente enfriada a 4°C. El amortiguador de acoplamiento fue carbonato ácido de sodio 0.1 M, pH 8.0. En otro recipiente se añadió al affigel la toxina preparada (2-10 mg ligando/mg gel), agitándose suavemente durante una hora. Para inactivar posibles grupos reactivos residuales se añadió 0.1 ml de glicinamida 1.0M por cada mililitro de gel. Esto se guardó a 4°C.

En una columna de (1 X 20) cm se colocó la resina de afinidad-NTX preparada en amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 7.95. Se aplicó el Acm BNTX-4-ferritina, después se hizo pasar por la columna tiocianato de sodio 3 M, para desprender los anticuerpos monoclonales acoplados a ferritina que preservaron su actividad contra la NTX. Inmediatamente después, éstos se dializaron con

amortiguador de fosfatos de sodio 0.5 M, pH 7.4 y se concentraron con Aquacide II (Calbiochem).

IV. PREPARACION DEL TEJIDO DE LA CORTEZA CEREBRAL DE RATA PARA SU OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO (62).

Se decapitaron cuatro ratas Wistar (250 a 300 g de peso), removiendole el cerebro para posteriormente cortar la corteza a un espesor de 1 mm. Se transfirieron los fragmentos a una solución de Ringer-Krebs (4°C). Se lavaron dos veces con la misma solución para eliminar el exceso de sangre.

V. PREPARACION DE LOS SINAPTOSOMAS CEREBRALES DE RATON PARA SU OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO (11).

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C a menos que se indique. Cuatro ratas Wistar, (machos y de 250-300 mg de peso) se decapitaron, y el cerebro fue retirado, se homogenizaron la corteza y el tallo cerebral en 9 volúmenes de sacarosa 0.32 M, centrifugando a 1,000 X g por 10 min. El sobrenadante se centrifugó a 145,000 X g por 15 min. El botón, que contenía mitocondrias, sinaptosomas, pequeños fragmentos de mielina y microsomas, se resuspendió en un volumen igual de sacarosa 0.32 M y se resedimentó a 15,900 X g por 20 min. Se colocó el último botón resuspendido en sacarosa 0.32 M sobre un gradiente discontinuo de sacarosa de 0.8 M a 1.2 M, se centrifugó una hora a 53,000 X g. Así se obtuvieron tres subfracciones: mielina,

sinaptosomas y mitocondrias (al fondo). Se colectaron por separado y se sedimentaron 15 minutos a 20,000 X g . Los botones o precipitados se resuspendieron en 1 a 3 ml de sacarosa 0.32 M.

VI. OBTENCION DE SINAPTOSOMAS CEREBRALES DE RATA PARA LOS EXPERIMENTOS DE UNION (16).

Se durmieron 2 ratas Wistar (250-300 g de peso) con CO₂, se decapitaron y el cerebro les fue removido rápidamente. Se lavaron estos en una solución de sacarosa 5 mM TRIS-HCl, pH 7.4 (4°C), que contenía además PMSF (fluoruro fenil metano sulfonilico) 0.1 mM, iodoacetamida 1 mM, fenaentrolina 0.1 mM y pepstatina A 1 mM. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C y todas las soluciones amortiguadoras contenían estos cuatro inhibidores de proteasas (30, 63). Los cerebros se homogenizaron en 30-40 ml de la solución de sacarosa (10 veces en un homogenizador de vidrio y teflón). El volumen final (aproximadamente 60 ml) se sedimentó a 2,500 rpm en un rotor GSA (Sorvall) durante 10 minutos. Se guardó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 40 ml de la misma solución, se homogeneizó, y recentrifugó a 2,500 rpm durante 10 minutos. Se juntaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 11,500 rpm en un rotor GSA por una hora. Se realizó un ensayo de Bradford y de Peterson para determinar la concentración de proteína (10, 19). Los sinaptosomas se guardaron a -70°C hasta su uso.

VII. TINCIONES Y PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA SU OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO (11).

La parte relacionada con microscopía electrónica fue llevada a cabo en el laboratorio del Dr. Cárabez del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M., el procedimiento utilizado fue de acuerdo a la metodología descrita por Cárabez y Possani en 1982 (11).

VIII. OBTENCION DE TOXINAS MARCADAS CON CROMOFOROS FLUORESCENTES (4).

Todo el procedimiento fue llevado a cabo con luz tenue.

Preparación de NTX-Rodamina (NTX-R), II-9.2.2.-Rodamina (II-9.2.2-R), II-9.2.2.-Fluoresceína (II-9.2.2-F), II-10-Rodamina (II-10-R) y II-10-Fluoresceína (II-10-F):

250 ug de NTX, 200 ug de II-9.2.2. y 200 ug de II-10, por separado, fueron disueltos en amortiguador de bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.0. Se añadió 0.065, 0.36 y 0.31 mg, respectivamente, de 5(y 6-) carboxi-tetrametil-rodamina (R) (Molecular Probes, Inc.) disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO).

Para la preparación de los compuestos II-9.2.2.-F y II-10-F, a 200 ug de ambas toxinas, en el mismo amortiguador de bicarbonato arriba mencionado, se añadieron 0.32 mg de éster N-hidroxisuccinimida fluoresceína (F) (Molecular Probes, Inc.)

disuelta en DMSO.

En las reacciones de derivatización de las toxinas II-9.2.2 y II-10, las concentraciones de los reactivos fueron elegidas de manera que la rodamina y la fluoresceína estuvieran en un exceso molar 3 veces superior a las lisinas totales de la toxina.

En la derivatización de la NTX, la concentración de los reactivos se escogió de modo que la rodamina y las lisinas totales de la II-11 estuvieran en una relación 0.3:1.0.

Se permitió que las reacciones ocurrieran durante 60 minutos, en agitación suave a 25°C.

La fracción peptídica fue separada de los productos de la reacción (fluoróforos y solventes) por filtración en gel en columnas de P-2 (0.5x15 cm) en acetato de amonio 300 mM, pH 6.38. Se colectaron fracciones de 1 ml y se midió su absorbencia a 280 y 540 nm. El patrón general en este cromatograma fue la separación de 2 picos. Las proteínas que presentaron absorbencia a 540 nm fueron liofilizadas, y se les realizó un espectro de absorción.

Posteriormente cada pico (denominados I y II) se pasó por una columna de CMC-32 (0.9x10 cm) en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, con un flujo, dado por una bomba peristáltica, de 25 ml/hora, y un gradiente lineal de NaCl de 0.0

a 0.5 M (200 ml por cada envase). A algunas de las fracciones obtenidas se les realizó un espectro de absorción y después fueron concentradas en un aparato bajo vacío ("speed vac").

La concentración de las toxinas derivatizadas se determinó con base en análisis de aminoácidos de todos los compuestos obtenidos.

IX. MARCADO DE LAS TOXINAS NTX Y GAMMA CON ^{125}I (40).

Se resuspendieron 87.7 ug de NTX en 100 ul de amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M, pH 6.0. Se agregaron 12.0 ul de $^{125}\text{I-Na}$ (1.0 mCi) en NaOH. Al tiempo 0 se agregaron 5 ul de lactoperoxidasa (de una solución de 5 mg/ml, Sigma Laboratories) y 3 ul de peróxido de hidrógeno 5 mM. Esto último se repitió a los 5 y 10 minutos. A los 15 minutos se paró la reacción filtrando la mezcla en una columna de Sephadex G-10, equilibrada en amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M, cloruro de sodio 0.1 M, pH 7.4, con un flujo lento, de aproximadamente 10 ml/hr. Se colectaron fracciones de aproximadamente 0.8 ml. En un contador gamma, se midió la radioactividad de alícuotas de 2 ul de cada fracción. A los tubos que contenían $^{125}\text{I-NTX}$ se les agregó 7.5 ml de albúmina sérica bovina para una concentración final de 0.1%.

En un experimento independiente también se marcó la toxina gamma de Tityus serrulatus en condiciones experimentales similares.

X. GELES DE ISOELECTROENFOQUE (55).

Se preparó el gel de corrida que contenía 30% acrilamida, 0.8% de bisacrilamida (2.5 ml finales), 2 ml de Nonidet P-40 (detergente), 5.5 g de urea ultrapura (Bio-Rad), y se añadió H_2O c.b.p. 10 ml. Esta mezcla se calentó para disolver la urea. Por separado se preparó otra solución con 0.4 ml de anfolinas pH 4.0-6.5, 0.1 ml de anfolinas pH 3.5-10, 5 ul de TEMED, 10 ul de persulfato de amonio al 10%. Se mezclaron ambas soluciones y se degasificaron. La solución se pipeteó en tubos de 0.5 cm de diámetro por 12.5 cm de largo (volumen total=3 ml). Se cubrieron con H_2O y se permitió su polimerización por 60 minutos. Se aspiró el H_2O . Luego se dejó que equilibrara la parte superior del gel con 25 ul de la solución amortiguadora de las muestras (9.5 M urea, 5% 2-mercaptoetanol, 2% nonidet P-40, 0.4 ml de anfolinas pH 4-6.5, 0.1 ml de anfolinas pH 3.5-10), durante una hora, después de la cual ésta solución fué removida. Los geles se colocaron en el aparato de electroforesis (cuyo recipiente inferior contenía H_3PO_4 10 mM, y que fue conectado al polo positivo; y el recipiente superior, conectado al polo negativo contenía NaOH 20 mM). Sobre cada gel se colocaron 25 ul del amortiguador de las muestras.

Primero se pre-corrieron los geles por 15 minutos, con un voltaje de 200 V, después 30 minutos a 300 V y finalmente 30 minutos a 400 V.

Luego se aplicaron los compuestos a estudiar, que fueron: NTX

(que después del corrimiento fue teñida con azul de Coomassie), NTX-RI y NTX-RII, ver lista de abreviaturas. Se reservó un gel sin muestra y solamente con solución amortiguadora como muestra para medir después el gradiente de pH. Se corrieron los gels a 400 V durante 12 horas, y durante la última hora se aumentó el voltaje a 800 V para lograr una mejor resolución en las bandas.

Inmediatamente después de la corrida se observaron los gels con luz ultravioleta. El tubo para medir el pH se cortó en fragmentos de 1 cm cada uno, se colocaron por separado en 1 ml de H₂O, y después de 12 horas se determinó el pH de cada fracción.

XI. EXPERIMENTOS PARA VERIFICAR LA ACTIVIDAD DE LAS TOXINAS MODIFICADAS: ENSAYOS DE UNION .

Con la finalidad de verificar que las toxinas derivatizadas todavía estaban funcionando como tales se realizaron dos tipos de experimentos. El primero con la NTX (bloqueadora de canales de potasio) en un sistema electrofisiológico que mide un solo canal (64), y el segundo con las toxinas bloqueadoras de canales de sodio mediante ensayos de competencia con las toxinas fluorescentes y la toxina gamma yodada (17).

En un ensayo realizado por Jeffrey Smith, del laboratorio de Roberto Coronado en el departamento de Fisiología y Biofísica Molecular, Baylor College of Medicine, se comprobó la actividad de la NTX-R-I y NTX-R-II. Esto se hizo mediante la incorporación

del canal de K^+ activado por Ca^{++} en bicapas lipídicas planas, y comparando el efecto de la toxina marcada con el de la nativa. Para mayores detalles sobre este sistema, ver referencia 31.

Los ensayos de competencia (9, 17) con toxina gamma iodada de Tytius serrulatus se realizaron con los siguientes compuestos: II-9.2.2., II-10, II-9.2.2.RI-1, II-9.2.2.RI-2, II-9.2.2.RII-1, II-10RI-1, II-10RII-1, II-10RII-2, II-9.2.2.FII-1, II-9.2.2.FII-2, II-10FII (los números después de las letras de cada toxina se refieren a distintos derivados obtenidos con los cromóforos, ver enlistado de abreviaciones). Los experimentos de desplazamiento se realizaron con 200 ug de proteína de los sinaptosomas de rata (la concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford, 10) en un volumen de 114 ul.

Todos los ensayos de desplazamiento se realizaron por duplicado. Como solución de lavado se utilizó amortiguador de cloruro de colina con 0.1% de BSA (albúmina sérica bovina) (cloruro de colina 140 mM, KCl 5.4 mM, $CaCl_2$ 2.8 mM, $MgSO_4$ 1.3 mM, TRIS-HCl 20 mM, pH 7.4). Los filtros GF/B (Millipore) se preincubaron por una hora en BSA al 1% por al menos una hora, y antes de utilizarse en el ensayo se lavaron dos veces con presión negativa con 5 ml de amortiguador, a temperatura ambiente.

Se pusieron 200 ug de los sinaptosomas preparados, en presencia de la toxina fría (no radiomarcada) para una concentración final de aproximadamente 50 nM en un volumen final de 300 ul en solución amortiguadora. Se incubó a temperatura

ambiente durante 15 minutos. Después se añadió la toxina radiomarcada ("caliente"). Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se filtraron en un sistema de multifiltros.

Como controles y con la misma secuencia descrita, en otros tubos de ensayo y simultáneamente se tenían: sin sinaptosomas (para poder discernir entre el pegado real de las toxinas a sus receptores en los sinaptosomas y la posible interferencia con los filtros), y en presencia de sinaptosomas pero en ausencia de toxina fría.

Los ensayos de desplazamiento se realizaron siempre de la siguiente manera: los sinaptosomas incubados se filtraron con presión negativa a través de los filtros GF/B. Rápidamente se lavaron 2 veces con 5 ml de solución de lavado. La radiactividad retenida por los filtros se midió en un contador gamma Beckman 5500 con 80% de eficiencia.

XII. EXPERIMENTOS DE RECUPERACION DE FLUORESCENCIA DESPUES DE FOTOBLANQUEO (FRAP) (7, 58).

Los experimentos de recuperación de fotoblanqueo los realicé en el laboratorio del Dr. Kimon Angelides del Baylor College of Medicine, utilizando el sistema que él fabricó. Datos referentes a este equipo se encuentran en las referencias 1 y 23. En la figura #1 se pueden apreciar los componentes básicos este sistema.

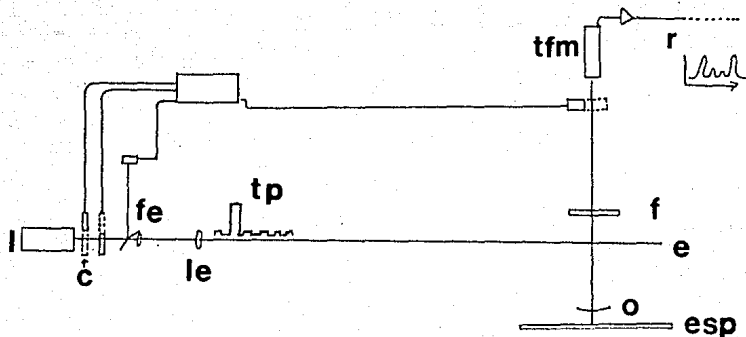


Fig. 1. Representación esquemática del microscopio de fluorescencia excitado por un rayo laser utilizado para las mediciones de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP). *c*=compuerta del haz. *f*=filtro. *t_{fm}*=tubo fotomultiplicador. *l*=láser. *t_p*=tren de pulsos. *e*=emisor dicromático del haz. *le*=lente de enfoque. *o*=objetivo. *r*=registro. *esp*=especimen. *fe*=filtro espacial. Esta figura está reproducida de Jacobson et al., (1977) J. Supramol. Struct. 5:565.

-Marcaje de los co-cultivos de músculo estriado con neuronas de rata.-

Se marcaron los receptores de la NTX en miotubos en co-cultivo con neuronas de médula espinal de rata con el compuesto NTX-RI (para mayores detalles sobre el cultivo celular, ver referencia 3).

Las células se incubaron con NTX-RI a una concentración final de aproximadamente 50 nM (por análisis de aminoácidos se determinó la concentración de la NTX derivatizada, y se ajustó a la concentración deseada diluyéndola en una solución de PBS que contenía: KCl 0.2 g/l, KH_2PO_4 0.2 g/l, NaCl 8 g/l, Na_2HPO_4 1.05 g/l) durante 30 minutos a 22°C. Se lavó 2 veces con PBS y se procedió a los experimentos de fotoblanqueo (FRAP).

Para el marcaje de los fosfolípidos, se incubaron los co-cultivos con tetrametil-rodamina-fosfatidiletanolamina en etanol (10mg/ml en etanol al 1%).

- FRAP.- Después del equilibrio del ligando fluorescente con su receptor, y de los lavados, se montó el portaobjetos del co-cultivo, de manera invertida, en un plato serológico que contenía PBS para usarse con el objetivo de 100x con aceite de inmersión. Con este objetivo se enfocó el haz del laser de argón (514 nm, 5 uW) con un microscopio de fluorescencia Zeiss Universal a un

radio gaussiano de 0.85 μm . Una vez enfocado el punto deseado en el cultivo, se abrió paso al láser. Esto dio lugar a la excitación parcial de los ligandos fluorescentes, señal recibida y registrada en la memoria de la computadora. Posteriormente se procedió a provocar una emisión del láser de alta intensidad y de corta duración de manera que las moléculas fluorescentes enfocadas perdieran su capacidad de emisión de fotones. En el tiempo que siguió, se midió la recuperación de la fluorescencia en el mismo punto inicialmente enfocado. Los datos obtenidos se analizaron mediante un programa de computadora (para mayor información al respecto, ver ref. 58).

RESULTADOS.

I. PURIFICACION DE PEPTIDOS DEL ALACRAN Centruroides noxius, BLOQUEADORES ESPECIFICOS DEL CANAL DE K⁺ (FRACCION II-11, NTX O NOXIUSTOXINA) Y DE Na⁺ (II-9.2.2 Y II-10) .

a) Separaciones iniciales del veneno soluble.

Se aplicaron 730 unidades de densidad óptica (UDO) a 280 nm de veneno soluble de C. noxius a una columna de Sephadex G-50 descrita en material y métodos.

En la figura #2 se encuentran los resultados obtenidos en esta cromatografía . Se separaron tres fracciones, denominadas I,II, y III. Se recuperaron 56 UDO en la fracción I, 566 UDO en la fracción II, y 98.6 UDO en la fracción III, es decir, hubo una recuperación total del 98% de la proteína aplicada (ver tabla #2).

TABLA#2. Recuperación de la columna de Sephadex G-50. Veneno soluble de C. noxius.

Fracción	UDO (280nm)	porcentaje de recuperación
veneno soluble aplicado	730.6	
recuperado	720.0	98.6%
Fracción I	56.0	7.7
II	566.0	77.5
III	98.6	13.5

VENENO TOTAL DE C. NOXIUS

SEPHADEX G-50

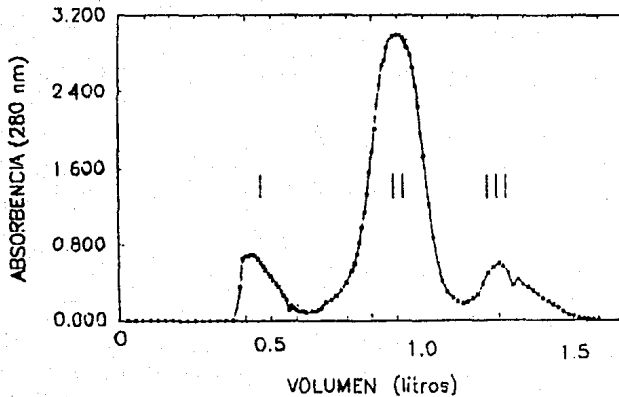


Fig.2. Perfil cromatográfico del veneno del alacrán Centruroides noxius. Columna de Sephadex G-50 (2.9 x 170 cm) a la cual se aplicó 730 UDO (15 ml) de veneno soluble. La columna fue eluida con amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 a una velocidad de 50 ml/hr (tubos de 8 ml). Tres fracciones (I, II y III), correspondientes a 7.7%, 77.5% y 13.5%, respectivamente, se colectaron. La fracción II, tóxica a mamíferos fue recromatografiada (ver figura #3).

El siguiente paso consistió en separar los componentes de la fracción II en una cromatografía de intercambio iónico de CMC-32, con un gradiente salino. Se aplicaron 100 mg de la fracción II. Se separaron 14 componentes por esta columna, con un 93.5% de recuperación de la proteína total aplicada. (Ver fig. #3 y tabla #3 de recuperación).

TABLA#3. Recuperación de la columna de CMC-32. Fracción II de C. noxius.

Fracción	UDO (280nm)	porcentaje de recuperación
fracción II	aplicada 100	
	recuperada 93.5	93.5%
1	1.6	1.6
2	0.4	0.4
3	2.2	2.2
4	4.1	4.1
5	7.6	7.6
6	14.3	14.3
7	12.2	12.2
8	5.5	5.5
9	21.1	21.1
10	10.9	10.9
11	3.0	3.0
12	3.3	3.3
13	2.3	2.3
14	4.3	4.3

FRACCION II (CMC-32)

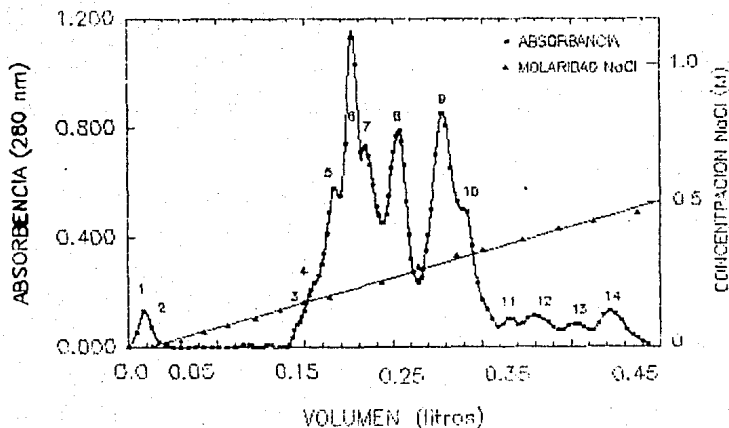


Fig.3. Cromatografía de la fracción II de la columna de la figura anterior. Columna de carboximetilcelulosa (CMC-32) (0.9 x 27 cm). Se aplicó 100 mg de fracción II en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7; la elución se hizo con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 0.5 M (250 ml en cada vaso del aparato de gradiente). Fracciones de 2.5 ml fueron colectadas a una velocidad de 30 ml/hr. Se obtuvieron 14 fracciones.

b) Purificación de la toxina II-9.2.2.

En la figura #4 se encuentran los resultados obtenidos en la cromatografía de 72.7 UDO la fracción II-9 en CMC-32 con un gradiente salino. Se separaron 5 componentes, nominados, los 3 primeros alfa, beta y gamma. Por el comportamiento cromatográfico del cuarto componente se sospechó que correspondía al péptido II-9.2.2 descrito por Possani et al (47), y por la morfología del pico se decidió dividirlo en 2 partes. La recuperación de proteína obtenida en esta columna se puede apreciar en la tabla #4.

TABLA#4. Recuperación de la columna de CMC-32. Fracción II-9

Fracción	UDO (280nm)	porcentaje de recuperación
II-9 aplicada	72.72	
recuperada	64.5	88.6%
alfa	1.5	2.0
beta	8.0	11.0
gamma	5.0	6.8
a	25.0	34.3
b	25.0	34.3

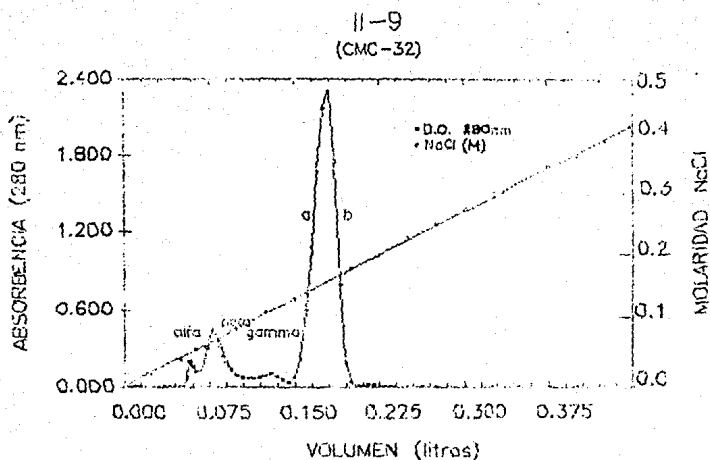


Fig. 4. Cromatografía de la fracción II-9 de *C. noxius*. Columna de carboximetilcelulosa (1 x 30 cm) a la cual se aplicó 72.7 UDO a 280 nm de fracción II-9 en amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM, pH 6.0. La columna fue eluida mediante un gradiente salino de NaCl de 0 a 0.5 M, con un flujo constante de 30 ml/hr. Se colectaron fracciones de 2.5 ml. Se separaron así cinco fracciones que se denominaron alfa, beta, gamma, a y b (las dos últimas formaron un solo componente, que por la asimetría que presentó se subdividió en estas dos partes mencionadas para ser recromatografiadas).

Se realizó un gel de acetato-urea de cada componente (datos no mostrados). Se tomaron muestras de los tubos: 31 (que correspondió a la fracción II-9-b); 62, 65 y 67 (fracción II-9-alfa); 71, 75 y 77 (fracción II-9-beta); de la columna representada en la figura #4. En la fracción 31 se encontraron 4 componentes; en la fracción 62 se encontró un solo componente, y en los tubos 65, 67, 71, 75 y 77 se encontraron 2 componentes de comportamiento electroforético muy semejante, y que correspondieron a un peso molecular de aproximadamente 7,000 daltones.

Por este resultado, se decidió separar por otra columna más a cada una de las fracciones II-9-a, y II-9-b.

Se aplicó la muestra de las fracciones 61-70 (II-9-a) a una columna de CMC-32 equilibrada con el amortiguador de fosfatos de sodio, 50 mM, a pH 8. Se pasó un gradiente de NaCl de 0 a 0.35 M. Como puede observarse en la fig. #5, se separaron 2 picos, y el primero se subdividió en 2: II-9-a1 y II-9-a2, al segundo pico se le denominó II-9-a3.

TABLA #5. Recuperación cromatográfica de la fracción II-9a

Fracción	U.D.O. (280nm)	porcentaje de recuperación
II-9a aplicada	25.0	
recuperada	18.8	75.2%
II-9a1	13.0	52.0
II-9a2	0.8	3.2
II-9a3	5.0	20.0

II-9-a
(CMC-32)

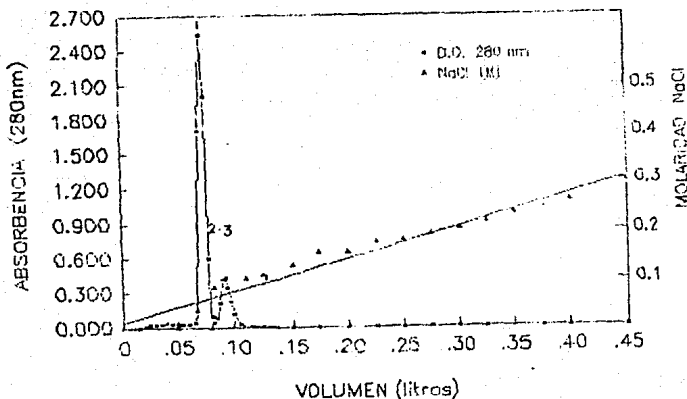


Fig. 5. Cromatografía de la fracción II-9a de C. noxius. Columna de carboximetil-celulosa (CMC-32) (1.1 x 30 cm). Se aplicó 25.0 U.D.O. a 280 nm de la fracción II-9-a de la figura anterior en amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM, pH 8.0, y la elución se hizo con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0.0 a 0.35 M (250 ml en cada vaso del aparato de gradiente), a una velocidad de 25 ml/hr. Se colectaron fracciones de 2.5 ml cada una. Se obtuvieron tres fracciones: 1, 2 y 3.

Se aplicó la fracción II-9-b a otra columna de CMC-32 equilibrada en amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM, pH 8, y se aplicó un gradiente salino de NaCl de 0 a 0.35 M (fig. #6) Aquí se obtuvieron 2 componentes. El primero se subdividió en 2: II-9-b1 (tubos 45-54) y II-9-b2 (tubos 55-63), y el segundo se le llamó II-9-b3 (tubos 74-83).

Se realizó una electroforesis en gel de acetato-urea a la fracciones 48, 52, 56, 59,60, 76, 81. Como marcadores se pusieron las fracciones II-10 y II-9.2.2 de cromatografías anteriores. La fracción 48 correspondió a la II-9.2.2. con un solo componente proteínico. La fracción 52 fue semejante a la 48, pero con una sombra que correspondía a la II-10. Las fracciones 56, 59 y 60 presentaron claramente 2 bandas, que migraron igual que la II-9.2.2 y II-10. Las fracciones 76 y 81 presentaron una sola banda, que correspondió a la II-10. De esta forma se purificaron dos toxinas de la fracción II-9.2.

TABLA#6. Recuperación de la cromatografía de la fracción II-9-b.

Fracción	UDO (280nm)	porcentaje de recuperación
II-9b aplicada	25.0	
II-9b recuperada	23.0	92.0%
II-9b1	8.0	32.0
II-9b2	9.0	36.0
II-9b3	6.0	24.0

II-9-b
(CMC-32)

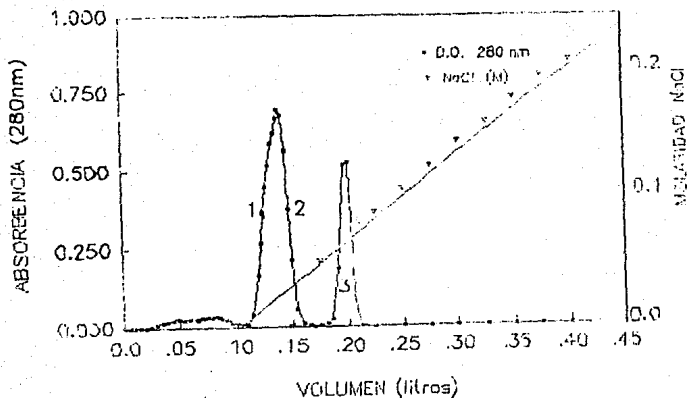


Fig. 6. Cromatografía de la fracción II-9-b de *C. noxius*. Columna de carboximetil-celulosa (CMC-32) (1.1 x 30 cm) equilibrada con amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM, pH 8. La cromatografía se corrió a un flujo de 30 ml/hr. Se aplicaron 25 U.D.O. a 280 nm de la fracción II-9-b de la columna de la figura 4. La columna se eluyó con un gradiente de cloruro de sodio de 0.0 a 3.5 M en el mismo amortiguador. Se obtuvieron 2 componentes. El primero se dividió en 2 partes, dada la simetría del pico, y así se colectaron tres componentes: 1, 2 y 3.

c) Purificación de la toxina II-10.

En la fig. #7 se muestran los resultados obtenidos en la cromatografía de la fracción II-10. El componente II-10 se separó en dos porciones: II-10a y II-10b debido a la presencia de una asimetría en el pico cromatográfico.

TABLA#7 . Recuperación de la cromatografía de la fracción II-10.

Fracción	UDO (280nm)	porcentaje de recuperación
II-10 aplicada	14.0	
recuperada	12.9	92.7%
cargado	4.6	33.4
a	1.5	10.7
b	5.1	36.9
c	0.4	3.2
d	0.2	2.0
e	0.2	1.9
f	0.6	4.5

II-10
(CMC-32)

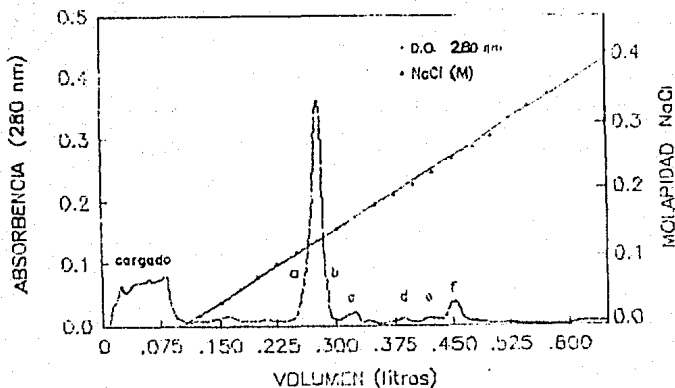


Fig. 7. Perfil cromatográfico de la fracción II-10 de C. noxius. Columna de carboximetil-celulosa (CMC-32) (1 x 30 cm) a la que se aplicó 14 U.D.O. a 280 nm de la fracción II-10 obtenida en la cromatografía de la fracción II de C. noxius (figura 3). La columna fue equilibrada y eluida en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6 con un flujo de 35 ml/hr. Una vez aplicada la fracción II-10, se eluyó mediante un gradiente de cloruro de sodio de 0 a 0.38 M (250 ml por cada vaso del aparato de gradiente) a una velocidad de 30 ml/hr. Se obtuvieron siete fracciones: cargado, a, b, c, d, e, f, y se recuperó 92.78% de la proteína total aplicada.

d) Purificación de la fracción II-11 (NTX).

En la fig. #8 se muestran los resultados de la cromatografía de la fracción II-11 en una columna de CMC-32 . Así se obtuvieron siete componentes, denominados: "cargado", NTX-a, NTX-b, NTX-c, NTX-d, NTX-e y NTX-f. Debido al comportamiento cromatográfico y electroforético en un gel de acetato-urea del componente NTX-e, se tomó éste como la toxina NTX descrita con anterioridad por Possani y colaboradores (47).

TABLA#8. Recuperación de la fracción II-11

Fracción		UDO (280nm)	porcentaje de recuperación
II-11	aplicada	6.2	
	recuperada	6.2	99.2%
cargado		2.8	44.8
a		0.2	3.4
b		0.2	3.4
c		0.4	7.2
d		0.4	6.8
e		1.9	31.2
f		0.1	1.8

II-11 (NTX)
(CMC-32)

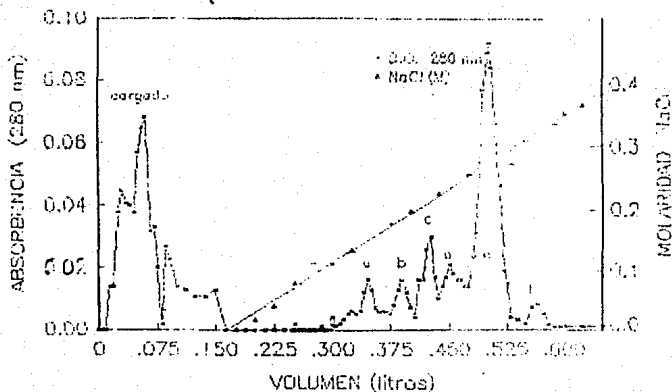


Fig. 8. Perfil cromatográfico de la fracción II-11 de C. noxius. Columna de carboximetilcelulosa (0.9 x 24 cm). Se aplicó 6.25 unidades de densidad óptica (U.D.O.) a 280 nm de fracción II-11 en el mismo amortiguador de la figura 6, y se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0.0 a 0.38 M (250 ml en cada vaso del aparato de gradiente) en el mismo amortiguador, con un flujo de 30 ml/hr. Se colectaron fracciones de 2.5 ml. Se obtuvieron 7 componentes: cargado, a, b, c, d, e, f. Por el comportamiento cromatográfico y electroforético (datos de la electroforesis no mostrados) del componente "e" se le consideró como la noxiustoxina (NTX) descrita anteriormente (47).

II. MARCAJE DEL ANTICUERPO BNTX-4 CON FERRITINA PARA ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Se marcó al anticuerpo BNTX-4 con ferritina para utilizarlo en los estudios de microscopia electrónica. Después del marcaje con ferritina se aplicó la mezcla de la reacción a una columna de afinidad de Affi-gel-10 acoplada a la toxina NTX. Los resultados de esta cromatografía se muestran en la fig#9. Aquí se observa que hay básicamente 2 fracciones separadas: la primera corresponde a aquéllo que no se "pegó" a la columna, que puede ser la ferritina libre, BNTX-4 acoplada a ferritina y que no conservó su afinidad por la NTX, (también podría estar presente BNTX-4-ferritina que sí conservó su actividad, pues quizás se encontraba ya saturada toda la columna). Al eluir con tiocianato de sodio a una concentración de 3M se desprendió aquello que estaba unido a esta columna de afinidad, que es el Ac monoclonal que conservó su capacidad de unión a la NTX.

Sin embargo, los resultados que se obtuvieron en microscopia electrónica no fueron muy concluyentes.

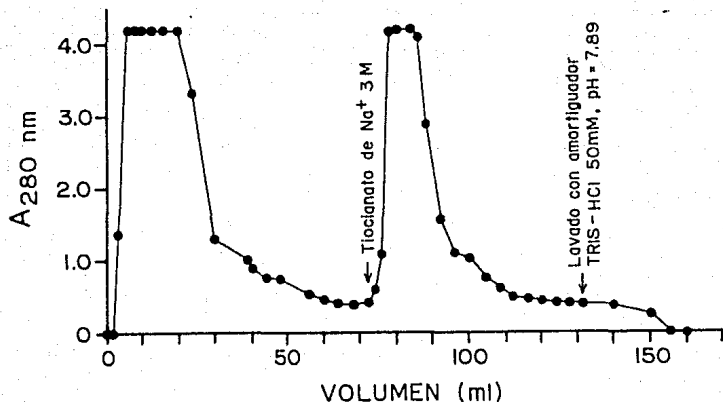


Fig. 9. Columna de afinidad de la noxiustoxina. El Affigel-10 acoplado a NTX, y equilibrado en amortiguador TRIS-HCl 50 mM, pH 7.95 se colocó en una columna de 1 x 30 cm. Se aplicó la solución con el anticuerpo monoclonal BNTX-4 conjugado con ferritina en el mismo amortiguador. La velocidad de corrida fue de 7 ml/minuto. Se colectaron fracciones de 20 ml. Para despegar el conjugado BNTX-4-ferritina se aplicó una solución de tiocianato de sodio 3 M. Finalmente se lavó la columna con el amortiguador de la corrida. La fracción utilizada para los estudios de microscopía electrónica fue la que se despegó por el tiocianato de sodio.

III. CROMATOGRAFÍAS DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE LAS TOXINAS NTX, II-9.2.2 Y II-10.

En las figuras 10, 11, 12, 13 y 14 se muestran los perfiles de las cromatografías en Bio-gel P-2 de los derivados de NTX-Rodamina, II-9.2.2-Rodamina, II-10-Rodamina, II-9.2.2-Fluoresceína y II-10-Fluoresceína, posteriores a la reacción de derivatización. Puede observarse en todas ellas un patrón común de 2 componentes, que en ocasiones se sobrelapan. Por su absorbencia a 280 nm puede afirmarse que en ambos picos está la toxina presente. Y por sus absorbencias a 540 nm (absorbencia máxima aproximada para la tetra-metil-rodamina) y a 490 nm (absorbencia máxima aproximada para la fluoresceína) puede afirmarse que en estos 2 picos el péptido se encuentra marcado con el cromóforo respectivo. El material colectado en estos 2 componentes cromatográficos representa a la toxina nativa como la mono, bi o multímarcada.

NTX-RODAMINA (BIO-GEL P-2)

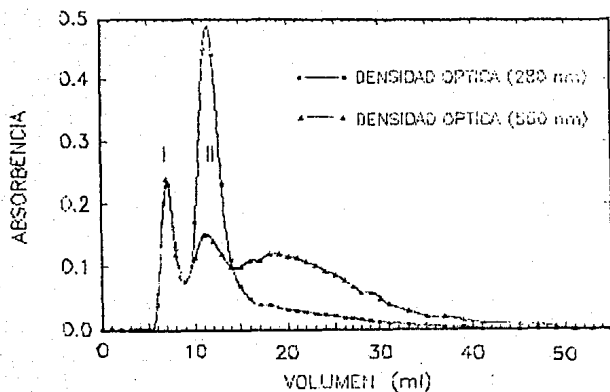


Fig. 10. Perfil cromatográfico del producto de la derivatización de la noxiustoxina, NTX, con tetrametil-rodamina en una columna de filtración por peso molecular P-2. Los derivados obtenidos en la reacción de derivatización de la noxiustoxina, NTX, con rodamina se hicieron pasar por una columna (0.9 x 30 cm) de filtración en gel Bio-gel P-2 equilibrada y eluida en amortiguador de acetato de amonio 200 mM, pH 6.8, con un flujo aproximado de 48 ml/hr. Se muestran las absorbencias a 280 nm (cuadros llenos) así como la absorción de fluorescencia a 550 nm (triángulos llenos). Se colectaron los picos que absorbieron a 280 y 550 nm: I y II, y se realizó un espectro a cada uno de ellos (Fig.20).

II-9.2.2.-Rodamina
(P-2)

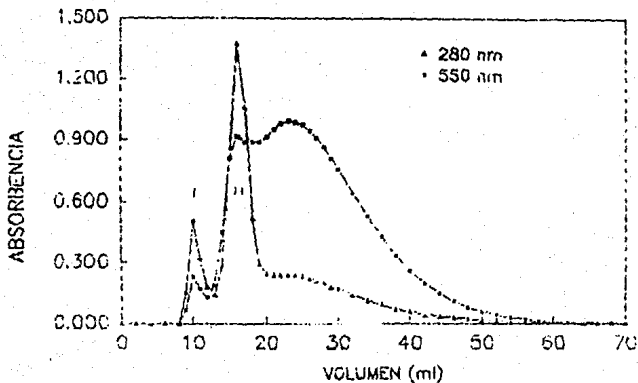


Fig. 11. Perfil cromatográfico de los productos de la reacción de derivatización de la toxina II-9.2.2 de C. noxius con tetrametilrodamina en una columna de Bio-Gel P-2. Las condiciones de la corrida fueron iguales que las empleadas en la figura 10. Los cuadros llenos indican la absorbancia a 550 nm. Los triángulos llenos indican la absorbancia a 280 nm. Se colectaron los componentes I y II para utilizarlos en los experimentos subsecuentes.

II-10-Rodamina
(P-2)

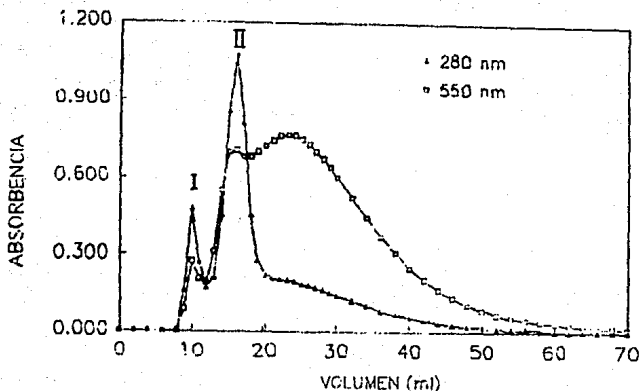


Fig. 12. Perfil cromatográfico de los compuestos obtenidos en la reacción de marcaje de la toxina II-10 de *C. noxius* con tetrametil-rodamina en una columna de exclusión por peso molecular Bio-Gel P-2. Las condiciones del corrimiento se encuentran descritas en la figura 10. Los triángulos llenos indican la absorbencia a 280 nm. Los cuadros vacíos muestran la absorbencia a 550 nm. Los picos I y II se colectaron para las caracterizaciones subsiguientes.

II-9.2.2 - Fluoresceína
(P-2)

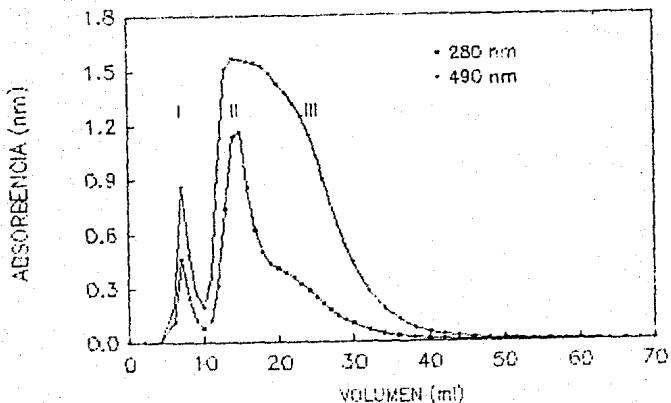


Fig. 13 Perfil cromatográfico del producto de la reacción de marcaje de la toxina II-9.2.2. de C. noxius con fluoresceína. Las condiciones del corrimiento de la columna fueron las mismas utilizadas en la figura 10. Los cuadros llenos indican la absorbancia a 280 nm, y los triángulos invertidos indican la absorbancia a 490 nm. Los componentes I y II se colectaron para las siguientes caracterizaciones.

II-10-Fluoresceína
(P-2)

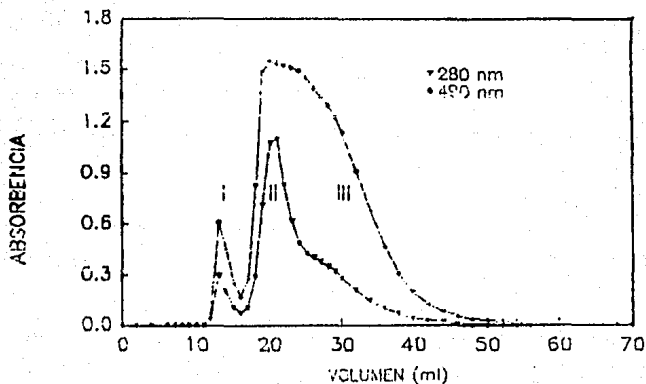


Fig. 14. Perfil cromatográfico de la reacción de derivatización de la toxina II-10 de *C. noxius* con fluoresceína en una columna de exclusión por peso molecular de Bio-Gel P-2. Las condiciones de corrimiento fueron las mismas usadas en la columna de la figura 10. Los triángulos invertidos representan la absorción dada a 280 nm, y los rombos, la absorción a 490 nm. Los componentes I y II se colectaron para su caracterización.

Todos los compuestos obtenidos en las columnas de Bio-Gel P-2 mostrados en las figuras 10 a 14, se pasaron por columnas de intercambio iónico de Carboximetil-celulosa (CMC-32) para separar por carga los diferentes productos obtenidos en la reacción de derivatización, así como las toxinas que no se marcaron con el fluoróforo correspondiente. Los resultados de estas cromatografías para los componentes NTX-rodamina II (NTX-RII), II-9.2.2-rodamina I (II-9.2.2-RI), II-9.2.2-fluoresceína II (II-9.2.2-FII) y II-10-rodamina II (II-10-RII) se encuentran en las figuras 15, 16, 17 y 18, respectivamente. En casi todas estas columnas (excepto la columna de CMC-32 con el compuesto II-9.2.2-rodamina I,) no se encontró toxina libre de cromóforo.

En la figura 16 se puede apreciar la cromatografía en CMC-32 del compuesto II-9.2.2-RI. Se separaron 3 componentes: 1, 2 y 3. Los componentes 1 y 2 corresponden a la toxina marcada. Por el comportamiento cromatográfico (volumen de elución a una molaridad de cloruro de sodio dada), y por la absorción a las longitudes de onda de 280 nm (proteína) y 550 nm (rodamina) del componente 3 puede pensarse que corresponde a la toxina nativa, no-marcada.

NTX-Rodamina II
(CMC-J2)

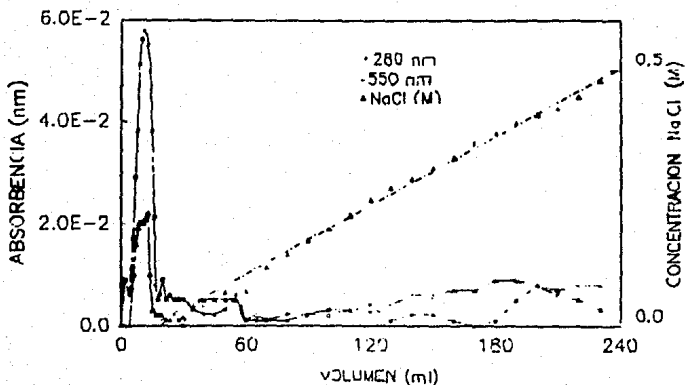


Fig. 15. Cromatografía de intercambio iónico del componente NTX-R11 obtenido en cromatografías anteriores. Se aplicó la NTX-R11 (previamente dializada para eliminar la tetrametil-rodamina que pudiese estar libre) a una columna de Carboximetil-celulosa (1.1 x 12.5 cm), equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. Se eluyó a un flujo de 30 ml/hr mediante un gradiente salino de cloruro de sodio de 0.0 a 0.5 M (250 ml en cada vaso del aparato del gradiente). En este cromatograma no se observa una separación mayor del compuesto aplicado.

II-9.2.2-Rodamina I
(CMC-32)

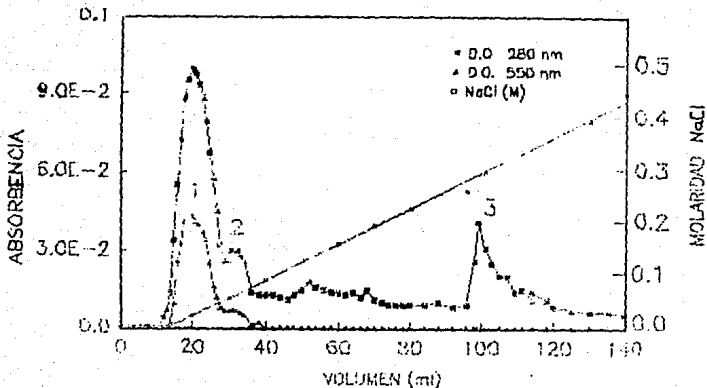


Fig.16. Cromatografía de la fracción II-9.2.2-rodamina I en una columna de CMC-32. Se hizo pasar el componente II-9.2.2-Rodamina I por una columna de CMC-32 (0.9 x 15 cm) equilibrada y eluida en el mismo amortiguador utilizado en la figura 15. El gradiente salino fue de 0.0 a 0.5 M (50 ml en cada vaso del aparato de gradiente), y se pasó a un flujo de 20 ml/hr. Se separaron tres componentes, las fracciones 1 y 2 corresponden a la toxina marcada, mientras que la fracción 3 corresponde a proteína libre del cromóforo. Estos componentes se colectaron por separado para su posterior caracterización espectroscópica y funcional.

II-9.2.2-Fluoresceína II
(CMC-32)

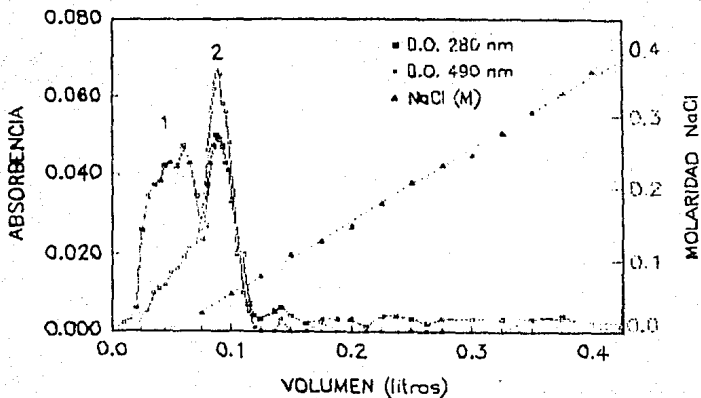


Fig. 17. Cromatograma de II-9.2.2-fluoresceína II en una columna de CMC-32 (0.9 x 15 cm). Esta columna se corrió en las mismas condiciones que la de la figura anterior, excepto que el gradiente salino contenía 250 ml por recipiente del aparato, y que se eluyó con un flujo aproximado de 30 ml/hr. Se colectaron fracciones de 2.5 ml. Puede apreciarse en esta cromatografía la separación de 2 componentes de II-9.2.2-FII.

II-10-Rodamina II

(CMC-32)

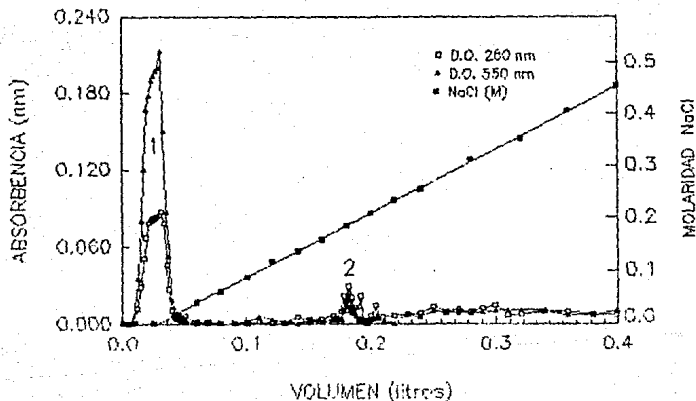


Fig.18. Cromatografía de intercambio iónico de II-10-rodamina II. Las condiciones del corrimiento fueron iguales a las de la columna de la figura anterior. Se aplicó el gradiente salino (200 ml/recipiente) con un flujo de 20 ml/hr, y se colectaron fracciones de 2 ml cada una. Se separaron así dos componentes, denominados 1 y 2.

IV. ESPECTROSCOPIA DE BARRIDO DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE LAS TOXINAS II-9.2.2, II-10 Y NTX.

En las figuras 19a y 19b se encuentra el perfil del espectro de cuatro derivados de las toxinas y de los cromóforos. En todas ellas podemos observar que existe absorción a 280 nm y a 540 (ó 490) nm, lo cual corresponde a las absorciones de proteína y al fluoróforo (rodamina o fluoresceína), respectivamente.

V. ENFOQUE ISOELECTRICO DE NTX-RI Y NTX-RII.

La acilación de la toxina produce la pérdida de cargas positivas en ella. Por esto se realizó un enfoque isoelectrico de los compuestos NTX-RI y NTX-RII para observar el número de componentes posibles que ambos contenían.

Como se puede observar en la figura 20, la NTX-RI presentó dos componentes; y la NTX-RII presentó tres, lo cual indica que en ella existen tres grupos de NTX derivatizada, probablemente con diferente número de moléculas de rodamina unidas a sus lisinas.

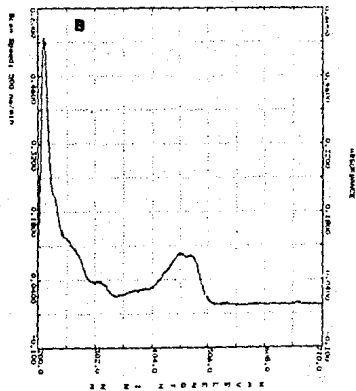
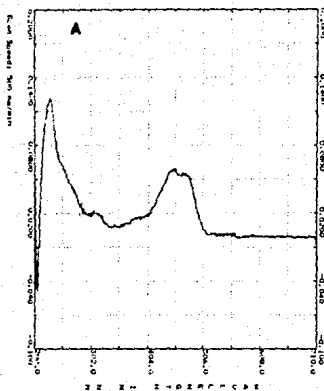


Fig. 19a. Espectro de absorción de dos de los compuestos sintetizados en este trabajo: II-9.2.2-FII-2 (A) y II-10-FII (B). Por las absorbencias a 280 nm (proteína) y 490 nm (fluoresceína) presentadas por estos compuestos puede afirmarse que las toxinas se encuentran marcadas por el cromóforo.

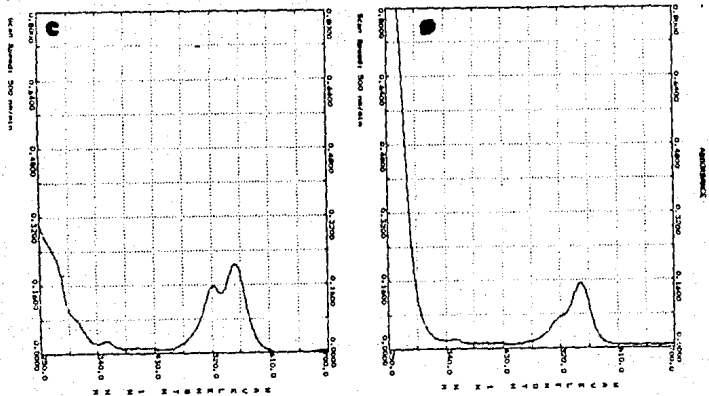


Fig. 19b. Espectro de absorción de los compuestos NTX-RI (C) y NTX-RII (D). Por las absorbancias a 280 nm (toxina) y a 550 nm (rodamina) presentes en ambos compuestos, se puede afirmar que ambos compuestos están marcados por rodamina.

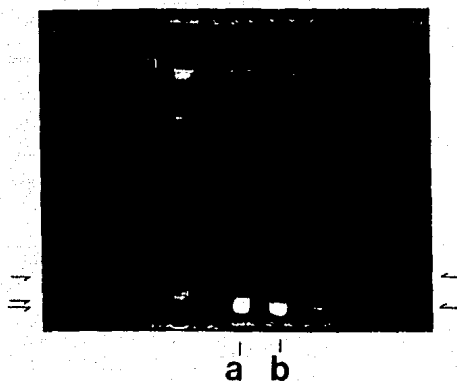


Fig. 20. Isoelectroenfoco en geles de poliacrilamida de los derivados NTX-RI y NTX-RII. En el carril A se muestra el resultado de este corrimiento para el compuesto NTX-RII; se puede observar la presencia de tres componentes. En el carril B se observa la presencia de dos componentes para la NTX-RI. El gradiente de pH está indicado en la parte izquierda de la figura. Se utilizó una lámpara de luz ultravioleta para visualizar los componentes de cada tubo.

VI. DESPLAZAMIENTOS DE LAS TOXINAS DERIVATIZADAS.

En las tablas 9 y 10 se muestran los resultados de los desplazamientos por los derivados fluorescentes de las toxinas bloqueadoras del canal de Na⁺, es decir, la II-9.2.2 y la II-10.

TABLA#9

DESPLAZAMIENTO DE LA TOXINA GAMMA YODADA DE Tityus serrulatus POR EL PEPTIDO II-9.2.2 de Centruroides noxius Y DE SUS DERIVADOS FLUORESCENTES EN MEMBRANAS SINAPTOSOMALES DE RATON.

TOXINA	PORCENTAJE DE DESPLAZAMIENTO
II-9.2.2	57.64%
II-9.2.2-RI-1	52.43%
II-9.2.2-RI-2	58.70%
II-9.2.2-RII	59.39%
II-9.2.2-FII-1	29.29%
II-9.2.2-FII-2	47.09%

* Se utilizaron 200 ug de membranas sinaptosomales de cerebro de ratón (descrito en la parte de material y métodos). La concentración final estimada para todas las toxinas utilizadas fue de aproximadamente 50 nM. Estos desplazamientos puntuales se realizaron por duplicado.

Como la toxina gamma de Tityus serrulatus y la toxina II-9.2.2 de Centruroides noxius compiten por el mismo sitio del canal de sodio, con estos experimentos se pretendía poner en evidencia la eficiencia de desplazamiento de la toxina nativa yodada versus sus derivados. Los resultados indican que la mayoría de las toxinas marcadas conservaron su actividad biológica; solamente el componente II-9.2.2.FII-1 disminuyó a la mitad su poder de desplazamiento.

TABLA#10

DESPLAZAMIENTO DE LA TOXINA GAMMA YODADA DE Tityus serrulatus POR EL PEPTIDO II-10 DE Centruroides noxius Y SUS DERIVADOS FLUORESCENTES.

TOXINA	PORCENTAJE DE DESPLAZAMIENTO
II-10	41.5%
II-10-RI	8.9%
II-10-RII-1	47.9%
II-10-RII-2	79.7%
II-10-FII	47.3%

*Se utilizaron membranas sinaptosomales de cerebro de ratón (200 ug de proteína determinado por ensayo de Bradford). La concentración final de la toxina gamma utilizada fue de 50 nM, y la concentración final estimada para las toxinas derivatizadas fue de aproximadamente 50 nM. Estos desplazamientos puntuales se realizaron por duplicado.

También la toxina de C. noxius II-10 compite con la toxina gamma de T. serrulatus en su unión al canal de sodio. Los derivados II-10-RII-1 y II-10-RII-2 conservaron su actividad biológica. Esto no fue así en el caso del compuesto II-10-RI.

VII. RADIOMARCADO DE LA NOXIUSTOXINA.

Los resultados de la iodación de la NTX se encuentran en la fig. 21. Para la iodación se utilizaron 87.7 ug de la NTX; asumiendo un 85% de recuperación del péptido, en las fracciones 6 a 10, puede deducirse que la fracción 7 quedó a una concentración final de 12.7 uM (53.6 ug/ml), y la fracción #8 a 31.6 ug/ml. En los experimentos de desplazamiento se utilizó la fracción #7 de esta cromatografía.

IODACION NTX

(SEPHADEX G-10)

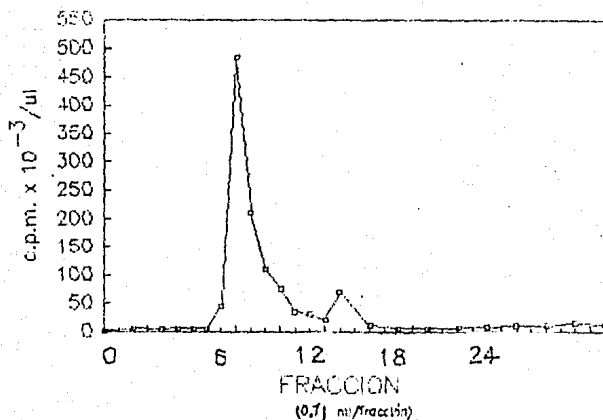


Fig. 21. Iodación de NTX por el método de lactoperoxidasa (40). La reacción de yodación de la NTX fue detenida pasando el producto de dicha reacción por una columna de Sephadex G-50 (volumen=10 ml), equilibrada con amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M, cloruro de sodio 0.1 M, pH 7.4. Se recogieron fracciones de 0.71 ml y se tomó 2 ul de cada muestra para medir las cuentas por minuto (c.p.m.) en un contador gamma. Se juntaron las fracciones 6 a 10 de este corrimiento. La actividad específica de la NTX yodada resultó ser de 20.2 Ci/mmol. La metodología utilizada para esta yodación tiene una alta reproducibilidad. Existe aproximadamente un átomo de ¹²⁵I por cada molécula de NTX.

En la tabla #11 se muestran los resultados de los experimentos de desplazamiento de la NTX iodomarcada por la NTX fría. Asimismo se muestran los experimentos de desplazamiento de la NTX caliente por los compuestos derivatizados con rodamina.

TABLA#11. ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE LA NOXIUSTOXINA-¹²⁵I CON NTX Y LOS DERIVADOS NTX-RI Y NTX-RII.

Condiciones del ensayo	cpm	% de unión específica
membranas sinaptosomales + ¹²⁵ I-NTX	11930	
sinap.+NTX + ¹²⁵ I-NTX	5470	100%
sinap.+NTX-RI + ¹²⁵ I-NTX	46946	626.7%
sinap. + ¹²⁵ I-NTX + NTX-RI	46876	625.6%
NTX-RI + ¹²⁵ I-NTX + 0 sinap.	48084	644.3%

*Las condiciones del desplazamiento fueron las siguientes: a las membranas sinaptosomales de ratón (200 ug de proteína) se les añadió los compuestos en cuestión en el orden que se presenta en la tabla. "sinap."= membranas sinaptosomales. La concentración final de ¹²⁵I-NTX fue de 50 nM, y de NTX fría y derivatizada (estas últimas son concentraciones estimadas) de 5 uM. En promedio se añadieron 7.2×10^5 cuentas por minuto de la NTX yodada.

Podemos observar primero que la toxina nativa sí desplazó a la caliente. Y aparentemente aumenta el pegado de la toxina caliente en presencia de los derivados fluorescentes. Sin embargo, como puede observarse en las incubaciones con la toxina caliente y la fría en ausencia de sinaptosomas, también aumentó el número de cuentas en los filtros. Esto último sugiere que, por alguna razón, la toxina fluorescente está interactuando de alguna manera con la caliente de tal manera que aumenta el pegado de ésta última al filtro, y no a los sinaptosomas. Esto es el pegado

inespecífico al filtro.

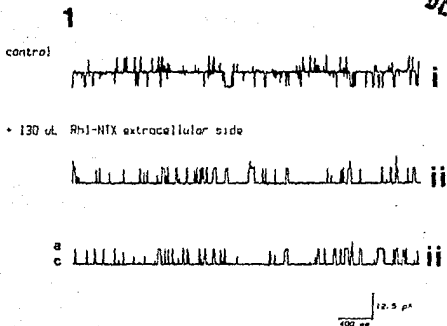
Por este motivo, para probar la actividad de los diferentes compuestos de NTX-R, y con las facilidades del lab. del Dr. Roberto Coronado, Jeffrey Smith de Baylor College of Medicine, probó la actividad de la NTX-RI y de la NTX-RII en experimentos de reconstitución del canal de $K(Ca^{++})$ en bicapas lipídicas.

En la figura 22 se muestran los resultados de estos experimentos.

La NTX-RI redujo la probabilidad de apertura del canal de $K(Ca^{++})$ de 80% en el control, en ausencia de toxina, a 30% en presencia de 130 μ l de NTX-RI (por análisis de aminoácidos se determinó que se encontraba a una concentración de 54 μ M). La fracción de la corriente total del canal de $K(Ca^{++})$ se redujo de 34% en el control a 1% en la presencia de 130 μ l de NTX-RII (que se encontraba a una concentración de 54 μ M). Se ha reportado que la noxiustoxina nativa, en este mismo sistema, y añadida del lado trans (exterior) a una concentración final de 800 nM reduce la probabilidad de apertura de este canal de 85% a 44% (para más detalles ver referencia 64).

Es decir, el marcaje de la NTX con rodamina produjo una actividad 60 veces menor que la de la toxina nativa. Sin embargo, permanecen con su capacidad de bloquear el canal de potasio dependiente de calcio.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



DONADO POR D. G. D. - B. C.

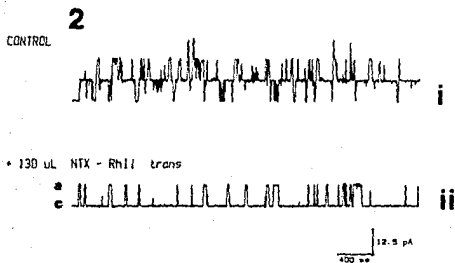


Fig. 22. Se registró el efecto de NTX-RI y NTX-RII en las corrientes de canales de potasio dependientes de calcio de túbulos T de músculo esquelético de rata. Esto se hizo mediante la incorporación de este canal en bicapas lipídicas. 1.- En la parte "i" la probabilidad de apertura (P.a.) del canal fue de 0.80, es decir, de 80%; en el trazo "ii" se muestra el efecto de NTX-RI añadida "trans" que reduce la P.a. a 0.30. 2.- En el trazo "i" la P.a. del canal fue de 0.34; la parte "ii" muestra que la adición de NTX-RII redujo la P.a. del mismo canal a 0.01. Los registros se tomaron a 0 mV. (a indica que el canal se encuentra abierto, a indica que éste está cerrado).

VIII. FOTOBLANQUEO.

La figura 23 muestra el resultado de un experimento de fotoblanqueo realizado en cocultivos de músculo estriado y neuronas de médula espinal de rata (cultivados por Laurence Elmer del departamento de Fisiología y Biofísica Molecular de Baylor College of Medicine), e incubados en presencia de NTX-RI disuelta en PBS, a una concentración final de 0.5 μM . Se enfocó el haz del láser a las células musculares del cultivo. En el eje de las abscisas se muestra la señal de fluorescencia: antes (100% de fluorescencia), durante y después del fotoblanqueo (40%). Puede verse que básicamente no hay recuperación de la señal, lo cual habla de poca movilidad del receptor de la NTX-RI.

También se puede observar que la constante de difusión de la toxina, y por ende, de su receptor, el canal de $\text{K}^+(\text{Ca}^{++})$ es de 4.03×10^{-10} , obteniéndose una recuperación del 16% de los canales en el punto del fotoblanqueo. Todo esto indica que el canal de $\text{K}^+(\text{Ca}^{++})$ en cultivos de músculo estriado y neuronas de rata es esencialmente inmóvil.

En la figura 24 se muestran el promedio de los resultados de 22 experimentos de fotoblanqueo que realicé para esta tesis. La constante de difusión del receptor fue de 4.9×10^{-10} . La recuperación de la señal fue de 21%.

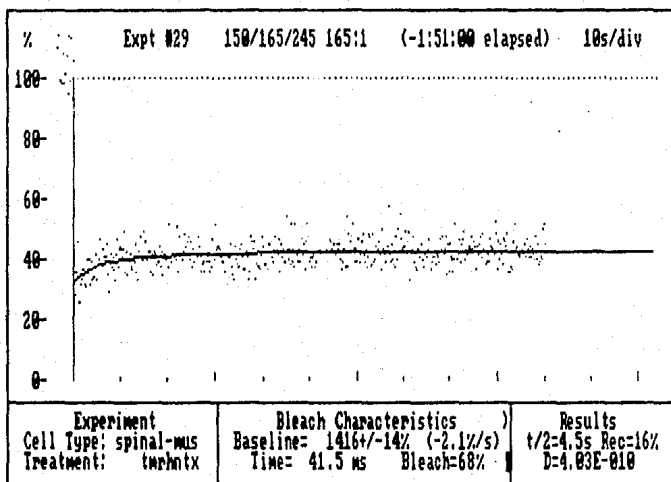


Fig. 23. Experimento de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo. Curva representativa de la fluorescencia emitida por NTX-RI en cocultivos de músculo estriado y neuronas de médula espinal. Se marcaron las células en cultivo con NTX-RI a una concentración final de 0.5 μM , como se describe en la parte de material y métodos, y las mediciones de FRAP se llevaron a cabo a 22 °C. Los puntos representan los fotones contados en 40 msec. La línea representa a la curva de la recuperación de fluorescencia que mejor se ajusta a la regresión no-lineal, generada por la computadora, para un proceso de difusión lateral, DL. Fotoblanqueo del músculo innervado utilizando un objetivo de 100x con un radio de 0.85 μm . El coeficiente de difusión, D, para este experimento fue de $4.03 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{seg}$, y se tuvo una recuperación de la marca de 16%.

$\bar{D} = 4.9E-010$
+/- $2.6E-010$
Rcv'y = 21%
Pre = 1765

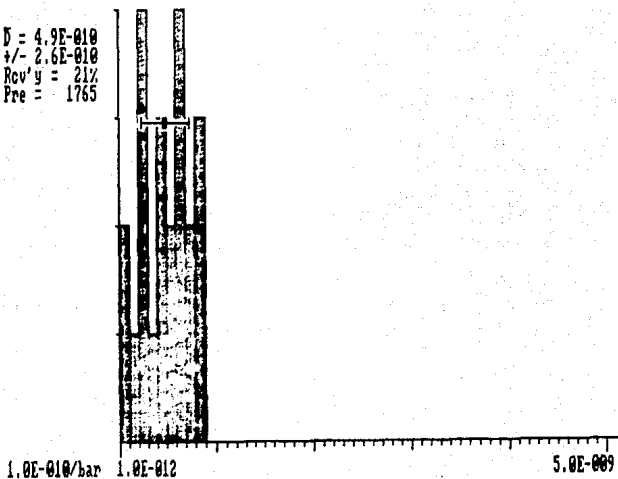


Fig. 24. Promedio de los resultados de 22 experimentos de FRAP en cocultivos de músculo estriado y neuronas de médula espinal. El eje de las abscisas representa el número de experimentos. La ordenada indica los valores de la recuperación de la señal después del fotoblanqueo. El coeficiente de difusión fue de 4.9×10^{-10} , con una recuperación promedio de la señal de 21%.

DISCUSION.

a) Aspectos generales de la tesis.

Los péptidos que bloquean específicamente y de manera selectiva canales iónicos son herramientas fundamentales y versátiles para el estudio de los canales iónicos.

Se han purificado con anterioridad las toxinas del alacrán de Nayarit Centruroides noxius: II-9.2.2, II-10 y II-11 (noxiustoxina) (21, 46, 47). También ha sido publicado su modo de acción. Dichas toxinas bloquean de manera selectiva canales iónicos en membranas excitables: 1) la II-9.2.2 y II-10 bloquean específicamente el canal de sodio (12); 2) la noxiustoxina bloquea diferentes tipos de canales de potasio, unos dependientes de voltaje en axón gigante de calamar, y otros activados por calcio en músculo esquelético de conejo (13, 14, 64).

En este trabajo se describen métodos para la preparación de derivados de neurotoxinas del alacrán C. noxius (II-9.2.2, II-10 y II-11) marcados con sondas fluorescentes, con ^{125}I (para la NTX), y de anticuerpos monoclonales contra uno de estos péptidos (noxiustoxina) marcados con ferritina.

Estos péptidos fueron purificados y después fueron marcados con diferentes tipos de moléculas sin que por ello perdieran su de modo significativo su actividad biológica.

La mayoría de los derivados de estas toxinas conservaron su actividad biológica después de ser marcados *. Esta conservación se documentó en los experimentos de unión en membranas sinaptosomales, para las toxinas II-9.2.2 y II-10 marcadas con moléculas fluorescentes, y en los experimentos de reconstitución de canales en bicapas planas para la noxiustoxina **.

Estos derivados permanecen con su afinidad a los canales de Na^+ o de K^+ , de membranas excitables; también retienen su afinidad por las toxinas en el caso de los anticuerpos monoclonales a II-11, como se pudo corroborar en la columna de afinidad que se realizó. En esta columna se separaron los anticuerpos conjugados que permanecieron con su afinidad por la NTX de aquéllos que no retuvieron esta actividad.

* Para el marcaje de las toxinas II-9.2.2 II-10 de C. noxius se utilizó la metodología original descrita por Angelides y Nutter (43), sin hacer modificaciones importantes a la técnica (añadiendo rodamina en un exceso molar 3 veces superior a las lisinas totales de la toxina).

Sin embargo, al aplicar este método para la derivatización de la NTX, se observó que la toxina perdía completamente su actividad biológica. El análisis de aminoácidos mostró una alteración importante en el contenido de lisinas libres en el derivado. Es por esto que se decidió disminuir diez veces la proporción de rodamina:lisinas de NTX de 3:1 a 0.3:1. Utilizando esta modificación, la NTX-rodamina conservó su actividad biológica. Por tanto, puede afirmarse que las lisinas parecen ser importantes para definir la carga neta y la actividad biológica de la NTX.

** En los experimentos de desplazamiento de ^{125}I -NTX se observó que existe un aumento en la radiactividad retenida por el filtro, cuando está en presencia de los compuestos NTX-RI y NTX-RII incluso en ausencia total de su receptor en las membranas sinaptosomales. Esto puede quizás ser debido a que la presencia de la toxina derivatizada con rodamina cause un aumento de la unión inespecífica de la toxina yodada al filtro.

La conservación de la estructura nativa de estos compuestos los hace útiles para el estudio de la estructura y dinámica de los canales de Na^+ y de K^+ .

b) Estudios de microscopía electrónica.

Se realizaron unos estudios con microscopía electrónica buscando los posibles sitios de unión de la NTX en la corteza cerebral y en sinaptosomas de ratón. Sin embargo, no se encontraron resultados claros, posiblemente debido a un tiempo muy corto de incubación de los tejidos con la noxiustoxina, (un minuto). Ahora sabemos que se alcanza el equilibrio de enlace a los 30 minutos aproximadamente. Deberán rehacerse estos estudios con tiempos de incubación adecuadamente largos.

c) Estudios de movilidad de canales iónicos.

Se presenta aquí la primera serie de experimentos para el estudio de la dinámica del canal de potasio dependiente de calcio, $\text{K}^+(\text{Ca}^{++})$, utilizando un derivado de la noxiustoxina con rodamina, en co-cultivos de músculo estriado de rata y neuronas de médula espinal. Se utilizó la técnica de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP) para medir la movilidad de los canales de potasio dependientes de calcio en el sistema mencionado.

La recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP), (descrito en la parte de material y métodos) es una

técnica muy utilizada actualmente para medir las movibilidades de las proteínas membranales; sirve para diferenciar de forma dinámica la posición de receptores celulares, que pueden estar fijos o bien pueden moverse en el plano de la membrana celular (3, 43, 57).

Los resultados obtenidos en los estudios de FRAP indican que en cocultivos de neuronas y músculo esquelético, existe una población importante de canales de $K^+(Ca^{++})$ de la membrana muscular que permanece inmóvil en la escala de tiempo del experimento ($\tau = 10\text{min.}$), con constantes de difusión del orden de 10^{-10} a 10^{-9} . Cabe comentar que de manera empírica se observó que estos canales se encuentran en "parches" en las células musculares de los cultivos.

En el laboratorio de Kimon Angelides se han publicado estudios para medir la movilidad de los canales de sodio utilizando como marcador una toxina del alacrán Leiurus quinquestriatus en cultivos de miocitos y también en co-cultivos de músculo y neuronas de rata (3, 4). Observaron que los canales de sodio de los cultivos de músculo, se mueven en la membrana libremente, y en cambio en las células musculares innervadas, este canal pierde dicha libertad de movimiento. Además, en fotografías hechas con microscopio de fluorescencia, se observó que en los cultivos de músculo solo, los canales de sodio se localizan de manera difusa en toda la superficie membranal. En cambio, en los co-cultivos de músculo y neuronas, estos canales se encontraban confinados a la región de la unión neuromuscular, co-localizados con los receptores de acetilcolina.

Una característica importante de la biología celular neuronal es la segregación anatómica de componentes de superficie en dominios discretos y dominios funcionalmente significativos. Ejemplos evidentes de esto son la estructura de la sinapsis y su configuración post-sináptica que contiene una alta densidad de receptores de transmisores y la segregación de muchos otros componentes a las dendritas, soma celular, axones o incluso dominios locales en estas áreas (18).

La movilidad es importante en algunos casos. Por ejemplo la agregación por difusión de algunos receptores a hormonas en microagregados para luego ser endocitados (6); el confinamiento de receptores de acetilcolina en la placa neuromuscular; y el de los receptores de lectinas en los linfocitos (6, 24). Además, para el mantenimiento de la polaridad en las neuronas, se requiere que la membrana esté organizada a largas distancias.

La movilidad de los canales de K^+ , los mecanismos por medio de los cuales se distribuyen en las neuronas y músculos, y el mantenimiento de esta distribución en la superficie de sus membranas son factores importantes para la fisiología de las células excitables.

Hay dos sistemas específicos que se han usado para investigar los mecanismos encargados de los procesos de segregación: la placa neuromuscular (en donde los receptores de acetilcolina están agregados en la región post-sináptica); y los nodos de Ranvier, en donde están segregados los canales de Na^+ .

Para entender los mecanismos celulares y los factores que

durante la diferenciación neuronal y el desarrollo inician la compartimentalización, y aquellas estructuras celulares que mantienen esta regionalización, en este trabajo se midió la movilidad lateral de los canales de $K^+(Ca^{++})$ en músculo estriado en co-cultivo con neuronas, en donde se observó que permanecen inmóviles.

Este estudio es un prerrequisito para examinar las influencias celulares que determinan formación de estructuras especializadas en la membrana del músculo esquelético.

Las moléculas lipídicas tienen una difusión rápida y homogénea en las membranas plasmáticas de células en cultivo. Los lípidos se difunden en la membrana a una velocidad menor o igual de 10^{-8} cm^2/seg . Por ejemplo: el coeficiente de difusión del lípido 3,3'-dioctadecilindo-carboxicianina (diI) es de aproximadamente 10^{-8} cm^2/seg en distintos tipos de células (57). Normalmente la fluorescencia de diI vuelve a niveles basales poco después del pulso de fotoblanqueo, indicando que la mayor parte de la fluorescencia observada se mueve libremente.

En cambio, las proteínas de la superficie celular existen de dos maneras: móviles e inmóviles, en donde las proteínas móviles se mueven más despacio que diI. La fracción inmóvil presenta coeficientes de difusión del orden de 10^{-12} cm^2/seg , y la fracción móvil de 10^{-11} a 10^{-10} cm^2/seg (1).

Diferentes tipos de interacciones determinan las velocidades de

difusión de los lípidos y proteínas membranales:

La movilidad del lípido d_{II} está determinada por la viscosidad de la matriz lipídica en que se encuentra. De hecho, la movilidad de algunas proteínas también está determinada por la viscosidad de la bicapa lipídica. Un ejemplo sería la rodopsina de los anfibios (43).

Sin embargo, algunas proteínas, involucradas en procesos de activación celular y cuya rápida agregación es necesaria para la transmisión de señales a la célula y para disparar respuestas específicas, como los receptores para insulina, factor de crecimiento epidérmico de fibroblastos, IgE de mastocitos, alfa-bungarotoxina (receptor de acetilcolina) tienen coeficientes de difusión mayores a 10^{-9} cm^2/seg . Es más, tienen una recuperación incompleta de la fluorescencia previa al fotoblanqueo, lo cual indica que una parte de estas proteínas es inmóvil en el tiempo de medición (citado en referencia 23).

Además, las proteínas móviles se mueven mucho más despacio que el lípido d_{II} o de lo que se esperaría simplemente por una mayor resistencia debida al mayor tamaño de las proteínas. Por lo tanto se piensa que además de la resistencia dada por la bicapa lipídica, deben haber interacciones y fuerzas que restrinjan la movilidad de las proteínas (revisado en 1).

Existen diversos factores que pueden alterar la disposición de macromoléculas en la membrana, como por ejemplo elementos del

cito- y exoesqueleto que están adyacentes a la membrana:

Se han encontrado grandes formaciones estructuradas del citoesqueleto junto a membranas celulares, o a regiones de ellas que contienen proteínas membranales inmóviles o altamente localizadas. Por ejemplo, en regiones membranales post-sinápticas, se encuentran normalmente una proteína de 50 kD (llamada PSD-50), actina, tubulina y otras proteínas.

Aún tienen que dilucidarse los mecanismos por los cuales las proteínas membranales se unen al citoesqueleto. Puede especularse que por lo menos un elemento de unión tiene afinidad específica a la proteína membranal cuya movilidad está restringida.

Edelman en 1976 (22) sugiere una asociación dinámica entre, el citoesqueleto y conexiones a los componentes membranales. Aquí podría ser que la difusión de las glicoproteínas membranales sería relativamente rápida, pero la limitante de la velocidad sería la velocidad de disociación de receptores de estructuras del citoesqueleto. Quizás también la densidad de los polisacáridos y las interacciones entre ellos, de las glicoproteínas y glicolípidos pueden afectar su movilidad.

La recuperación incompleta de las fracciones inmóviles podría también ser debida a la unión de la sonda a componentes inmóviles extrínsecos, como la fibronectina, u otros componentes del exoesqueleto. Otra posibilidad sería la internalización por vesículas endocíticas a lisosomas.

En las neuronas mielinizadas hay dos regiones que contienen una porción electrodensa que la cubre y que se tiñe intensamente con fierro o ferrocianuro; este recubrimiento está presente solamente en dos regiones del axolema que contienen una alta densidad de canales de Na^+ : el segmento inicial y los nodos de Ranvier, y no existe en las regiones internodales del axolema, que no contienen canales de Na^+ .

Otra posibilidad más, sería que la superficie celular estuviera parcialmente dividida en dominios pequeños en comparación con el haz del laser ($>1 \mu\text{m}$). En estos dominios las proteínas se difundirían rápido, pero las barreras estructurales impedirían que atravesaran estas barreras. Sin embargo, esta posibilidad queda descartada en los estudios de Schlessinger y colaboradores (57) en los que demuestran que análogos de lípidos tienen una recuperación incompleta en células en las que ciertas proteínas membranales no la tienen.

En síntesis, es posible que el mayor determinante de la lenta difusión y de la fracción inmóvil debe incluir la interacción (aún no determinada) de los componentes membranales con componentes del cito- y exoesqueleto, ya que la modulación debida a la fluidez lipídica no sería suficiente para retardar suficientemente la difusión a los valores observados en estos casos.

Experimentos posteriores se requieren para dilucidar los mecanismos por los cuales los canales de K^+ tienen escasa movilidad en la membrana lipídica en cocultivos de músculo

estriado y neuronas.

d) Perspectivas futuras.

Las neurotoxinas fluorescentes permiten la visualización microscópica de los canales de K^+ tanto en tejido muscular como nervioso, y tienen la potencialidad de teñir una gran variedad de tejidos que presentan canales de $K^+(Ca^{++})$, y de K^+ dependientes de voltaje.

Estas herramientas desarrolladas en el laboratorio tienen sin duda una gran potencialidad para estudios acerca de la distribución y dinámica de los canales de K^+ , y seguramente contribuirán a ampliar los conocimientos acerca de la dinámica de la distribución de los canales en relación a la Fisiología: movilidad lateral en la membrana celular de neuronas y músculo diferenciado; comparar la movilidad de los canales de neuronas en desarrollo, en proceso de crecimiento axonal y en la interacción de mielinización con neuronas maduras; en qué estado del desarrollo se inmovilizan los canales de K^+ y empiezan a segregarse en la membrana plasmática.

Asimismo, será importante realizar incubaciones simultáneas de las toxinas que bloquean el canal de Na^+ marcadas con un fluoróforo, con la NTX marcada con otro; y aprovechar las propiedades de absorción y de emisión diferentes para ambos fluoróforos para poder así visualizar simultáneamente la localización de ambos canales, si se encuentran co-localizados, o

qué distribución relativa tiene un canal con el otro, en un momento del desarrollo de la célula y a lo largo de su diferenciación (20).

Será importante entender por qué algunos componentes membranales presentan coeficientes de difusión más lentos que los esperados y por qué mecanismos están inmóviles otros. Esto podría hacerse mediante la perturbación de los elementos del cito- y exoesqueleto, por medio de drogas o enzimas que afectan a éstos. Esta respuesta dará luz para entender el hecho biológico crucial de cómo y por qué están controladas la movilidad y distribución de los componentes de la superficie celular.

RESUMEN DE LA TESIS

En este trabajo se purificaron las toxinas II-9.2.2, II-10 y II-11 (noxiustoxina o NTX) del alacrán de Nayarit Centruroides noxius. Las toxinas II-9.2.2 y II-10 bloquean específicamente canales de sodio, y la NTX, diferentes tipos de canales de potasio. Se marcaron estos péptidos con moléculas fluorescentes y conservaron su actividad biológica. Se utilizó uno de estos derivados (NTX marcada con rodamina) para estudiar la difusión lateral del canal de potasio dependiente de calcio en cocultivos de neuronas y músculo esquelético de rata. Se observó que una porción importante de estos canales permanece inmóvil.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Almers, W., Stirling, C. 1984. Distribution of transport proteins over animal cell membranes. *J. Membrane Biol.* 77:169-186.
- 2.- Altamirano, F. 1899. Algunas observaciones fisiológicas sobre los efectos de la ponzoña del alacán de Jojutla. *Mem. Soc. Cient.Int. Alzate.* 14:327-330.
- 3.- Angelides, K. 1986. Fluorescently labelled Na⁺ channels are localized and immobilized to synapses of innervated muscle fibres. *Nature* 321:63-66.
- 4.- Angelides, K., Nutter, T. 1983. Preparation and characterization of fluorescent scorpion toxins from Leiurus quinquestriatus quinquestriatus as probes of the sodium channel of excitable cells. *J. Biol. Chem.* 258(19):11948-11954.
- 5.- Avrameas, S. 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6:43-52.
- 6.- Axelrod, D. 1983. Lateral motion of membrane proteins and biological function. *J. Membrane Biol.* 75:1-10.
- 7.- Axelrod, D., Koopel, D., Schlessinger, J., Elson, E. Webb, W. 1976. Mobility measurement of analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 16:1055-1069.
- 8.- Barhanian, J., Giglio, J.R., Léopold, P., Schmid, A., Vilela Sampaio, S., Lazdunski, M. 1982. Tityus serrulatus venom contains two classes of toxins. Tityus gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 257(21):12553-12558.
- 9.- Bennet Jr, J.P. 1978. Methods in binding studies. Neurotransmitter receptor binding. ed. by H.I. Yamamura Raven Press, New York. p.p. 57-90.
- 10.- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-253.
- 11.- Cárabez, A., Possani, L.D. 1982. Electron microscopic evidence for scorpion toxin binding to synapses of rat brain cortex. *Neurosci. Lett.* 32:103-108.
- 12.- Carbone, E., Prestipino, G., Franciolini, F., Dent, M.A.R., Possani, L.D. 1984. Selective modification of the squid giant axon Na currents by Centruroides noxius toxin II-10. *J. Physiol.*

- 13.- Carbone, E., Prestipino, G., Spadavecchia, L., Franciolini, F., Possani, L. 1987. Blocking of the squid giant axon K⁺ channel by noxiustoxin: a toxin from the venom of the scorpion Centruroides noxius. Pflugers Arch. 408:423-431.
- 14.- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., Maelicke, A. 1982. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. Nature 296:90-91.
- 15.- Catterall, W.A. 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20:15-43.
- 16.- Catterall, W. A. 1977. Membrane potential-dependent binding of scorpion toxin to the action potential Na⁺ ionophore. Studies with a toxin derivative prepared by lactoperoxidase-catalyzed iodination. J. Biol. Chem. 252:8660-8668.
- 17.- Chard, T. Elsevier biomedical laboratory technics in Biochemistry and Molecular Biology. Ed. T. Work and E. Work. An introduction to radioimmunoassay and relates technics. p.p.1-26.
- 18.- Coombs, J.S., Eccles, J.C., Fatt, P. 1955. The electrical properties of the motoneurone membrane. J. Physiol. (Lond) 130:291-325.
- 19.- Cooper, T. 1977. The tools of Biochemistry. Wiley, New York. p.p.1-56.
- 20.- Darbon, H., Angelides, K. 1984. Structural mapping of the voltage-dependent sodium channel. Distance between the tetrodotoxin and Centruroides suffusus suffusus II beta-scorpion toxin receptors. J. Biol. Chem. 258(10):6074-6084.
- 21.- Dent, M.A.R., Possani, L.D., Ramirez, G.A., Fletcher, J.R. 1980. Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Toxicon 18:343-350.
- 22.- Edelman, G. 1976. Surface modulation in cell recognition and cell growth. Science 192:218-227.
- 23.- Elson, E., Reidler, J. 1979. Analysis of cell surface interactions by measurements of lateral mobility. J. Supramol. Struct. 12:481-489.
- 24.- Elson, E.L., Schlessinger, J. 1979. Long-range motions on cell surfaces. The Neurosciences, 4th Study Program. MIT Press, Cambridge, Mass. p.p. 691-701.
- 25.- Fairbanks, G. 1971. Electrophoretic analysis of the mayor polypeptide of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10: 2606-2612.

26.-Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Elick, S.E., Suddath, F.L., Watt, D.D., Feldmann, R.J., Bugg, C.E. 1981. Architecture of scorpion neurotoxins: a class of membrane-binding proteins. *TIBS*. 291-296.

27.-Hartshorne, R., Tamkun, M., Montal, M. 1986. The reconstitution of sodium channel from brain. *Ion Channel Reconstitution* Ed. by Christopher Miller. Plenum Press. New York and London. p.p.337-362.

28.- Hernández, F. *Obras Completas. Tomo III. Historia Natural de la Nueva España. Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México. Primera Edición, 1959. p.p.169-173.*

29.- Hille, B. 1984. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sinauer associates, Inc. Sunderland, Mass. p.p. 58-98, 99-116, 272-328.

30.- Laskowski Jr., M., Kato, I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 593-626.

31.- Latorre, R. 1986. The large calcium-activated potassium channel. *Ion channel reconstitution.* Ed by Christopher Miller (Brandeis Univ. Waltham, Mass. Plenum Press. New York and London. p.p.144-170.

32.- Latorre, R. Alvarez, O., Cecci, X., Vergara, C. 1985. Properties of reconstituted ion channels. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14:79-111.

33.-Latorre, R., Vergara, C., Hidalgo, C. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca⁺⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:805-809.

34.- Kishida, Y., Olsen, B., Berg, R., Prockop, D. 1975. Two improved methods for preparing ferritin-protein conjugates for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 64:331-339.

35.- Marty, A. 1983. Ca⁺⁺ -dependent K⁺ channels with large unitary conductance. *TINS* 262-265.

36.- Meech, R.W. 1978. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7:1-18.

37.-Méndez Pérez, T.H. 1948. Estudios sobre la ponzoña del alacrán. VI. Inmunología. *Inmunología del veneno de alacrán. Bol. Inst. Méd. Biol. Méx.* 6:3-6.

38.- Méndez Pérez, T.H. 1949. Estudios sobre la ponzoña del alacrán. *Bibliografía general. Bol. Lab. Est. Méd. Biol. Méx.* VI:39-54.

39.- Miranda, F., Lissitzky, S. 1958. Purification de la toxine

du venin de scorpion. Biochim. Biophys. Acta 30:217-218.

40.-Morrison, M. 1970. Catalysis of iodination by lactoperoxidase. Biochemistry 9(15):2995-2997.

41.- Ocaranza, F. 1923. Estudio experimental de la acción fisiológica de la ponzoña de los alacranes de México. Primera Memoria. Veneno del Centruroides exilicauda. Bol. Inst. Hig. México. 1:113-120.

42.- Petersen, O.H., Maruyama, Y. 1984. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. Nature 307:693-696.

43.- Poo, M.M., Cone, R. 1974. Lateral diffusion in the photoreceptor membrane. Nature 247:438-440.

44.- Possani, L.D. 1983. Las toxinas del veneno de alacranes: Estructura y función. Bol. Est. Méd. Biol. Méx. 32:285-297.

45.- Possani, L.D. 1983. Structure of scorpion toxins. Handbook of Natural Toxins. Vol.2. Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms. Ed. by Anthony T. Tu. Marcel Dekker Inc. p.p.513-549.

46.- Possani, L.D., Dent, M.A.R. 1981. The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffman. Carlsberg Res. Commun. 46:207-214.

47.- Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I. 1982. The primary structure of noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffman. Carlsberg Res. Commun. 47:285-289.

48.- Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., Rode, G., Erickson, B.W. 1985. Scorpion toxins from Centruroides noxius and Tityus serrulatus. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. Biochem. J. 229:739-750.

49.- Possani, L.D., Steinmetz, W.E., Dent, M.A.R., Alagón, A.C., Wuthrichik, K. 1981. Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. Biochem. Biophys. Acta 669:183-192.

50.- Del Pozo, E.C. 1948. Los efectos musculares del veneno de escorpiones mexicanos. Bol. Inst. Est. Med. Biol. 6:59-69.

51.- Del Pozo, E.C. 1948. The action of the venom of mexican scorpion (Centruroides noxius Hoffman) on cholinesterases. Br. J. Pharmacol. 3:219-222.

52.- Del Pozo, E.C., Anguiano, L.G., González, G.J. 1944. Acciones del veneno de alacrán sobre el sistema vasomotor. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 5:227-240.

- 53.- Del Pozo, E.C., González, J., Méndez, T.H. 1945. Acciones del veneno de alacrán sobre el aparato respiratorio. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 6:77-84.
- 54.- Reisfeld, R.A., Lewis, V.J., Williams, D.E. 1961. Disk electrophoresis of basic proteins and polyacrilamide gels. Nature 195:281-283.
- 55.- Righetti, P., Drysdale, J. 1971. Isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Biochim. Biophys. Acta 236:17-28.
- 56.- Rochat, H., Bernard, P., Couraud, F. 1979. Scorpion Toxins: Chemistry and Mode of Action. Adv. Cytopharmacol. 3: 325-333.
- 57.- Schlessinger, J., Axelrod, D., Koppel, D., Webb, W., Elson, E. 1977. Lateral transport of a lipid probe and labeled proteins on a cell membrane. Science 195:307-316.
- 58.- Schlessinger, J., Elson, E. 1982. Fluorescence methods for studying membrane dynamics. Methods Exp. Phys. 20:197-227.
- 59.- Schwarz, W., Passow, H. 1983. Ca⁺⁺-activated K⁺ channels in erythrocytes and excitable cells. Ann. Rev. Phys. 45:359-374.
- 60.- Singer, S.J., Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. Science 175:720-731.
- 61.- Sitges, M., Bayón, A., Possani, L.D. 1986. Noxiustoxin, a short-chain toxin from the mexican scorpion Centruroides noxius, induces transmitter release by blocking K⁺ permeability. J. Neurosci. 6(6):1570-1574.
- 62.- Tamir, H., Rpport, M.M., Roizin, L. 1974. Preparation of synaptosomes and vesicles with sodium diatrizoate. J. Neurochem. 23:943-949.
- 63.- Umezawa, K., Aoyagi, T. 1984. Receptor purification procedures. Alan R. Liss, Inc. Cap. 9 Elimination of protein degradation by the use of protease inhibitors. p.p.139-148.
- 64.- Valdivia, H.H., Smith, J., Martin, B.M., Coronado, R., Possani, L.D. 1988. Charybdotoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the K⁺(Ca⁺⁺) channel. Febs Lett. 226(2):280-284.
- 65.- Vega Franco, L., Lia, J.M. 1966. Consideraciones epidemiológicas sobre la picadura por alacrán en la ciudad de Durango. Rev. Invest. Salud Públ. Méx. 26(1):7-21.
- 66.- Watters, J.J., Possani, L.D., Mochca-Morales, J., Hess, B. 1981. Determination of alfa-helix and beta-sheet structure in toxins purified from the venoms of Latin American scorpions. Presentado en el 4th Eur. Symposium on Animal, Plant and

Microbial Toxins, Marseille, Francia, p.p.115.

67.- Weben, K., Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244:4406-4411.

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.

BTX=batracotoxina
CMC-32=carboximetilcelulosa-32.
CTX=caribdotoxina
DL50=dosis letal media
DMSO=dimetilsulfóxido
F=éster N-hidroxisuccinimida fluoresceína
FRAP=recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo
K+(Ca++)=canal de potasio dependiente de calcio
Kd=constante de disociación
kD=kilodalton
NTX=noxiustoxina o fracción II-11 obtenido en la purificación del veneno de C. noxius
NTX-RI y NTX-RII= componentes I y II obtenidos en la cromatografía de P-2 de la reacción de marcado de la NTX
PM=peso molecular
R=5- (y 6-)carboxi-tetrametil-rodamina
rpm=revoluciones por minuto
SDS=dodecilsulfato de sodio
STT=sistema transversal de túbulos T
STX=saxitoxina
TTX=tetrodotoxina
U.D.O.=unidades de densidad óptica

II-9.2.2-RI-1, II-9.2.2-RI-2, II-9.2.2-RII, II-9.2.2-FI, II-9.2.2-FII-1, II-9.2.2-FII-2= diferentes derivados de la toxina II-9.2.2 obtenidos en columnas de Bio-Gel P-2 y/o CMC-32 después de marcarla con rodamina (R) o fluoresceína (F).

II-10-RI, II-10-RII-1, II-10-RII-2, II-10-FI, II-10-FII= derivados de la toxina II-10 obtenidos por cromatografías sucesivas de los productos de la reacción de derivatización de ésta con rodamina o fluoresceína.