



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización bioquímica del veneno del alacrán *Centruroides ornatus*, una especie de interés médico

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB Iván Alberto García Guerrero

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Georgina Gurrola Briones
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lidia Riaño Umbarila
Instituto de Biotecnología

Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani, del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca Morelos.

El trabajo fue parcialmente financiado por donativos de la Dirección General de los Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, proyectos IN203416, y por el Consejo de Ciencia y Tecnología SEP-CONACYT- 237864 concedidos al laboratorio del Dr. Possani.

El sustentante de este trabajo recibió la beca de formación de posgrado de excelencia del CONACYT, inscrita bajo el número 740685. Y apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para presentar el *trabajo "Characterization of novel toxins and mass fingerprinting from the venom of mexican scorpion Centruroides ornatus Pocock 1902"* en el Séptimo Simposio de la Sociedad Mexicana de Proteómica "*Mass Spectrometry Based Omics*" celebrado del 06 al 09 de Noviembre de 2017 en Guadalajara, Jalisco, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Georgina Gurrola por aceptar ser mi tutora de maestría y por el gran apoyo y enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por su paciencia y compartir sus conocimientos.

Al Dr. Lourival Possani por aceptarme en su laboratorio, proveernos de todos los materiales y equipos necesarios, pero sobre todo por seguir y guiar con su experiencia el avance del proyecto en cada tutorial y seminario.

A la Dra. Lidia Riaño por formar parte de mi Comité Tutorial, por todos sus valiosos comentarios y correcciones necesarias en la ejecución de los experimentos y la escritura de este trabajo.

A la Dra. Claudia Rodríguez por formar parte de mi Comité Tutorial, guiar y seguir el trabajo del proyecto.

Al Dr. Fernando Zamudio por su apoyo en los análisis de espectrometría de masas, secuenciación, por sus comentarios y apoyo en este trabajo.

Al Dr. Froylan Gómez de la Facultad de Medicina-UNAM y al Dr. Gyorgy Panyi de la University of Debrecen (Hungría) por la elaboración de los estudios de electrofisiología.

Al Biólogo Cipriano Balderas por su apoyo en la colecta, mantenimiento y ordeña de los alacranes. Gracias por apoyarme en los ensayos biológicos y tus conocimientos en la biología de los alacranes.

A la Dra. María Jiménez por todo su apoyo, técnico-científico y consejos en la realización de los experimentos. Gracias por compartir tus conocimientos, valiosos comentarios y la amistad durante este tiempo.

Al M en C Timoteo Olamendi por sus consejos en cromatografía que permitieron optimizar los procesos de caracterización y por proporcionarme las toxinas puras empleadas en los ensayos de ELISA.

Al Dr. Edson Carcamo por su valioso apoyo en la purificación de las toxinas de mamífero, por su tiempo y valiosa experiencia.

Al M en C Lepoldo Güereca por compartir sus conocimientos y valiosos consejos en los experimentos realizados.

Al Dr. Edmundo González por la colecta y asignación de especie de los alacranes empleados en el estudio.

A los Doctores Gloria Saab, Rosario Vera, Martha Pedraza, Ignacio López y Fernando Esquivel por revisar y otorgar sus valiosos comentarios en la escritura de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio, Jimena, Ivette, Alberto, Guillermo, Ignacio, Gustavo, Ilse, Everardo, Linda, Fredy, Rita, Leonel, Tere, Carmen, Ernesto, por su amistad y apoyo durante la maestría.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Relevancia de la picadura de alacrán	15
2.2. Composición de los venenos de alacrán	16
2.2.1. Toxinas que reconocen canales de Na ⁺	17
2.2.2. Toxinas que reconocen canales de K ⁺	19
2.3. Caracterización de los venenos de alacrán	20
2.4. Alacranes tóxicos a humanos en México.....	21
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO DEL PROYECTO.....	24
4.1. Objetivos particulares	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Diseño experimental	25
5.2. Veneno	26
5.3. Purificación de los componentes del veneno.....	26
5.3.1. Cromatografía de filtración en gel.....	26
5.3.2. Cromatografía de intercambio catiónico	27
5.3.3. RP-HPLC.....	27
5.4. DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES	28
5.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS	28
5.6. REDUCCIÓN, ALQUILACIÓN Y DIGESTIÓN DE PÉPTIDOS	28
5.7. BIOENSAYOS	30
5.7.1. Toxicidad en mamífero	30
5.7.2. Toxicidad en insecto	30
5.7.3. Toxicidad en aves.....	30
5.7.4. Ensayos de neutralización <i>in vivo</i>	30
5.8. ELECTROFORESIS	31
5.8.1. SDS-PAGE	31
5.8.2. Electroforesis de cationes en condiciones no reductoras a pH ácido.....	32
5.9. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS	33
5.9.1. Western blot	33
5.9.2. Ensayos de ELISA.....	34
5.9.3. Ensayos de interacción molecular: resonancia superficial de plasmones	35

5.10.	ENSAYOS DE ELECTROFISIOLOGÍA	36
5.10.1.	Canales de potasio Kv1.3.....	36
5.10.2.	Canales de sodio Nav.....	36
6.	RESULTADOS	38
6.1.	MASS-FINGERPRINTING del veneno de <i>Centruroides ornatus</i>	38
6.2.	PURIFICACIÓN DE COMPONENTES DEL VENENO	42
6.2.1.	Cromatografía de filtración en gel (exclusión molecular)	42
6.2.2.	Cromatografía de intercambio catiónico	43
6.2.3.	Purificación de toxinas por HPLC y análisis de secuencias de aminoácidos.....	44
6.2.3.1.	N-terminal de péptidos purificados por RP-HPLC.....	44
6.2.3.2.	Toxinas que reconocen canales de Na ⁺	45
6.2.3.3.	Purificación y análisis de secuencias de las toxinas Co52	45
6.2.3.4.	Purificación y análisis de secuencias de las toxinas Co1 y Co3	47
6.2.3.5.	Purificación y análisis de secuencia de la toxina Co2.....	49
6.2.3.6.	Comparación de secuencias de las principales toxinas con importancia médica en venenos de alacranes mexicanos.....	51
6.2.3.7.	Purificación y secuencia de dos toxinas que reconocen canales de K ⁺	52
6.3.	BIOENSAYOS	54
6.3.1.	Toxicidad en ratón del veneno total	54
6.3.2.	Toxicidad de fracciones obtenidas por HPLC en ratón	54
6.3.3.	Toxicidad de fracciones obtenidas por exclusión molecular en ratón	55
6.3.4.	Toxicidad de fracciones obtenidas por intercambio catiónico en ratón	55
6.3.5.	Efecto de las toxinas purificadas en ratón	56
6.3.6.	Toxicidad del veneno total en grillo.....	57
6.3.7.	Toxicidad de fracciones obtenidas por HPLC en grillo	57
6.3.8.	Toxicidad de la toxina Co52 en grillo	58
6.3.9.	Toxicidad de la toxina Co52 en pollo	58
6.3.10.	Ensayos de neutralización en ratón.....	58
6.4.	Perfiles electroforéticos de los componentes del veneno de <i>Centruroides ornatus</i>	59
6.5.	ENSAYOS INMUNOLÓGICOS	62
6.5.1.	Detección de los componentes del veneno de <i>Centruroides ornatus</i> mediante Westernblot empleando el antiveneno Alacramym	62
6.5.2.	Determinación de la EC50 del veneno de <i>Centruroides ornatus</i> empleando el antiveneno Alacramyn	63
6.5.3.	Ensayos de resonancia superficial de plasmones. Reconocimiento de la toxina Co1 por anticuerpos en formato scFvs	65
6.6.	ELECTROFISIOLOGÍA	66
6.6.1.	Efecto de las toxinas Co1 y Co3 en los canales de sodio Nav 1.5 y Nav1.6	66
6.6.2.	Efecto de fracciones del veneno sobre el canal de potasio Kv1.3	67
7.	DISCUSIÓN.....	69

8.	CONCLUSIONES	74
9.	PERSPECTIVAS	74
10.	REFERENCIAS	75
11.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	81
11.1.	Purificación de la toxina Co1	81
11.2.	Caracterización química de la toxina Co1	85
11.3.	Caracterización química de la toxina Co2	87
11.4.	Caracterización química de la toxina Co3	88
11.5.	Caracterización química de la toxina Co52	88

ABREVIATURAS

ACN: acetonitrilo.

APS: persulfato de amonio.

BLAST: programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas.

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*).

BSA: albúmina de suero bovino.

CMC: carboximetil celulosa (resina de intercambio catiónico).

DAE: dietilaminotil (resina para intercambio aniónico).

DTT: ditionitroto.

EC50: concentración efectiva 50 es definida como la dilución en la cual la absorbancia del antiveneno alcanza el 50% de la máxima absorbancia.

EDTA: ácido etilendiaminotetra acético.

EGTA: ácido etilen-bis (oxietileno nitrilo)tetra acético.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

FPLC: cromatografía líquida para proteínas (*fast protein liquid chromatography*).

FSB: suero fetal bovino (*fetal serum bovine*).

HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico.

h: horas.

LD50: dosis letal 50.

MES: ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico.

min: minutos.

mL: mililitros.

mcg ó µg: microgramos.

Ms: milisegundos.

NDPB: péptidos sin puentes disulfuro (*non-disulfide containing peptides*).

PBS: solución salina amortiguadora de fosfatos

PBST: solución salina amortiguadora de fosfatos con Tween 20.

PDB: *Protein Data Bank*

RCF: fracción de corriente remanente (*remaining current fraction*).

RMN: resonancia magnética nuclear.

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, fase reversa (*reverse phase-high performance liquid chromatography*).

SDS: dodecilsulfato de sodio.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras con SDS.

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina.

TEA: tetraetilamonio.

TFA: ácido trifluoroacético.

TRIS: hidroximetilaminometano.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología básica de un alacrán.	13
Figura 2. Proporción de los componentes encontrados en los venenos de alacranes mexicanos. .	17
Figura 3. Estructura tridimensional de toxinas que reconocen canales de Na ⁺	18
Figura 4. Estructura tridimensional de algunas toxinas de canales de K ⁺	19
Figura 5. Especímenes de <i>Centruroides ornatus</i> . Colectados en Morelia, Michoacán, México.	23
Figura 6. Diseño experimental para la caracterización del veneno del alacrán <i>Centruroides ornatus</i>	25
Figura 7. RP-HPLC del veneno total de <i>Centruroides ornatus</i>	39
Figura 8. Distribución de los pesos moleculares de los componentes del veneno de <i>Centruroides ornatus</i>	41
Figura 9. Filtración en gel del veneno total de <i>Centruroides ornatus</i>	42
Figura 10. Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción FII del veneno de <i>Centruroides ornatus</i>	43
Figura 11. Purificación de la toxina Co52 (péptido más abundante) del veneno de <i>Centruroides ornatus</i> mediante RP-HPLC.	46
Figura 12. Determinación de la secuencia de la toxina Co52.	46
Figura 13. Alineamiento de la secuencia de la toxina Co52 con tres toxinas similares.	46
Figura 14. Purificación de las toxinas Co1 y Co3 por HPLC.	47
Figura 15. Secuencia de la toxina Co1.	47
Figura 16. Alineamiento de la secuencia de la toxina Co1 con las toxinas CII2 de <i>Centruroides limpidus</i> , Cii1 de <i>Centruroides infamatus</i> y Clt113 de <i>Centruroides tecomanus</i>	48
Figura 17. Determinación de la secuencia de la toxina Co3.	48
Figura 18. Alineamiento de la secuencia de la toxina Co3 con tres toxinas similares.	48
Figura 19. Purificación de la toxina Co2 por HPLC.	49
Figura 20. Determinación de la secuencia de la toxina Co2.	50
Figura 21. Alineamiento de la secuencia de la toxina Co2 con tres toxinas similares.	50
Figura 22. Alineamiento de secuencias de las toxinas con relevancia médica de alacranes mexicanos y la toxina Co52.	51
Figura 23. Purificación por HPLC de dos toxinas reducidas y alquiladas que por identidad podrían ser toxinas que bloquean canales de K ⁺	53
Figura 24. Secuencias de dos toxinas que bloquean canales de potasio en el veneno de <i>Centruroides ornatus</i>	53
Figura 25. Separación de los componentes de veneno completo y las fracciones FI-FIII.	60
Figura 26. Perfiles electroforéticos del veneno completo de <i>Centruroides ornatus</i> y la toxina Co1 en condiciones no desnaturalizantes a pH ácido.	61
Figura 27. Western blot de los componentes de venenos de alacranes mexicanos tras la separación por SDS-PAGE (12%)	62
Figura 28. Curva de reconocimiento del antiveneno Alacramyn sobre los diferentes venenos pertenecientes al género <i>Centruroides</i> y el veneno del alacrán <i>Vaejovis mexicanus</i>	63
Figura 29. Curva de reconocimiento del antiveneno Alacramyn sobre toxinas de importancia médica en venenos de alacranes mexicanos.	64
Figura 30. Sensograma que muestra la cinética de interacción de los anticuerpos scFVs 10FG2, LR y 9D con la toxina Co1.	65
Figura 31. Experimentos de electrofisiología de las toxinas Co1 y Co3 sobre los canales de sodio Nav1.5 y Nav 1.6.	66
Figura 32. Efecto de las fracciones 35, 37, 40 y 41 sobre el canal Kv1.3.	67
Figura 33. Comparación del efecto de inhibitorio de varias fracciones del veneno de <i>Centruroides ornatus</i> sobre las corrientes de K ⁺ de los canales Kv1.3 de linfocitos humanos activados.	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de alacrán tóxicas a humanos de México.....	22
Tabla 2. Mass fingerprinting del veneno soluble de <i>Centruroides ornatus</i>	40
Tabla 3. Porcentajes de recuperación de las tres fracciones obtenidas del veneno de <i>Centruroides ornatus</i> por filtración en gel (Sephadex G-50 fino).....	43
Tabla 4. Secuencia N-terminal de péptidos purificados directamente por RP-HPLC del veneno <i>Centruroides ornatus</i>	44
Tabla 5. Evaluación de la toxicidad en ratón de las fracciones obtenidas por HPLC del veneno de <i>Centruroides ornatus</i>	55
Tabla 6. Evaluación de la toxicidad en ratón de toxinas purificadas del veneno de <i>Centruroides ornatus</i>	56
Tabla 7. Evaluación de la toxicidad en grillo de las fracciones obtenidas por HPLC del veneno de <i>Centruroides ornatus</i>	57
Tabla 8. Ensayo de neutralización del antiveneno Alacrayn con el veneno completo de <i>Centruroides ornatus</i> y la toxina Co3.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS. RESULTADOS SUPLEMENTARIOS

Figura-S 1. Primera inyección de 100 µg de la toxina Co1.....	81
Figura-S 2. Segundas inyecciones. a) Pico de subida y b) de bajada del cromatograma inicial de la toxina Co1.....	82
Figura-S 3. Tercera inyección del pico de “subida” de la toxina Co1.....	83
Figura-S 4. Gel de electroforesis en condiciones no reductoras a pH ácido.....	84
Figura-S 5. Serie iónica de la toxina Co1.....	85
Figura-S 6. Cromatograma de la purificación de la toxina Co1 reducida y alquilada.....	85
Figura-S 7. Digestión de la toxina Co1 con endoproteasa Glu-C.....	86
Figura-S 8. Digestión de la toxina Co1 con endoproteasa Asp-N.....	86
Figura-S 9. Cromatograma de la purificación de la toxina Co2 reducida y alquilada.....	87
Figura-S 10. Digestión de la toxina Co2 con endoproteasa Glu-C.....	87
Figura-S 11. Cromatograma de la purificación de la toxina Co3 reducida y alquilada.....	88
Figura-S 12. Cromatograma de la purificación de la toxina Co52 reducida y alquilada.....	88
Figura-S 13. Digestión de la toxina Co52 con endoproteasa Glu-C.....	89

RESUMEN

El alacrán *Centruroides ornatus* es una especie considerada tóxica para los humanos, la cual podría estar relacionada con los más de 300,000 casos de intoxicación por picadura de alacrán que se reportan anualmente en México. En este trabajo se caracterizó el veneno de esta especie, encontrando una composición similar a la reportada para otros venenos de alacranes de importancia médica en México. Un total de 114 componentes fueron identificados mediante HPLC fase reversa y espectrometría de masas, donde los componentes mayoritarios son toxinas que podrían reconocer canales de Na^+ y K^+ . Se identificaron también 11 componentes de alto peso molecular que pueden corresponder a las enzimas del veneno. Mediante las técnicas cromatográficas de filtración en gel, intercambio iónico y HPLC se logró purificar y secuenciar mediante degradación de Edman, el componente principal del veneno, una toxina nombrada Co52, la cual conforma el 10% de los componentes en el veneno, sin embargo, se requieren más estudios para determinar su efecto biológico. En el veneno se identificaron y caracterizaron también, tres toxinas letales para los mamíferos, nombradas: Co1, Co2 y Co3. Estas toxinas son muy similares a nivel de secuencia a otras toxinas de importancia médica en venenos de alacranes mexicanos. Se observó mediante ensayos de electrofisiología en cultivos celulares que las toxinas Co1 y Co3 reconocen efectivamente canales de Na^+ , probando su efecto en los canales Nav 1.6 y Nav 1.5; ambas presentaron un efecto beta sobre el canal Nav 1.6 y la toxina Co3 aparentemente presenta un efecto inhibitorio sobre el canal Nav 1.5, aunque se requieren más estudios para confirmar estos resultados preliminares. Se identificaron dos toxinas bloqueadoras de canales de K^+ , las cuales tienen efecto bloqueador sobre los canales de potasio de linfocitos humanos activados. Como parte de la caracterización, se demostró que el antiveneno *Alacramyn* reconoce los componentes del veneno mediante ensayos de ELISA y Westernblot. El antiveneno neutralizó los efectos letales del veneno *in vivo*, incluyendo también los efectos letales de la toxina Co3. Los datos obtenidos en este trabajo ofrecen mayor información de los componentes de los venenos de alacranes mexicanos, y que son de utilidad para el desarrollo de un nuevo antiveneno.

1. INTRODUCCIÓN

Los alacranes son arácnidos de la clase Arachnida (junto con las arañas, garrapatas y ácaros) del orden Scorpiones que se diferencian de otros artrópodos por contar con ocho patas y con la cabeza no diferenciada del cuerpo, mismo que está dividido típicamente en dos regiones principales: un prosoma o cefalotórax y un opistosoma, este último está dividido a su vez en mesosoma y metasoma (Salazar-Cruz, et al., 2014). El cefalotórax contiene en la parte dorsal una cubierta denominada “carapacho” en donde se observan los ojos y los quelíceros que le permiten alimentarse; en el prosoma también se encuentran un par de pedipalpos y cuatro pares de patas. El metasoma o también llamada cola está dividida en cinco segmentos, al extremo se encuentra el telson o glándula venenosa, la cual termina con la estructura típica de aguijón por donde el alacrán expulsa el veneno mediante mecanismos controlados y regulados por diversos músculos (Gopalakrishnakone, et al., 2015) (Figura 1).

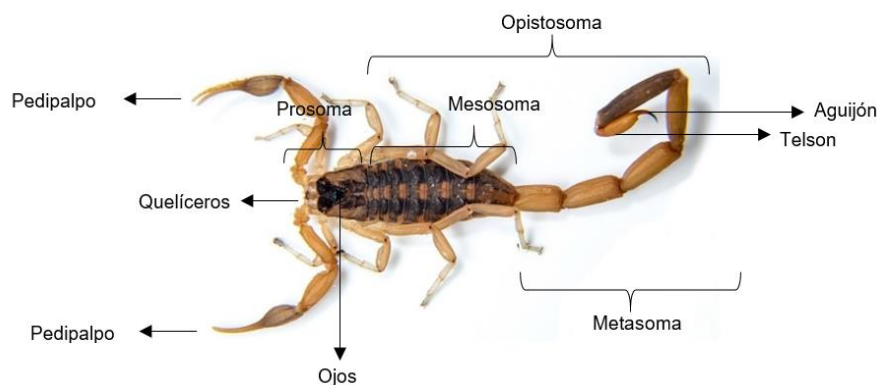


Figura 1. Morfología básica de un alacrán.

Imagen tomada de:
https://www.google.com.mx/search?q=istock+alacran&source=inms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi6gefBhLHZAhUKM6wKHedqDTToQ_AUICigB&biw=1517&bih=653&dpr=0.9#imgrc=Eb8ZmKVK0zR_WM

Los alacranes tienen una morfología muy conservada y han logrado colonizar diferentes ecosistemas, encontrándolos distribuidos prácticamente en todo el mundo con excepción de la Antártica, zonas boreales y algunas islas oceánicas (Santibáñez-López, et al., 2016). Se han reportado alrededor de 2345 especies (Rein-Ove, 2017) y han sido causa de fascinación en el ser humano ya que típicamente son considerados como animales que producen la muerte. Si bien todos los alacranes poseen glándulas venenosas, aquellos pertenecientes a la familia Buthidae y en los géneros *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus*, *Parabuthus*, *Mesobuthus*, *Tityus* y *Centruroides*, son los que representan un peligro para los humanos (Caliskan, et al., 2014).

Aunque en el planeta existe un gran número de especies de alacrán, se considera que menos de 50 especies son capaces de producir incidentes serios o fatales (Gopalakrishnakone, et al., 2015). Las especies de alacrán tóxicas para humanos provocan anualmente más de un millón de casos de intoxicación en el mundo; dentro de los cuales, se han reportado alrededor de 3000 casos fatales (Chaturaka y Gnanathan, 2017).

México es el país que cuenta con la mayor diversidad de especies de alacrán con 289 especies reportadas al momento (Ponce-Saavedra, et al., 2016), lo que representa más del 12% de la diversidad a nivel mundial. Los alacranes *butidos* que significan un problema para la salud pública en México, están representados dentro del género *Centruroides*. Este género se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica, incluidas las Islas Galápagos, las Antillas y Bahamas (De Armas, et al., 2003) y en México se han descrito 44 especies del género *Centruroides* (Santibáñez-López, et al., 2016). Dentro de estas especies, se considera que alrededor de 20 pueden representar un problema para la salud pública y los cuales se encuentran principalmente en la costa oeste del Océano Pacífico y parte del centro de México (Riaño-Umbarila, et al., 2017).

En nuestro país, los alacranes tóxicos pertenecientes al género *Centruroides* provocan un alto índice de accidentes relacionados con su picadura, reportándose anualmente un aproximado de 300 mil casos e incluso algunos casos fatales (268 reportados de 2006 a 2012) (Jiménez-Vargas, et al., 2017, SSA, 2013). Por lo anterior, se ha definido al *alacranismo* como el “problema de salud pública ocasionado por la picadura de alacranes, en un grupo de personas de determinada área”, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SSA2-2011 publicada por la Secretaría de Salud (SSA, Norma Oficial Mexicana NOM-033-SSA2-2011, 2011). Los estados con la mayor incidencia de intoxicación por picadura de alacrán son: Colima (1710.02), Morelos (1515.77), Nayarit (1317.12), Guerrero (1071.11), Michoacán (674.39), Jalisco (639.0) y Guanajuato (612.19); las tasas son por cada 100,000 habitantes (SUIVE/DGE/SSA, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1. Relevancia de la picadura de alacrán en humanos

Desde el punto de vista médico, la picadura de alacrán puede producir varios efectos aunque en la mayoría de los casos (95%) sólo se produce dolor en la zona afectada. Sin embargo, si los efectos llegan a ser severos se puede comprometer la vida de la persona, dependiendo de la especie de alacrán involucrada. La persona afectada puede presentar alteraciones hematológicas como: leucocitosis, hiperglicemia, acidosis láctica, desbalance de electrolitos, oxigenación de sangre disminuida e incremento de biomarcadores de necrosis muscular, hepático y pancreática (Chippaux, 2012). El efecto sobre el sistema nervioso simpático se da por un incremento de los niveles de catecolaminas produciendo una “cascada adrenérgica” que conlleva a complicaciones cardiacas, respiratorias, neuromusculares, metabólicas y urogenitales. Un efecto colinérgico también puede presentarse, y que involucra al sistema nervioso parasimpático, provocando un síndrome de hipersecreción (salivación, sudoración, vómito, incontinencia urinaria, hipersecreción bronquial y diarrea), dolor abdominal, miosis, broncoespasmos y bradicardia (Freire-Maia, et al., 1994, Ismail, 1995). La severidad de los síntomas se puede evaluar y de acuerdo al grado asignado, será el tratamiento a emplear que puede incluir el uso de fármacos (antihistamínicos, antiinflamatorios, ansiolíticos, entre otros) e inmunoterapia (Chippaux, 2012).

El uso de la inmunoterapia como tratamiento terapéutico contra la picadura de alacrán consiste en la aplicación de anticuerpos purificados contra los componentes del veneno y la consecuente neutralización de los efectos tóxicos. Estos anticuerpos son en realidad fragmentos F(ab')₂ purificados de inmunoglobulinas IgG producidas en caballos inmunizados con el veneno de determinada especie de alacrán (Chippaux y Goyffon, 1998). En México, el uso de este tipo de antiveneno se encuentra comercialmente disponible bajo el nombre de *Alacramyn*, el cual se elabora por esquemas de inmunización empleando los venenos de cuatro especies: *Centruroides limpidus*, *Centruroides tecomanus*, *Centruroides suffusus* y *Centruroides noxius* (Dehesa-Dávila y Possani, 1994). El uso de *Alacramyn* en México ha disminuido considerablemente el número de casos mortales desde su introducción en la década de los 90's, y su eficacia está comprobada en personas picadas incluso por alacranes de otras especies (Chase, et al., 2009).

2.2. Composición de los venenos de alacrán

El veneno con el que cuentan los alacranes es un arma muy eficaz que han desarrollado estos organismos a lo largo de la evolución tanto para cazar a sus presas (principalmente insectos y otros artrópodos) y como defensa ante sus depredadores; por lo que el veneno es una mezcla muy compleja de diferentes moléculas, entre las que se encuentran: polisacáridos, aminoácidos libres, nucleótidos, compuestos heterocíclicos, lípidos, sales inorgánicas, mucoproteínas, enzimas, aminas bioactivas (histamina y serotonina) y otros componentes de bajo peso molecular sin función descrita (Ortiz, et al., 2015). Los principales componentes que se han descrito en los venenos de alacrán son péptidos o toxinas capaces de unirse a canales iónicos (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}) y que alteran la comunicación celular y por lo tanto, las funciones vitales de los organismos afectados (Ortiz, et al., 2014). Las toxinas que se unen a los canales de Na^+ o K^+ han sido las más estudiadas en los venenos de los alacranes mexicanos, al ser las responsables de los signos de intoxicación por la picadura de alacrán en humanos (Santibáñez-López, et al., 2016) (Figura 2).

Recientemente, se ha descrito la presencia de péptidos específicos que no representan un peligro para los humanos, los cuales poseen propiedades biológicas interesantes, entre las que destacan actividades antimicrobiana, anticonvulsiva, bioinsecticida e inmunomoduladora. Algunos ejemplos son: la Hadrucalcina del alacrán *Hoffmannihadrurus gertschi*, un péptido con afinidad a receptores de rianodina con potencial para actuar como molécula vehículo en el tratamiento de arritmias; la Hadrurina también de *H. gertschi*, que es un péptido con actividad antimicrobiana (inhibe el crecimiento de al menos seis bacterias); la Paidotoxina, péptido del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus* que es letal en insectos pero no en mamíferos, el cual podría representar un buen bioinsecticida; y un último ejemplo es el caso de los péptidos Vm23 y Vm24 del veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus* con actividad inmunosupresora al inhibir los canales de potasio Kv1.3 de linfocitos humanos con una alta selectividad, lo cual es importante desde el punto de vista farmacológico en el desarrollo de posibles tratamientos de enfermedades autoinmunes (Santibáñez-López, et al, 2016).

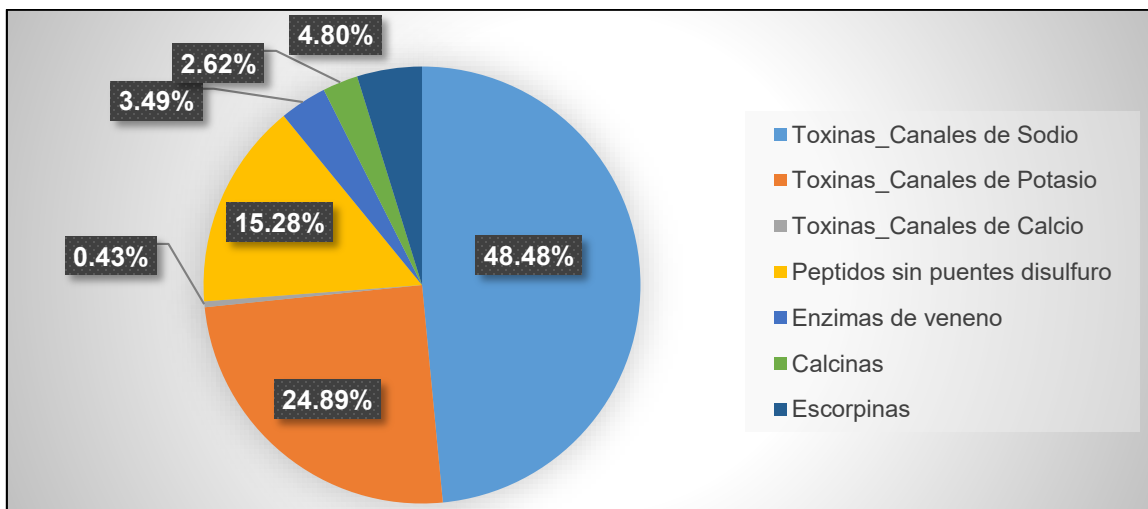


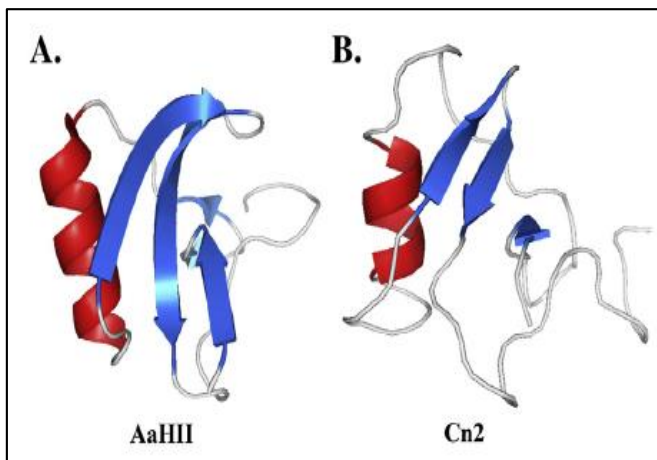
Figura 2. Proporción de los componentes encontrados en los venenos de alacranes mexicanos. Modificado de (Santibáñez-López, et al., 2016).

La proporción de enzimas que se encuentran en los venenos de alacrán es baja con respecto a los péptidos que reconocen canales iónicos; sin embargo, son de importancia para que las toxinas difundan al torrente sanguíneo. Se ha encontrado que en los venenos de alacrán hay hialuronidasas, fosfolipasas tipo A, esfingomielinasas, lisozimas, metaloproteasas y proteasas de serina. (Pessini, et al., 2001, Almeid, et al., 2002, Gopalakrishnakone, et al, 2015, Cid-Urbe, et al., 2017).

2.2.1. Toxinas que reconocen canales de Na⁺

Desde el punto de vista médico, las toxinas que reconocen canales de Na⁺ dependientes de voltaje, son los componentes más relevantes en los venenos de los alacranes *butidos* ya que son las responsables de los síntomas neurotóxicos provocados por su picadura. Este tipo de toxinas comprenden péptidos que contienen de 60 a 75 residuos de aminoácidos y un peso molecular de entre 6500 a 8500 Da. Dentro de su secuencia cuentan con arreglos de cisteínas altamente conservados, formando generalmente cuatro puentes disulfuro que estabilizan una topología $\beta\alpha\beta\beta$ o $\beta\alpha\alpha\beta\alpha$. Estas estructuras secundarias, se conectan por asas irregulares y variables expuestas al medio exterior. La elucidación de la estructura tridimensional de las toxinas se ha realizado mediante RMN y por cristalografía de rayos X (Ver Figura 3).

La clasificación más usada de estas toxinas se basa en el efecto fisiológico que ejercen como moduladoras de los mecanismos de apertura-cierre de los canales de Na⁺. Existen dos categorías principales: las toxinas α y las toxinas β . Las toxinas α interfieren en el proceso de inactivación del canal uniéndose al sitio 3, fueron descritas principalmente en venenos de alacranes de África y Asia, aunque posteriormente se encontraron también en alacranes de América. Las toxinas α inducen una fuerte despolarización de la membrana, lo que provoca una pérdida en la capacidad de respuesta de las células excitables y si la dosis es mayor, prolongan el potencial de acción e inducen parálisis y arritmia cardíaca. Las toxinas β , usualmente reducen la amplitud de la corriente bajo las condiciones de fijación de voltaje (*voltaje clamp*) y desplazan la apertura del canal a valores de potencial de membrana más negativos. Las toxinas β se unen al sitio 4 del canal y son las principales toxinas que se han identificado en alacranes del género *Centruroides*. Estas toxinas pueden producir alteraciones musculares tales como espasticidad y mioclonias (Rodríguez de la Vega y Possani, 2005, Rodríguez de la Vega y Possani, 2007, Quintero-Hernández, et al., 2013, Ortiz, et al., 2015).



2.2.2. Toxinas que reconocen canales de K⁺

Otros péptidos que se unen a canales de Cl⁻, Ca²⁺ o K⁺ tienen un papel sinérgico en el cuadro de intoxicación, más que un efecto significativo en la letalidad del veneno. Sin embargo, en los venenos de alacrán se encuentra una importante cantidad de toxinas capaces de bloquear la función de los canales de K⁺. Toxinas conformadas de 23 a 42 aminoácidos, con pesos moleculares de aproximadamente 4000 Da y cuentan con 3 o 4 puentes disulfuro en su estructura. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos que las conforman y los pares de cisteínas que poseen, se han clasificado en 6 familias denominadas: α-, β-, γ-, κ-, λ- y ε- toxinas (Ktoxinas). Se ha descrito que estas toxinas cuentan con dos motivos estructurales definidos por la presencia de cisteínas que las estabilizan (CS, por sus siglas en inglés *cysteine-stabilized*). El primero se denomina: CSαβ conformado por una o dos α-hélices conectadas y una lámina-β formada por tres hebras estabilizadas por 3 o 4 puentes disulfuro; el segundo motivo estructural llamado CSαα, consiste de dos α-hélices conectadas por un giro-β (Figura 4). Estas toxinas han sido de importancia para el estudio de la estructura-función de diversos canales y la interacción selectiva con diferentes subtipos de canales entre los cuales se encuentran el: Kv1, Kv3, Kv4, Kv7, Kv11, y K_{Ca}. (Rodríguez de la Vega, et al., 2004, Quintero-Hernández, et al., 2013, Santibáñez-López, et al., 2015, Jiménez-Vargas, et al., 2017). Y actualmente se sabe que alteraciones en los diferentes subtipos de los canales de K⁺ están involucrados en patologías como: asma, arritmias cardíacas, enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T, respuestas inmunes por infecciones, inflamación e hipertensión (Bergeron y Bingham, 2012).

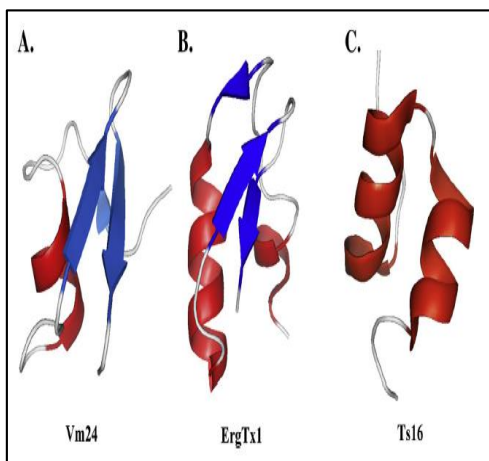


Figura 4. Estructura tridimensional de algunas toxinas de canales de K⁺. A) α-Ktoxina Vm24 (2K90_PDB) de *Vaejovis mexicanus*; B) γ-Ktoxina ErgTx1 (1NE5_PDB) de *Centruroides noxius* y C) α-Ktoxina Ts16 (2LO7_PDB) de *Tityus serrulatus*, tiene una estructura típica CSαα de las κ-Ktoxinas, pero considerando su secuencia primaria, pertenece a las α-Ktoxinas. Tomada de Quintero-Hernández, et al., 2013.

2.3. Caracterización de los venenos de alacrán

El estudio de los venenos de alacrán en sus inicios se basó en la purificación, identificación y caracterización funcional de los componentes, la mayoría de ellos son péptidos y proteínas (Santibáñez-López, et al., 2016). Para ello, se emplean técnicas cromatográficas que pueden comprender una primera separación por tamaño mediante filtración en gel usando columnas de Sephadex; pasos subsecuentes con resinas de intercambio iónico (como CM-celulosa o DAE-celulosa); y finalmente, mediante HPLC se obtienen péptidos o proteínas puros para su caracterización funcional y química, esta última se realiza generalmente por degradación de Edman (Possani, et al., 1999, Valdez-Velázquez, et al., 2013).

Con el uso de técnicas más sensibles y de alto rendimiento, como la espectrometría de masas, ha sido posible identificar una mayor cantidad de componentes. Lo anterior ha sido de utilidad para la caracterización de venenos de nuevas especies y determinar las diferencias entre ellas (Batista, et al., 2007, Rodríguez de la Vega, et al., 2010). Recientemente, mediante el uso de técnicas de biología molecular, tales como, la construcción de bibliotecas de ADN complementario, principalmente de la glándula venenosa del alacrán (Olamendi-Portugal, et al., 2016), se han encontrado componentes en los venenos de especies que anteriormente no se habían descrito (Santibáñez-Lopez, et al., 2017, Santibáñez-Lopez, et al., 2016) y han servido para determinar los niveles de expresión de determinados componentes entre los diferentes sexos de individuos de la misma especie (Cid-Uribe, et al., 2017).

Parte de la caracterización de los venenos de alacrán comprende el uso de ensayos inmunológicos, con la finalidad de observar el reconocimiento de los componentes del veneno por los anticuerpos contenidos en los antivenenos; los cuales, no necesariamente son elaborados mediante inmunizaciones con el veneno del alacrán bajo estudio. Con tal fin, el antiveneno *Alacramyn* ha sido empleado para determinar el reconocimiento de los componentes del veneno del alacrán *Tityus trivitatus* (De Roodt, et al, 2010); en la determinación de los niveles de veneno en sangre y orina de pacientes intoxicados por la picadura de *Centruroides sculpturatus* aprovechando la reactividad cruzada que muestra el antiveneno (Chase, et al., 2009); y en el reconocimiento de los componentes del veneno *in vitro* y neutralización de los efectos letales *in vivo* del veneno de *Tityus pachyrus* (Barona, Otero y Núñez, 2004).

2.4. Alacranes tóxicos a humanos en México

Los alacranes que pueden representar un peligro para la salud de las personas en México, así como su distribución geográfica, se enlistan en la Tabla 1. Se han realizado diferentes estudios sobre la composición de los venenos de los siguientes alacranes: *Centruroides noxius* (Zamudio, et al., 1992, Dent, et al., 1980), *Centruroides suffusus* (Martin, et al., 1987), *Centruroides tecomanus* (Ramírez, et al., 1988, Valdez-Velazquéz, et al., 2016), *Centruroides limpidus* (Ramírez, et al., 1994, Dehesa-Dávila, et al., 1996, Olamendi-Portugal, et al, 2017), *Centruroides sculpturatus* (Corona, et al., 2001) , *Centruroides infamatus* (Dehesa-Dávila, et al., 1996) y *Centruroides elegans* (Vandendriessche, et al., 2010). De estas especies se conocen también las principales toxinas que afectan a los mamíferos. Sin embargo, no se conoce la composición de los venenos de más de la mitad de las especies reportadas como peligrosas para los humanos, y en las cuales se incluye a *Centruroides ornatus*.

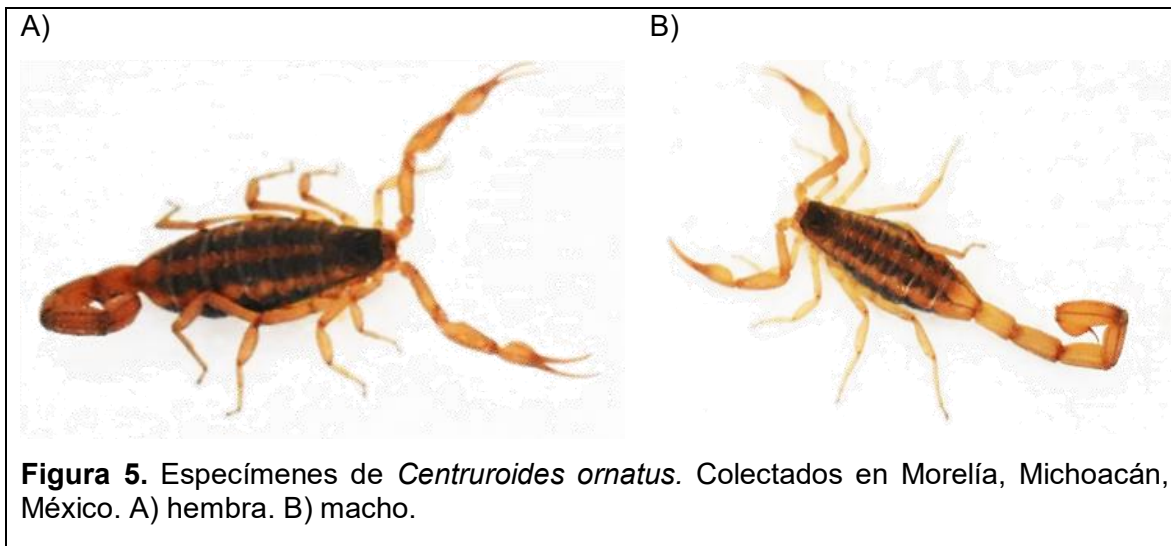
Tabla 1. Especies de alacrán tóxicas a humanos de México.

	Especies	Estado donde se reporta su presencia	Toxicidad en mamíferos y DL50	Principales toxinas
1	<i>C. noxius</i>	Nayarit	2.5 [*]	Cn2, Cn8
2	<i>C. infamatus</i>	Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Querétaro	9.6 [*]	Cii1
3	<i>C. limpidus</i>	Colima, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Querétaro	15.0 [*]	CII1m, CII2, CI13
4	<i>C. tecomanus</i>	Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán	10.2 [*]	Ct1a
5	<i>C. suffusus</i>	Durango	8.75 [*]	Css2, Css4
6	<i>C. elegans</i>	Jalisco, Nayarit	11.5 [*]	Cell9
7	<i>C. sculpturatus</i>	Sonora	22.7 [*]	CsEM1
8	<i>C. ornatus</i>	Guanajuato, Jalisco, Michoacán	13.3 [*]	Co1, Co2 y Co3++
9	<i>C. hirsutipalpus</i>	Colima	11.7 [*]	NC
10	<i>C. villegasi</i>	Guerrero	12.2 [*]	NC
11	<i>C. cumpas</i>	Sonora	19.2 [*]	NC
12	<i>C. sp. nov.</i>	Oaxaca (Huajuapán)	13.0 [*]	NC
13	<i>C. meisei</i>	Guerrero	14.0 [*]	NC
14	<i>C. balsasensis</i>	Guerrero, Estados de México, Michoacán, Morelos, Puebla	Tóxico [*]	NC
15	<i>C. huichol</i>	Nayarit	Tóxico	NC
16	<i>C. bonito</i>	Guerrero	Tóxico	NC
17	<i>C. ruana</i>	Michoacán	Tóxico	NC
18	<i>C. serrano</i>	Oaxaca	Tóxico	NC
19	<i>C. mascota</i>	Jalisco	Tóxico	NC
20	<i>C. chamela</i>	Jalisco	Tóxico	NC

DL50: reportada como mcg de veneno por 20 g de peso de ratón; Tóxico: evidencia experimental de toxicidad en mamíferos; NC: No caracterizado. * Datos de (Riaño-Umbarila, et al., 2017). ++ Descritas en este trabajo.

Los estudios realizados sobre el alacrán *Centruroides ornatus* se han enfocado principalmente sobre su descripción taxonómica y su localización geográfica. Este alacrán se encuentra en los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato, estados con alta incidencia por picadura de alacrán (SSA, Secretaría de Salud. CENAPRECE, 2013).

De acuerdo a la descripción de Ponce-Saavedra J. y Francke B. O. F. son animales de coloración base que va desde amarillo claro hasta ocre e incluso rojiza, su carapacho está claramente obscurecido y sólo deja pequeñas áreas laterales sin pigmento (Figura 5). Las bandas longitudinales del mesosoma son claramente más anchas que la banda mesal, en ocasiones dándole apariencia muy oscura (Ponce-Saavedra y Francke B, 2013). *Centruroides ornatus* mide entre 38 y 51 mm, siendo más pequeño que *Centruroides infamatus*, el cual mide entre 49 y 63 mm (De Armas y Martín-Frías, 2008).



Por mucho tiempo *Centruroides ornatus* se consideró una subespecie de *Centruroides infamatus* (Hoffmann, 1932) hasta que en el año 2008 De Armas L.F. y Martín-Frías E. propusieron el restablecimiento del nombre a *Centruroides ornatus* Pocock 1902; quienes describieron estrictamente sus caracteres taxonómicos y consideraron los estudios previos sobre las diferencias genéticas que sustentan el estatus específico de la especie (Towler , et al., 2001). Los estudios sobre *Centruroides ornatus*, describen su comportamiento bajo determinadas condiciones climatológicas (Guzmán-Pérez y Ponce-Saavedra, 2014), se reporta también, su uso del hábitat en determinadas regiones de México (Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2016) y se ha determinado el tamaño de camada de las hembras grávidas (Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2015).

Con respecto al estudio de su veneno, recientemente se reportó que la DL50 en ratones CD1, es de 13.3 µg por 20 g de peso de ratón. En este mismo estudio se obtuvo el perfil electroforético de los componentes del veneno en condiciones ácidas (Riaño-Umbarila, et al., 2017). Sin embargo, no hay datos publicados sobre la caracterización de los componentes en el veneno.

3. HIPÓTESIS

Los componentes del veneno alacrán *Centruroides ornatus* son principalmente toxinas que afectan canales de Na⁺, toxinas que bloquean canales de K⁺, algunas enzimas y los cuales, podrían presentar cierta diferencia con los componentes reportados para alacranes del mismo género. Debido a la reactividad cruzada de los fragmentos de anticuerpos de los antivenenos comerciales, el veneno de *C. ornatus* podrá ser reconocido por el antiveneno comercial *Alacramyn*.

4. OBJETIVO DEL PROYECTO

Caracterizar los principales componentes del veneno de alacrán *Centruroides ornatus* y compararlos con los componentes reportados de otros alacranes del género *Centruroides*.

4.1. Objetivos particulares

- Purificar los componentes del veneno del alacrán *Centruroides ornatus* que presentan toxicidad en mamífero.
- Identificar las principales toxinas contra mamíferos en el veneno de *Centruroides ornatus*.
- Obtener la secuencia de aminoácidos de las toxinas obtenidas.
- Determinar el porcentaje de identidad de las toxinas encontradas con respecto a la secuencia de aminoácidos de toxinas de otros alacranes del género *Centruroides*.
- Evaluar si el antiveneno *Alacramyn* presenta reacción cruzada con los componentes del veneno de *Centruroides ornatus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño experimental

En el Figura 6 se ilustra el diseño experimental empleado para cumplir con los objetivos establecidos. En el esquema no se consideran las pruebas de resonancia superficial de plasmones y los ensayos de electrofisiología (ver secciones 5.9.3 y 5.10) ya que son experimentos que se llevaron a cabo como parte complementaria del proyecto. Sin embargo, se incluyen los detalles experimentales de todas las pruebas y los resultados obtenidos.

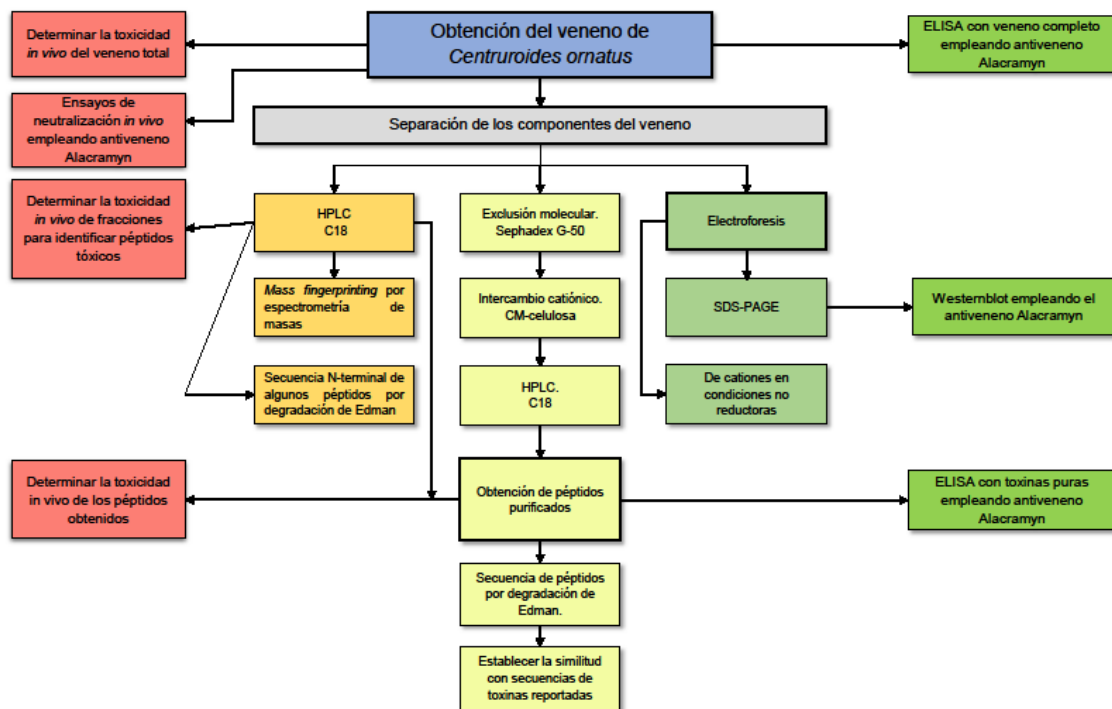


Figura 6. Diseño experimental para la caracterización del veneno del alacrán *Centruroides ornatus*.

5.2. Veneno

Los especímenes de *Centruroides ornatus* fueron colectados a las afueras de la ciudad de Morelia, Michoacán, México. 19°38'54.8"N 101°17'42.7 W (19.648552,-101.295206). Bajo el permiso FAUT-0305 otorgado por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT (Dirección general de vida silvestre).

Los alacranes fueron llevados al laboratorio y el veneno de hembras (70%) y machos (30%) fue obtenido mediante estimulación eléctrica del telson. El veneno se resuspendió en 100 µL de agua tetradestilada, se centrifugó por 5 minutos a 10,000 g a 4°C, el sobrenadante se colectó en un tubo limpio. El botón formado se lavó 4 veces con 100 µL de agua para obtener el veneno soluble en un volumen final de 500 µL. Se realizó una dilución 1:10 y se midió la densidad óptica a 280 nm, asumiendo que una unidad de absorbancia equivale a 1 mg/mL de proteína. Se recuperó una cantidad promedio de 200 µg de veneno soluble por alacrán. El veneno se liofilizó y se conservó a -20°C.

5.3. Purificación de los componentes del veneno

5.3.1. Cromatografía de filtración en gel

Se fraccionó el veneno total mediante filtración en gel de acuerdo a lo descrito por (Olamendi-Portugal, et al., 2016), con ligeras modificaciones. Se empleó una columna preparada con Sephadex G-50 fino (Sigma Chemical Co, EUA) empacado en un soporte de vidrio de volumen de 50 mL. Se aplicaron 27 mg de veneno solubilizado en un volumen de 0.5 mL de la solución amortiguadora de corrida (acetato de amonio 20 mM pH 4.7). La elución se realizó a un flujo de 15 mL/h y se colectaron volúmenes de 1 mL en tubos de ensayo. La elución terminó hasta no observar cambios en las lecturas del espectrofotómetro (Genesys 10S Thermo Scientific, WI, USA) a una longitud de onda de 280 nm empleando como blanco la solución amortiguadora de corrida. Se realizó una gráfica de absorbancia vs volumen para determinar el número de fracciones obtenidas. Estas últimas fueron almacenadas a 4°C o liofilizadas y conservadas a -20°C.

5.3.2. Cromatografía de intercambio catiónico

La fracción II (FII) obtenida del paso previo de exclusión molecular se aplicó directamente en una columna de CM-celulosa equilibrada con la solución amortiguadora de corrida (acetato de amonio 20 mM pH 4.7). Los componentes fueron eluidos con una solución de acetato de amonio 0.5 M (Solución B) realizando dos gradientes lineales a un flujo de 2 mL/min. Tras cargar la muestra, el primer gradiente fue de 0 a 20 % de solución B en 180 minutos; inmediatamente después se inició un segundo gradiente de 20% a 30% de solución B en 60 minutos. Finalmente se realizó un lavado con 100 % de solución B por 10 minutos. Los componentes se detectaron a una longitud de onda de 280 nm y se colectaron fracciones de 8 mL automáticamente en un equipo *NGC Chromatography system* (Bio-Rad Laboratories Inc.) A partir del cromatograma obtenido se mezcló el volumen de los tubos que conformaron cada pico observado. Cada fracción fue liofilizada y mantenida a -20°C hasta su uso.

5.3.3. RP-HPLC

Los componentes del veneno total, las fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico y los productos de las reacciones de alquilación y digestión, se separaron mediante RP-HPLC. Se aplicaron no más de 1.2 mg de proteína a una columna C18 (4.6 × 250 mm, Vydac, Hysperia, EUA). La fase móvil fue una mezcla de solución A (Agua con 0.12% de TFA) y solución B (ACN con 0.1% de TFA). Generalmente las corridas se hicieron en un gradiente lineal de 0% a 60 % de B en 60 minutos, a menos que se indique lo contrario. Se hizo el registro a una longitud de onda de 230 nm y el flujo fue de 1 mL/min. Las muestras se colectaron manualmente, se secaron al vacío en un equipo *Savant SpeedVac* y se mantuvieron a -20 °C.

5.4. DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES

La determinación de las masas moleculares se hizo por espectrometría de masas y secuenciación de péptidos a cargo del Dr. Fernando Zamudio del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Las muestras obtenidas del equipo HPLC fueron disueltas en una solución de 60% de ACN y 40% de agua con 0.1% de ácido acético. El volumen de cada muestra fue ajustado de acuerdo a la absorbancia obtenida para cada pico cromatográfico, para inyectar al equipo una cantidad aproximada de 0.1 µg de proteína. El voltaje del *spray* fue de 1.6kV y la temperatura del capilar de 180°C. Los espectros se obtuvieron en modo positivo. Los pesos moleculares fueron determinados en el espectrómetro de masas con trampa de iones lineal *LCQ Fleet* (Thermo Scientific, CA, EUA).

5.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

La secuenciación de los péptidos purificados del veneno, se realizó mediante degradación de Edman (Edman y Begg, 1967) empleando un secuenciador automático PPSQ-31A (Shimadzu Instruments, Inc. Columbia, MD, EUA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias conocidas disponibles en el NCBI analizadas mediante BLAST.

5.6. REDUCCIÓN, ALQUILACIÓN Y DIGESTIÓN DE PÉPTIDOS

La concentración de péptido nativo (para determinación de región N-terminal) o reducido y alquilado (para la detección de cisteínas) fue de aproximadamente 1 nmol. La región amino terminal se obtiene directamente del péptido, el resto de la secuencia se obtiene al digerir el péptido con enzimas proteolíticas (indicado a continuación) para obtener las secuencias de los fragmentos y ensamblar la secuencia completa del péptido.

Los compuestos purificados se redujeron y alquilaron de acuerdo al protocolo descrito por (Olamendi-Portugal, et al., 2017). Para la reducción, el péptido purificado se disolvió en una solución amortiguadora de TRIS-HCl 200 mM pH 8.6 con un 1 mg/mL de EDTA y cloruro de guanidinio 6 M, se le agregaron 200 µg de DTT por cada 50 µg de proteína y se incubó a 55°C por 45 minutos en ambiente de N₂. Transcurrido el tiempo, a la mezcla se le

agregaron aproximadamente 200 µg de iodoacetamida por cada 50 µg de proteína se colocó en un ambiente de N₂, se protegió de la luz y se dejó transcurrir la reacción por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se inyectó inmediatamente la mezcla al equipo de HPLC para eliminar los reactivos, empleando una columna C-18. Se obtuvo el péptido alquilado, se determinó el peso molecular mediante espectrometría de masas y se estimó el número de cisteínas por la diferencia del peso molecular del péptido nativo y la ganancia en peso por el agente alquilante. Las muestras se llevaron a sequedad en el equipo *Savant SpeedVac*.

La digestión enzimática de los péptidos se realizó empleando diferentes endoproteasas para secuenciación. Para el caso de la endoproteasa Glu-C (V-8) de *Staphylococcus aureus* (Manheim, Alemania) se agregaron 2.5 µg de enzima por cada 50 µg de péptido reducido y alquilado en una solución amortiguadora de bicarbonato de amonio 25 mM, pH 8.2 incubando la mezcla a 37°C por 4 h. Para la endoproteasa Asp-N (Manheim, Alemania) se emplearon 2.5 µg de enzima por cada 50 µg de péptido reducido y alquilado en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM pH 8.0 incubando la mezcla a 37°C por 14 h. Posterior a la digestión, se separaron los péptidos obtenidos mediante HPLC y se determinó el peso molecular por espectrometría de masas.

5.7. BIOENSAYOS

5.7.1. Toxicidad en mamífero

Para todos los ensayos de toxicidad en mamífero se emplearon ratones albinos cepa CD1 de peso aproximado de 20 g. La administración de los tratamientos se realizó vía intraperitoneal inyectando las cantidades determinadas en un volumen máximo 100 μL o por vía intracraneal en no más de 5 μL .

Se probó la toxicidad del veneno total, fracciones y componentes purificados. A las 4 h post-administración se suministró agua y alimento *ad libitum* y se observó el efecto durante las siguientes 24 h.

5.7.2. Toxicidad en insecto

Se probó la toxicidad en grillos (*Acheta domestica*) del veneno total, fracciones y del péptido principal del veneno (toxina Co52). Aplicando no más de 20 μL volumen en la tercera sección de la parte dorsal del abdomen del grillo. Se observaron los efectos durante 24 h colocando agua *ad libitum*.

5.7.3. Toxicidad en aves

Se probó el efecto de la toxina Co52 en pollos (*Gallus gallus domesticus*) de 2 semanas de edad. Se aplicaron por vía intraperitoneal un máximo de 60 μg en un volumen de 200 μL . A las 2 h post-administración se suministró agua y alimento *ad libitum* y se observó el efecto durante las siguientes 12 h.

5.7.4. Ensayos de neutralización *in vivo*

En ratones CD1 de peso aproximado de 20 g se probó el efecto neutralizante del antiveneno *Alacramyn* contra el veneno de *Centruroides ornatus* y de una de sus toxinas purificadas. Se probó por duplicado: el efecto letal de 2 LD50 de veneno (26.6 μg / 20 g de peso de ratón); el efecto de 2 LD50 del veneno previamente mezclado con 15 mg en peso del antiveneno; el efecto de 5 μg de toxina purificada previamente mezclada con 5 mg de

antiveneno. Las mezclas de veneno o toxina con antiveneno se incubaron previo a la administración por 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Todas las administraciones fueron por vía intraperitoneal. A las 4 h post-administración se suministró agua y alimento *ad libitum* y se observó el efecto durante las siguientes 12 h.

5.8. ELECTROFORESIS

5.8.1. SDS-PAGE

Para determinar los patrones de separación de los componentes contenidos en el veneno de *Centruroides ornatus*, otros venenos y para verificar la separación obtenida por filtración en gel, se realizaron separaciones electroforéticas empleando geles de poliacrilamida comerciales (*TGX Fast Cast*, Bio-Rad Laboratories, Inc). La concentración de 12 % para el gel separador y 4 % para el gel concentrador. Las muestras se desnaturalizaron previo a su cargado, en la solución amortiguadora de carga (TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS al 2%, glicerol, azul de bromofenol al 0.01 % en condiciones reductoras empleando 5% de β -mercaptoetanol). La mezcla se colocó a 55°C por 15 minutos y se centrifugó antes de aplicar en los pozos del gel.

Para la separación electroforética se empleó una solución de TRIS 25mM –Glicina 192 mM con SDS al 0.01%, corriendo las muestras en 50 V constantes hasta que se observó que la muestra entró en el gel separador y posteriormente a 100 V hasta que el colorante llegó al borde del gel (aproximadamente 2 h). Terminada la separación se tiñó el gel con solución de tinción (azul brillante de Coomassie G-250 al 0.1 % en solución de ácido acético-metanol 10%/40% v/v) durante 30 minutos y se lavó dos veces, la primera con solución de destañir I (solución de ácido acético-metanol 10%/40% v/v) por 30 minutos y la segunda con solución de destañir II (solución de ácido acético-metanol 7%/10% v/v) durante 16 h aproximadamente con agitación suave.

5.8.2. Electroforesis de cationes en condiciones no reductoras a pH ácido

Los componentes del veneno se separaron los componentes del veneno y se verificó la homogeneidad de la toxina principal a mamíferos (Toxina Co1, Sección 6.2.3.4) mediante perfiles electroforéticos en condiciones no reductoras a pH ácido. Se siguió la metodología propuesta por (Riaño-Umbarila, et al., 2017). El gel separador se elaboró empleando una solución amortiguadora pH 4.7 de acetato de potasio 0.042 M adicionada con los siguientes componentes a la concentración final indicada: acrilamida al 11.64 %, N,N'-metilenbisacrilamida al 0.36%, TEMED al 0.1%, riboflavina-5'-fosfato al 0.001%. El gel concentrador se preparó en una solución amortiguadora de acetato de potasio 0.09 M, pH 6 con los siguientes componentes de las concentraciones finales de: acrilamida al 3.62%, N,N'-metilenbisacrilamida al 0.13%, TEMED al 0.001%, riboflavina-5'-fosfato al 0.001%, APS al 0.01% y 10% de glicerol. Los geles fueron expuestos a luz fluorescente hasta una completa polimerización. Se cargaron 10 y 20 µg de veneno total y 1 µg de toxina pura en no más de 20 µL, en una relación 1:1 con la solución amortiguadora de carga. Esta última consiste de una solución amortiguadora de acetato de potasio 0.18 M a pH 6 con 25% de glicerol (v/v) y verde de metilo al 0.01%. Se empleó como solución de corrida, solución de ácido acético 0.1 M con β-alanina 0.06 M. La separación se llevó a cabo a corriente constante de 5 mA en el gel concentrador y aumentando a 9 mA cuando el frente de corrida se observó en el gel separador. Se invirtió la polaridad debido al pH ácido del gel y el carácter básico de las toxinas y otros componentes, colocando en la parte inferior el cátodo y en la parte superior el ánodo. La tinción del gel se realiza con azul de Coomassie R al 0.05% (m/v) en metanol al 10% con ácido acético al 7% (v/v) por no más de 30 min. El desteñido se realizó con esta última solución pero sin colorante.

5.9. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

5.9.1. Western blot

Para determinar el reconocimiento de los componentes del veneno por el antiveneno *Alacramyn*, las proteínas del veneno fueron separadas por SDS-PAGE. Las proteínas del gel fueron transferidas por vía semi-seca a una membrana de nitrocelulosa (0.2 μm) en una cámara de transferencia *Semi-Dry Blotter* (C.B.S. Scientific Co., CA, EUA). La solución amortiguadora para la transferencia fue de TRIS 25 mM y glicina 190 mM con 20% de metanol. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h con corriente constante (0.8 mA/ cm^2). Al término de la transferencia, el gel se tiñó con azul de Coomassie (ver sección 5.7.2) sólo para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana. Esta última, se bloqueó con BSA al 2 % en PBS 1x pH 7.4 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Se retiró el exceso de la solución anterior y se agregó el antiveneno en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1x con 0.05% de Tween 20 y BSA al 0.1% durante 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados con PBST. Se agregó el anticuerpo anti-caballo acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, BA, EUA) en una dilución 1:5000 en PBS 1x con 0.05% de Tween 20 y BSA al 0.1% durante 1h a temperatura ambiente. Se lavó la membrana de nuevo 5 veces con PBST. Para revelar la membrana se empleó diaminobencidina en una concentración de 0.7 mg/mL en solución amortiguadora TRIS 50 mM pH 7.5 con NiCl_2 al 0.03 % y 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de H_2O_2 . La reacción se detuvo con agua destilada, aproximadamente a los 2 minutos.

5.9.2. Ensayos de ELISA

Se determinó la EC50 de reconocimiento del antiveneno *Alacramyn* hacia los componentes en el veneno y toxinas purificadas mediante ensayos de ELISA, preparando curvas de dilución del antiveneno y fijando la cantidad de veneno o toxina en placas de 96 pozos de alta adherencia a proteínas. Se fijaron 0.5 µg de veneno de los alacranes: *C. ornatus*, *C. noxius*, *C. limpidus*, *C. suffusus*, *C. tecomanus* y *V. mexicanus*, y 5 ng de la toxinas: Co1, Co2, Co3, CII2, Ct1a y Cn2 en un volumen de 100 µL de solución amortiguadora de bicarbonato de sodio 50 mM pH 9.4. La adherencia del veneno o toxina se llevó a cabo toda la noche a 4°C. Posterior a ello, se desechó la solución con el antígeno y se bloquearon los pozos con 120 µL de una solución de BSA al 1 % en PBS 1X durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces el exceso de BSA con PBST y se colocaron las curvas de dilución del antiveneno *Alacramyn* en PBS 1x con Tween 0.05 % y BSA al 0.1 % de la siguiente manera:

Punto de la curva	Concentración de <i>Alacramyn</i> (mg/mL)
1	0.32
2	0.16
3	0.08
4	0.04
5	0.02
6	0.01
7	0.005
8	0.0025
9	0.00125
10	0.000625
11	0.0003125
12	0.0001563

Cada punto de la curva se realizó por triplicado y se dejó incubando por 2 h a temperatura ambiente. Posterior a ello se realizaron 5 lavados con PBST y se agregó el anticuerpo secundario anti-caballo acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, BA, EUA) en una dilución 1:2000, se dejó reaccionar el segundo anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente protegido de la luz. Se lavó de nuevo 5 veces con PBST y finalmente, se revelaron las placas con 100 µL de una solución de *o*-fenilendiamina 0.4 mg/mL preparada en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM pH 5 con 0.4 µL/mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Transcurridos 5 minutos se detuvo la reacción con 100 µL de HCl 6 N y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas de ELISA (Bio-Rad Laboratories Inc.). Para determinar la EC50 se graficaron los valores de la absorbancia vs log₁₀ de la concentración, las curvas fueron analizadas por regresión no-lineal (dosis-respuesta sigmoidea) usando el software Origin Lab 8 (MA, EUA).

5.9.3. Ensayos de interacción molecular: resonancia superficial de plasmones

Con la intención de probar la interacción entre algunos anticuerpos de formato ScFv dirigidos contra toxinas que se encuentren en el veneno de *Centruroides ornatus*, la Dra. Lidia Riaño del Instituto de Biotecnología, realizó un estudio preliminar de interacción molecular en un sistema de biosensores Biacore (BIACORE X, Upsala, Suecia). Se emplearon 200 ng de la toxina Co1 disuelta en 100 μ L de solución amortiguadora MES 10 mM a pH 6. De esta solución con la toxina, se tomaron 20 μ L y se unieron a la celda 2 del chip M5 usando un flujo de 5 μ L/min. Se establecieron los valores de unidades de resonancia (RU) para el acoplamiento-unión del antígeno y los valores de un blanco. Los sensogramas de reconocimiento se realizaron a 25°C y la solución de los fragmentos de anticuerpos humanos fue diluida a 100 nM en la solución HBS (Biacore). Se inyectaron 100 μ L de cada scFV en el chip en un flujo de 50 μ L/min y la fase de retraso fue de 400 s. La superficie del chip fue regenerada con HCl 10 mM. Los sensogramas obtenidos en cada ensayo se compararon mediante el programa *BIAevaluation 3.2*.

5.10. ENSAYOS DE ELECTROFISIOLOGÍA

5.10.1. Canales de potasio Kv1.3

El Dr. Gyorgy Panyi de la Universidad de Debrecen (Hungría) evaluó el efecto de algunas de las fracciones del veneno obtenidas por HPLC, en los canales Kv1.3 de linfocitos humanos activados. Las mediciones se realizaron usando la técnica de *Patch-clamp* en configuración de fijación de voltaje. Los registros se hicieron en equipos Axon Axopatch (Molecular Devices, CA, EUA). Generalmente la solución extracelular consistió de NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1mM, glucosa 5.5 mM, en solución amortiguadora HEPES 10 mM a pH 7.35. La osmolaridad de las soluciones exteriores fue de 302 y 308 mOsMoles/L. La solución de la pipeta contenía KF 140 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1mM en solución amortiguadora HEPES 10 mM y EGTA 11mM a pH 7.22. Para medir las corrientes se aplicaron pulsos despolarizantes de +50 mV durante 15 ms, desde un potencial de reposo de -100mV.

La adquisición y análisis de datos se realizó en el software pClamp 10. El efecto de las fracciones se evaluó como la fracción de corriente remanente ($RF=I/I_0$, donde I e I_0 son las amplitudes de las corrientes en la presencia y ausencia de toxina a determinada concentración, respectivamente). La concentración estimada de toxina fue de 50 nM considerando los pesos moleculares de los componentes identificados en cada fracción evaluada.

5.10.2. Canales de sodio Nav

El Dr. Froylan Gómez de la Facultad de Medicina de la UNAM, evaluó el efecto de las toxinas Co1 y Co3 sobre los canales de sodio Nav1.5 y Nav1.6. Los cultivos de las células HEK293 que expresan establemente los canales, se mantuvieron a 37°C en un atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de FSB y el antibiótico de selección G418 en concentración de 100 µg/ mL. Se midieron las corrientes macroscópicas mediante *Patch-clamp* en configuración de fijación de voltaje de células completas, empleando un amplificador Axopatch 1D (Axon Instruments). Los electrodos empleados de vidrio de borosilicato (Kimax 51) con resistencias de entre 1 - 1.5 MΩ. La capacitancia de la membrana y las resistencias del 80 al 90% fueron compensadas. Los registros se llevaron a temperatura ambiente. Los canales fueron activados con pulsos de 15 ms, variando de -80 a +55 mV, aplicados en incrementos de 5 mV a partir del potencial

de reposo de -110 mV. El tiempo entre pulsos fue de 3 segundos, para una completa recuperación de la inactivación rápida. En 15 ms previos al pulso de prueba, se aplicaron pulsos despolarizantes de +40 mv / 2 ms con la intención de permitir que el sensor de voltaje se ubicara en posición, y de este modo evaluar el efecto beta (Cestele, et al, 1998). Las observaciones en los registros de las corrientes de Na⁺ máximas fueron de entre 1 a 8 nA. La solución en la pipeta de pH 7.3 contenía CsF 90 mM, CsCl 16 mM, NaCl 30 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1mM, EGTA-Cs 10 mM, HEPES-Cs 10 mM. La solución extracelular a pH 7.4, contenía NaCl 158 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 2mM, HEPES-Cs 10 mM. Las toxinas fueron adicionadas a las soluciones extracelulares a partir de una solución stock concentrada.

6. RESULTADOS

6.1. *MASS-FINGERPRINTING* del veneno de *Centruroides ornatus*

En dos corridas independientes se aplicaron 1.2 mg del veneno soluble de *Centruroides ornatus* al equipo HPLC. En la primera corrida, se colectaron un total de 92 fracciones, cada una correspondiente a un pico observado en el cromatograma (Figura 7). Se identificaron un total de 114 componentes cuyo tiempo de retención y pesos moleculares determinados por espectrometría de masas se indican en la Tabla 2. Los componentes de masas moleculares de aproximadamente 4000 Da eluyeron en los tiempos de retención de 20 a 29 minutos; los correspondientes a los pesos moleculares entre 6000 a 7000 Da se encuentran entre los 30 y 39 minutos. Se observaron algunos componentes de bajo peso molecular < a 7000 Da entre los tiempos de retención de 39 a 42 minutos y todos los componentes de alto peso molecular mayores a 10 kDa se encuentran a partir de los 41 minutos.

En la fracción 52 se encontró una solo componente de peso molecular de 7339.73 Da (TR=32.46). Este péptido es el más abundante del veneno con un 10% del total y se propone la nomenclatura de toxina Co52. En las siguientes secciones se detallará más sobre este componente. Otros péptidos que se encontraron aislados son aquellos de las fracciones: 41 (TR=28.04, 4083.34 Da), 46 (TR=30.11, 6977.59 Da); 49 (TR=31.24, 7179.93); 55 (TR=34.11, 7560.48 Da); 58 (TR=35.37, 7339.38 Da); y 62 (TR=37.41, 7167.43 Da); y de los cuales, se determinó su secuencia N-terminal (Sección 6.2.3.1).

En la segunda corrida de RP-HPLC, se colectaron fracciones cada 5 minutos aproximadamente. De acuerdo a lo indicado en la Figura 7, 12 fracciones (F1 - F12) fueron colectadas para los bioensayos.

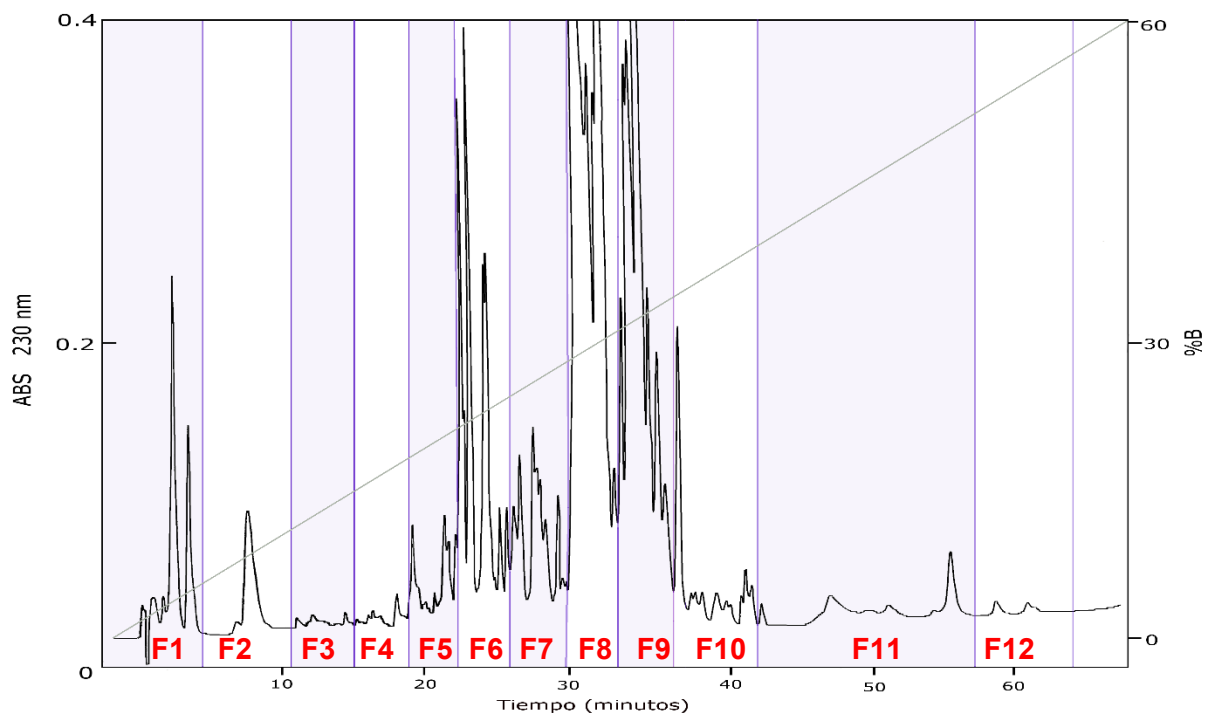


Figura 7. RP-HPLC del veneno total de *Centruroides ornatus*. Se aplicaron 1.2 mg de veneno en una columna C-18 empleando un gradiente lineal de 0% de A (agua con TFA 0.12%) a 60 % de B (ACN con TFA 0.1%) en 60 minutos a un flujo de 1 mL/min y una detección a una longitud de onda de 230 nm. El valor de corte de la carta es de 0.4 unidades de absorbancia de los 0 a los 30 minutos, posterior a los 30 minutos el valor de corte es de 2.0 unidades de absorbancia. F1 a F12 indica las fracciones colectadas de la segunda corrida.

Tabla 2. Mass fingerprinting del veneno soluble de *Centruroides ornatus*.

Fracción	Tiempo de retención (min)		Peso molecular (Da)		
1	2.85	3.38	NE		
2	4.13		NE		
3	4.64		485	693	
4	5.69		693		
5	-		510		
6	-		NE		
7	8.96		NE		
8	9.74		1180.75		
9	-		NE		
10	12.13		NE		
11	12.43		NE		
12	13.06		NE		
13	13.28		863	495	
14	-		561		
15	14.97		881		
16	15.42		458		
17	-		545	738	
18	17.04		473		
19	17.30		2511		
20	-		658	486	
21	18.86		477		
22	19.61		876	2517.6	
23	19.92		2610.97	2568	
24	20.44		2567	2610.5	
25	20.89		678	642	
26	21.14		1801.6		
27	21.89		1673.53		
28	22.10		3664.95		
29	22.60		3731.77		
30	22.84		3596	690	
31	23.44		4337.45	4434	
32	23.73		4338.10	3419.7	
33	24.29		4098.17	4338.29	
34	24.68		4270.39	4121.98	
35	24.88		4123.08	4269.7	
36	25.25		4269.82	4034.12	
37	25.82		4008.05	4283.29	
38	26.24		4008		
39	26.81		4206.78		
40	27.44		4121.47	3987.1	4270.4
41	28.04		4083.34		
42	28.42		4760.7	4083.2	
43	28.86		7799.15	2827.03	
44	29.49		2982	7799	
45	29.77		4156.01	3480.2	
46	30.11		6977.59		
47	30.71		7276.79	7180	6584.8
48	31.11		7179.51	7277.4	
49	31.24		7179.93		
50	31.75		7375.28	6439.2	7179

Fracción	Tiempo de retención (min)	Peso molecular (Da)		
51	32.19	7246.84	7375.26	
52	32.46	7339.73		
53	33.38	5162.43	7339	
54	33.76	6989.63	7560.32	5592.71
55	34.11	7560.48		
56	34.34	7560	7612.4	
57	34.87	7560.85	7173.2	7377.4
58	35.37	7339.38		
59	36.00	7297.58	7365.3	
60	36.50	7168.64	7313.81	
61	-	NE		
62	37.41	7167.43		
63	-	7150.6		
64	38.90	6046.2	7467.6	6968.7
65	39.39	4956		
66	40.16	3795.84	5929.2	
67	-	5394.3	2270	
68	41.31	16082.06		
69	42.13	3250.75	3579.55	
70	42.40	3579.63		
71	42.77	7399.74		
72	43.65	6134.4	7401	
73	-	NE		
74	-	NE		
75	-	NE		
76	Bajada	16054.96		
77	47.55	1811	7551.64	
78	-	NE		
79	-	35327.4		
80	-	31196.7		
81	-	NE		
82	-	17566		
83	-	11665	20287	
84	-	39246		
85	53.38	NE		
86	-	NE		
87	-	NE		
88	-	NE		
89	-	NE		
90	61.38	NE		
91	-	NE		
92	-	NE		

NE: No determinado

La distribución de los componentes encontrados en el veneno de *Centruroides ornatus* se muestra en la Figura 8. Los péptidos más abundantes son aquellos con masas moleculares de 6000-8000 Da (28, que representa 33% del total) y de 3500-4500 Da (27, que representa el 24%). Se determinó una cantidad considerable (19, representa el 13%) de componentes de bajo peso molecular con masas iguales o menores a 1000 Da. Los componentes de alto peso molecular con masas mayores a 8000 Da se encuentran en baja proporción (6.3%). Considerando los pesos moleculares de estos componentes se asume que son toxinas que reconocen canales de Na⁺ y K⁺ de acuerdo lo reportado en estudios previos (Batista, et al, 2007, Cid-Uribe, et al 2017).

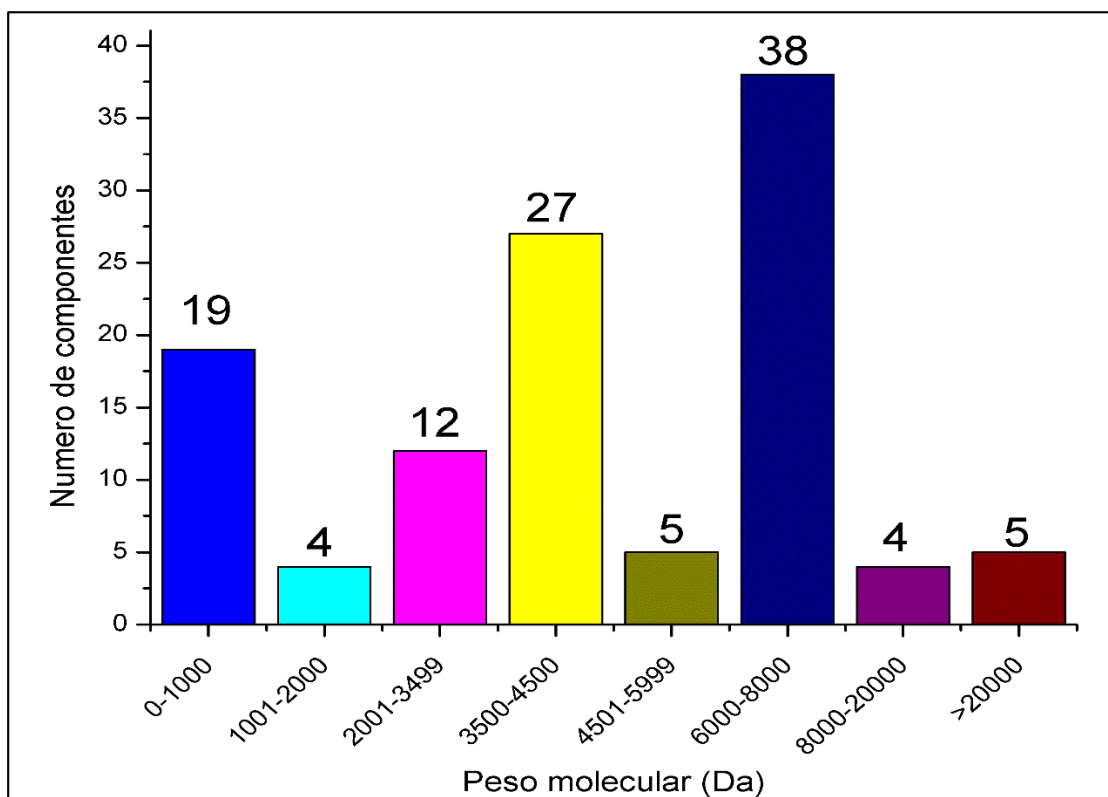


Figura 8 Distribución de los pesos moleculares de los componentes del veneno de *Centruroides ornatus*.

6.2. PURIFICACIÓN DE COMPONENTES DEL VENENO

6.2.1. Cromatografía de filtración en gel (exclusión molecular)

Con la finalidad de contar con material suficiente para la purificación, caracterización funcional y química de las toxinas del veneno, se fraccionó el veneno soluble en un primer paso de purificación mediante filtración en gel. Se obtuvieron 3 fracciones principales, similares a los resultados publicados en el grupo (Ramírez, et al., 1988). A partir del cromatograma, se identificaron los tubos que correspondían a cada fracción (Figura 9) y se calcularon los porcentajes de recuperación. La Fracción FII fue la más abundante con un 67.7%, seguido de la fracción FIII con un 14.26% y la fracción FI con un 8.17%. El porcentaje de recuperación total fue del 90.14% por lo que se considera una buena recuperación (Tabla 3). Se probaron las tres fracciones en ratón y se determinó que la fracción FII es letal en ratón (Sección 6.3.3). La eficiencia de la separación se analizó mediante SDS-PAGE observando la separación de grupos de componentes del veneno de acuerdo a su tamaño (Electroforesis, Sección 6.4.1).

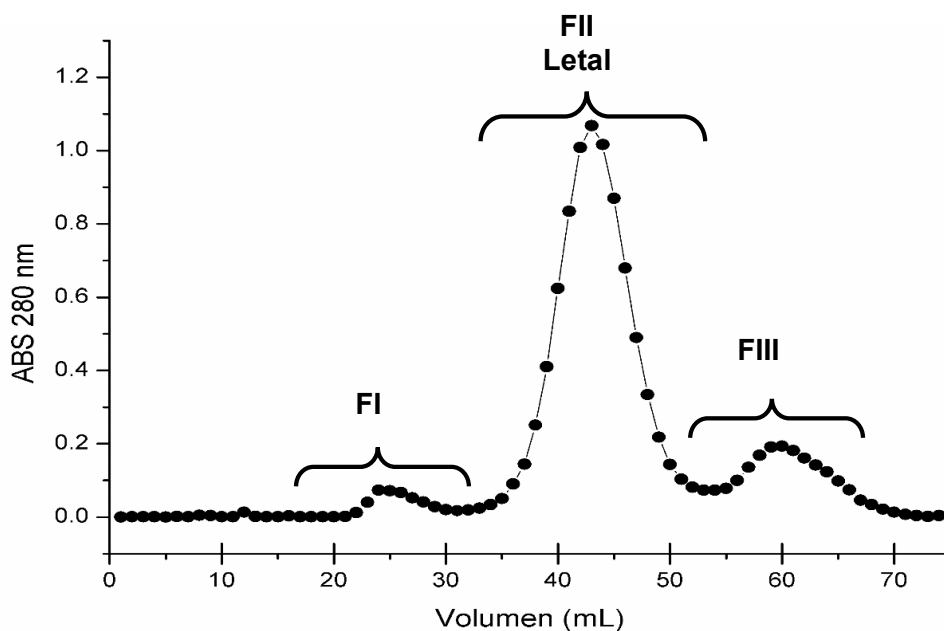


Figura 9. Filtración en gel del veneno total de *Centruroides ornatus*. En una columna de Sephadex G-50 fino equilibrada con solución amortiguadora de acetato de amonio 20 mM pH 4.5, se aplicaron 27 mg de veneno soluble. Los componentes eluyeron con la misma solución amortiguadora, manteniendo el flujo de la corrida en 15 mL/h. El volumen colectado por tubo fue de 1 mL y se les determinó la absorbancia a una $\lambda=280$ nm. La fracción FII es Letal en ratón.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación de las tres fracciones obtenidas a partir de 27 mg de veneno de *Centruroides ornatus* por filtración en gel (Sephadex G-50 fino).

Número de fracción	Cantidad de Proteína total estimada	% de recuperación
Fracción I	2.205 mg	8.17 %
Fracción II	18.283 mg	67.71 %
Fracción III	3.85 mg	14.26 %
% Recuperación total		90.14 %

6.2.2. Cromatografía de intercambio catiónico

Se obtuvieron 11 fracciones mediante intercambio catiónico de la fracción FII del paso anterior de exclusión molecular. Las fracciones fueron nombradas FII.1 – FII.11. Se determinó el porcentaje de recuperación para las fracciones FII.7, FII.8 y FII.9 siendo de 11.7%, 17.97% y 1.9%, respectivamente. Las fracciones FII.7 y FII.9 fueron letales en ratón (Sección 6.3.2) y en la fracción FII.8 se encontró el componente más abundante del veneno, la toxina Co52 (Sección 6.2.3.3).

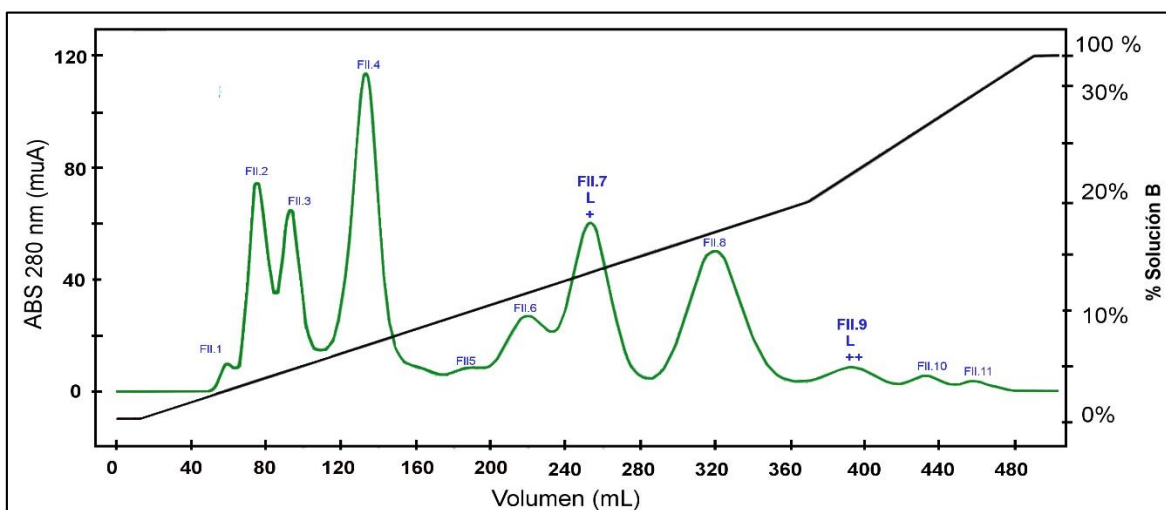


Figura 10. Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción FII del veneno de *Centruroides ornatus*. Se empleó una columna con CM-celulosa. La columna equilibrada con solución amortiguadora de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y las fracciones eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 20% de una solución de acetato de amonio 0.5 M (Solución B) en 180 minutos; el siguiente gradiente de 20 a 30 % de B de los 180 a 240 minutos; y un lavado con 100 % de B durante 10 minutos. Se registró la corrida a una longitud de onda de 280 nm en un flujo de 2 mL/min. L: letales. Fracciones FII.7 (+) y FII.9 (++)

6.2.3. Purificación de toxinas por HPLC y análisis de secuencias de aminoácidos

6.2.3.1. N-terminal de péptidos purificados por RP-HPLC

Se purificaron varios péptidos directamente por RP-HPLC (Sección 6.2.3) indicados en la Tabla 4. Para identificar este grupo de componentes se antepone “Co” de *Centruroides ornatus*, seguido de la letra “F” de fracción y el número identificador de la fracción correspondiente de HPLC (Tabla 2). Debido a la cantidad disponible de este grupo de péptidos, sólo se logró determinar la secuencia N-terminal. Cada una de estas secuencias fue comparada con la de mayor identidad mediante BLAST. El péptido Co-F41 es similar a la Slotoxina de *Centruroides noxius* que bloquea los canales de potasio Slo1; los péptidos Co-F46 y Co-F49 son similares a las toxinas de *Centruroides sculpturatus*, CsE5 y CsE neurotoxina 2 (CsE_Ntx2), respectivamente. El péptido de la fracción Co-F55 es la toxina principal que afecta mamíferos en el veneno de *Centruroides ornatus*, en las siguientes secciones se dará detalle sobre su caracterización funcional, química y la nomenclatura propuesta; esta toxina es similar a la toxina CII2 de *Centruroides limpidus*. El péptido Co-F58 tiene un 45% de identidad con la toxina putativa RjAa1 del alacrán cubano *Rhopalurus junceus*. Y el péptido Co-F62, el cual muestra la identidad más baja con las secuencias reportadas en las bases de datos, presentando un 41% de identidad con la β -toxina Css9 de *Centruroides suffusus*.

Tabla 4. Secuencia N-terminal de péptidos purificados directamente por RP-HPLC del veneno *Centruroides ornatus*.

Péptido	TR	PM (Da)	Secuencia N-terminal	Ref.	ID
Co-F41	28.04	4083.34	TFVDVDXTVSKEXWAPXKAAFFVDRGXKMG-	-	
Slotx	-	4085.89	TFIDVDCTVSKCEWAPCKAAFGVDRGKCMGKCKCYV	P0C182.1	80%
Co-F46	30.11	6977.59	KKDGYIVDSGNNKYEXLXDXY-	-	
CsE5	-	7067.95	KKDGYPVDSGNCNKEYECLKDDY-	P46066.1	76%
Co-F49	31.24	7179.93	KEGYLVNKSTGKXYSXDLGXKTFFFXDK-	-	
CsE_Ntx 2	-	7165.11	KEGYLVNKSTGCKYGLKLGGENEGNKCECK-	NTSR2C	75%
Co-F55	34.11	7560.48	KEGYLVNHSTGKXYEXFKLGDNDYXLRXKQQYGKGAGGYXYAFG-	-	
CII2	-	7575.63	KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFG-	P59898.1	89%
Co-F58	35.37	7339.38	TKDGYPLGRTQXTIPXLFNDNDFXNRK-KVELGKSXYXXF-	-	
RjAa1	-	7336.25	-KEGYPMGRNGCKISCVINNNFCKVECAKWRQSDGYCYF-	E7CLN4.1	45%
Co-F62	37.41	7167.42	KDGYPLGRTQXTIPXLFNDNDFXNRK-KVVLKGSXYXYFXXQL-S-	-	
Css9	-	7524.83	KDGYPMDHKGCKISCVINNKYCECTEVCVTLKGGKGYCYFWKLACY-	F1CGT6.1	41%

TR: tiempo de retención en minutos; PM: peso molecular; Ref.: número de referencia de la base de datos del NCBI; ID: porcentaje de identidad.

6.2.3.2. Toxinas que reconocen canales de Na⁺

Se purificaron y caracterizaron 4 toxinas que reconocen canales de Na⁺ y nombradas de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Possani, et al., 1999. La toxina Co52, que es el componente más abundante del veneno y las toxinas Co1, Co2 y Co3 que son las tres toxinas encontradas en el veneno que afectan a mamíferos. A continuación se describe su purificación y secuencia de aminoácidos. Los cromatogramas de la alquilación, digestión y los espectros de masas se reportan en la sección de material suplementario (Secciones 10.2-10.5). La evaluación de los ensayos biológicos y caracterización funcional se reporta más adelante (Sección 6.3).

6.2.3.3. Purificación y análisis de secuencias de las toxinas Co52

Como se indica en la Sección 6.1, el componente más abundante del veneno (10% del total) de *Centruroides ornatus* es una toxina de masa molecular de 7339.73 Da; la cual, fue identificada en el *mass fingerprinting* en la fracción 52 (Tabla 2) sin efecto biológico determinado al momento (Secciones 6.3.8 y 6.3.9), por la fracción en la que se identificó se ha nombrado como toxina Co52. Para eliminar posibles contaminantes se reinyectó la fracción empleando un gradiente más abierto, se corroboró la pureza al observar un solo pico en el cromatograma y se determinó una masa molecular de 7343.67 Da (Figura 11). Con base en la secuencia de aminoácidos se determinó que se trata del mismo componente y que la diferencia del peso molecular inicial se pudo deber a las variaciones del espectrómetro de masas. En la Figura 12 se muestra la secuencia de esta toxina, la cual tiene 65 aminoácidos, con 8 cisteínas y una masa molecular teórica de 7343.26 Da. En la Figura 13 se muestra la comparación de su secuencia con tres toxinas similares: CsE1 y CsE-v2 de *Centruroides sculpuratus*; y Cn5 proveniente de *Centruroides noxius*.

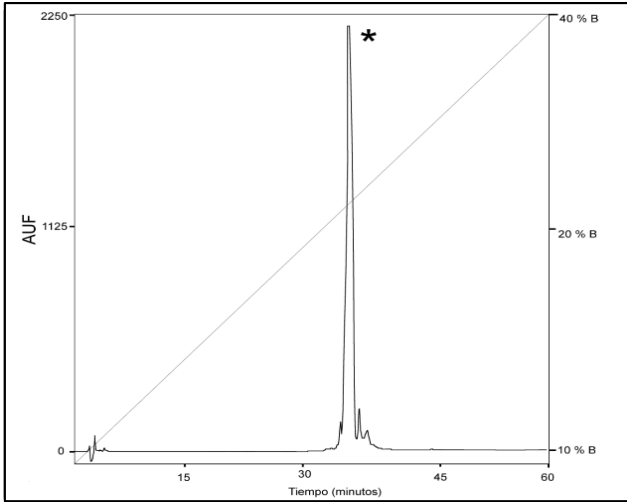


Figura 11. Purificación de la toxina Co52 (péptido más abundante) del veneno de *Centruroides ornatus* mediante RP-HPLC. Se empleó una columna C-18 y un gradiente lineal de 10 a 40% de B en 60 minutos. Bajo estas condiciones la toxina (*) eluyó a los 38.24 minutos y peso molecular de 7343.67 Da.

Secuencia	PM teórico (Da)	PM experimental (Da)
KEDGYLVDKTGCKKSCYKLGENDYCNRECKWKHVGGSYGYCYGFGCYCEGLSDSTPTWPLPNKTC Toxina Co52	7343.26	7343.67
KEDGYLVDKTGCKK CYKLGENDYCNRECKWK → Directa	3805.33	-
DYCNRECKWKHVGGSYGYCYGFGCYCEGLS → Asp-N	3734.38	3735.0
DSTPTWPLPNKTC → Asp-N	1517.6	1517.0

Figura 12. Determinación de la secuencia de la toxina Co52. Se muestra la secuencia completa y los péptidos digeridos por la endoproteasa Asp-N. PM: peso molecular.

Toxina	PM (Da)	Secuencias	ID	Ref.
Co52	7343.26	10 20 30 40 50 60 KEDGYLVDK-TGCKKSCYKLGENDYCNRECKWKHVGGSYGYCYGFGCYCEGLSDSTPTWPLPNKTC	100%	-
CsEI	7281.28E.....T.....F.....I.....Q.....	88%	1B3C_A
CsE-v2	7166.10NKS..... YG·L.....EG·DK.....A·NQ.....A·A·W.....PE.....Y.....S·S	68%	1JZA_A
Cn5	7136.11NKS.....G·LL·K·EG·DK.....A·NQ.....A·W.....PE.....Y.....S·S	66%	2KJA_A

Figura 13. Alineamiento de la secuencia de la toxina Co52 con tres toxinas similares. PM: peso molecular; Ref.: número de referencia de la base de datos del NCBI; ID: porcentaje de identidad. El símbolo (·) indica el mismo aminoácido de la secuencia de la toxina Co52.

6.2.3.4. Purificación y análisis de secuencias de las toxinas Co1 y Co3

A partir de la fracción FII.7 se purificaron por HPLC las toxinas Co1 y Co3 (Figura 14). La primera de ellas, es el principal componente tóxico a mamíferos del veneno de *Centruroides ornatus* encontrándose en un 5.5%. La toxina Co3 produce la muerte en mamíferos con una sintomatología característica (Ver Sección 6.3.5) y es menos abundante al encontrarse en un 0.98% del total.

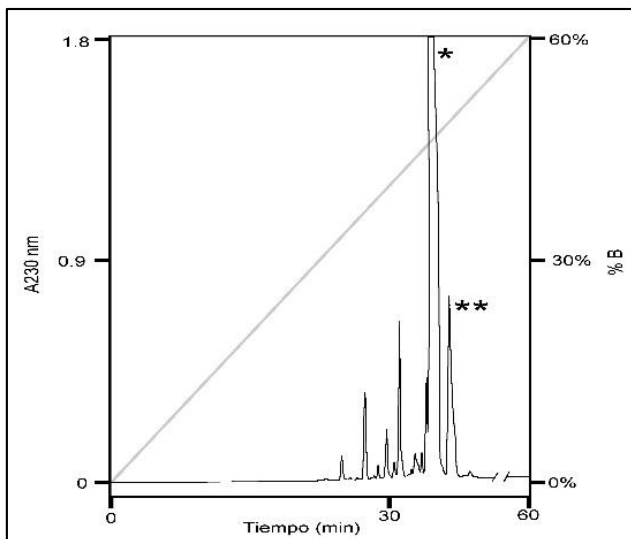


Figura 14. Purificación de las toxinas Co1 y Co3 por HPLC. La fracción FII.7 fue aplicada a una columna C-18 y los componentes eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 60% de B en 60 minutos. La toxina Co1 (*); TR=34.3 min, peso molecular de 7560.48 Da; Y toxina Co3 (**), TR=37.1 min, peso molecular de 7774.4 Da.

En la Figura 15 se muestra la secuencia de la toxina Co1, la cual tiene 65 aminoácidos, con 8 cisteínas y una masa molecular teórica de 7562.64 Da. La secuencia de la toxina Co1 sólo difiere en la posición T49N con la toxina CII2 de *Centruroides limpidus* y F17Y con la toxina Cii1 de *Centruroides infamatus*; con respecto a la toxina Clt1 de *Centruroides tecomanus* difiere en dos posiciones, K30R y N66S. El alineamiento de estas secuencias se muestra en la Figura 16.

Secuencia	PM teórico (Da)	PM experimental (Da)
KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGCWCWTHLYEQAVVWPLPKKTCN Toxina Co1	7562.64	7560.48
KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGC → Directa	5165.81	-
CKQQYGKGAGGYCYAFGCWCWTHLYE → Glu-C	3065.21	3066
DYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGCWCWTHLYEQAVV----- → Asp-N	5424.85+	5423.9
QAVVWPLPKKTCN → Glu-C	1541.77	1539.7

Figura 15. Secuencia de la toxina Co1. Se muestra la secuencia completa y los péptidos de digestión obtenidos por las endoproteasas Asp-N y Glu-C.

Toxina	PM (Da)	Secuencias	ID	Ref.
Co1	7562.64	KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQYQKAGAGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWVPLPKTCN	100%	-
Cii2	7539.60N.....	98%	P59898.1
Cii1	7578.64Y.....	98%	P59897.1
Clt1	7549.56R.....S	95%	P18926.1

Figura 16. Alineamiento de la secuencia de la toxina Co1 con las toxinas Cii2 de *Centruroides limpidus*, Cii1 de *Centruroides infamatus* y Clt113 de *Centruroides tecomanus*. PM: peso molecular; Ref.: número de referencia de la base de datos del NCBI; ID: porcentaje de identidad. El símbolo (·) indica el mismo aminoácido de la secuencia de la toxina Co1.

La toxina Co3, es una toxina con una masa molecular experimental de 7774.4 Da, mientras que el valor teórico a partir de la secuencia indicada es de 7775.9 Da. Debido a problemas con la digestión del péptido alquilado, no se confirmó la identidad de cinco aminoácidos del extremo C-terminal, los cuales se indican en color azul (Figura 17); no obstante, el peso molecular teórico con estos 5 aminoácidos sugeridos corresponde con el peso molecular experimental. Con esta secuencia, se realizó un alineamiento y se encontró que las tres toxinas con mayor identidad son: la toxina Cn8 de *Centruroides noxius*, Clt1 de *Centruroides tecomanus* y Cl13 de *Centruroides limpidus* (Figura 18).

Secuencia	PM teórico (Da)	PM experimental (Da)
KEGYIVNYYDGCKYPCVKLGDNDYCLRECLRLRYKSAAGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWVPLPKTCN Toxina Co3	7775.9	7774.4
KEGYIVNYYDGCKYPCVKLGDNDYCLRECLRLRYKSAAGGYCYAFACXCTHLYEXAVVWVPLXNKXCX → Directa	-	-

Figura 17. Determinación de la secuencia de la toxina Co3. Se muestra la secuencia directa obtenida y los aminoácidos sugeridos de la toxina.

Toxina	PM (Da)	Secuencias	ID	Ref.
Co3	7775.9	KEGYIVNYYDGCKYPCVKLGDNDYCLRECLRLRYKSAAGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWVPLPKTCN	100%	-
Cn8	7625.87T...FA·A.....KA·G·G.....G.....K·K·RA	82%	Q9TWL0
Clt1	7549.56	...L·HST...E·F.....QQ·G·GA.....G.....S	82%	P18926.1
Cl13	7845.98	...L·D·HT...T·A.....V.....Q·H.....R.....R·R	82%	C0HK69.1

Figura 18. Alineamiento de la secuencia de la toxina Co3 con tres toxinas similares. PM: peso molecular; Ref.: número de referencia de la base de datos del NCBI; ID: porcentaje de identidad. El símbolo (·) indica el mismo aminoácido de la secuencia de la toxina Co3.

6.2.3.5. Purificación y análisis de secuencia de la toxina Co2

Otra toxina que afecta mamíferos se purificó por HPLC de la fracción FII.9, en donde se observa prácticamente un pico aislado con un peso molecular de 7614.3 Da (Figura 19). Esta toxina se ha nombrado como toxina Co2, la cual se encuentra en un 0.77 % del veneno y sus efectos tóxicos en ratón se describen en la sección 6.3.5. Es un péptido de 66 aminoácidos con 8 cisteínas y a partir de la secuencia se obtiene un peso molecular teórico de 7614.81 Da. La secuencia completa se muestra en la Figura 20, junto con los péptidos obtenidos de la digestión con la endoproteasa Glu-C. El análisis de la secuencia muestra que al igual que la toxina Co3, la toxina Co2 presenta alta similitud con la toxina Cn8; otras dos toxinas con secuencias similares son la toxina Cii1 y la toxina Cell9 de *Centruroides elegans*. (

Figura 21).

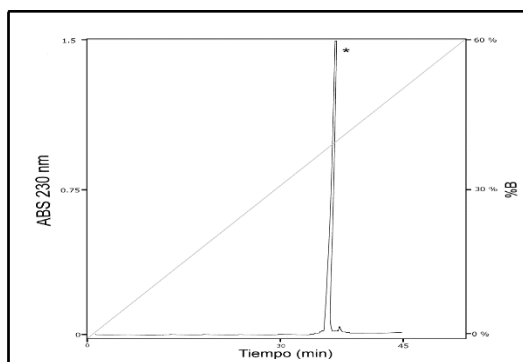


Figura 19. Purificación de la toxina Co2 por HPLC. La fracción FII.9 fue aplicada a una columna C-18 y los componentes eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 60% de B en 60 minutos. Se indica con (*) toxina Co2; TR= 35.8 min y peso molecular de 7614.3 Da.

Secuencia	PM teórico (Da)	PM experimental (Da)
KEGYIVNYHDGCKYACVKLGDNDYCLRECKLRYGKGAGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPKKRCN Toxina Co2	7614.81	7614.3
KEGYIVNYHDGCKYACVKLGDNDYCLRECKLRYGKGAGGYCYAFGC → Directa	5510.90	-
CKLRYGKGAGGYCYAFGCWCTHLYE → Glu-C	3078.29	3077.77
QAVVWPLPKKRCN → Glu-C	1596.86	1594.55

Figura 20. Determinación de la secuencia de la toxina Co2. Se muestra la secuencia completa y los péptidos de digestión obtenidos por la endoproteasa Glu-C.

Toxina	PM (Da)	Secuencias						ID	Ref.
		10	20	30	40	50	60		
Co2	7614.81	KEGYIVNYHDGCKYACVKLGDNDYCLRECKLRYGKGAGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPKKRCN						100%	-
Cn8	7625.87YT..KF..A.....A.....K..RA						89%	Q9TWL0
Cii1	7578.64	...L...ST...E.Y.....QQ.....T..						86%	P59897.1
Cell9	7590.65	...L..HST...E.F.....RQG.....T..A						85%	P0CH41.1

Figura 21. Alineamiento de la secuencia de la toxina Co2 con tres toxinas similares. PM: peso molecular; Ref.: número de referencia de la base de datos del NCBI; ID: porcentaje de identidad. El símbolo (·) indica el mismo aminoácido de la secuencia de la toxina Co2.

6.2.3.6. Comparación de secuencias de las principales toxinas con importancia médica en venenos de alacranes mexicanos

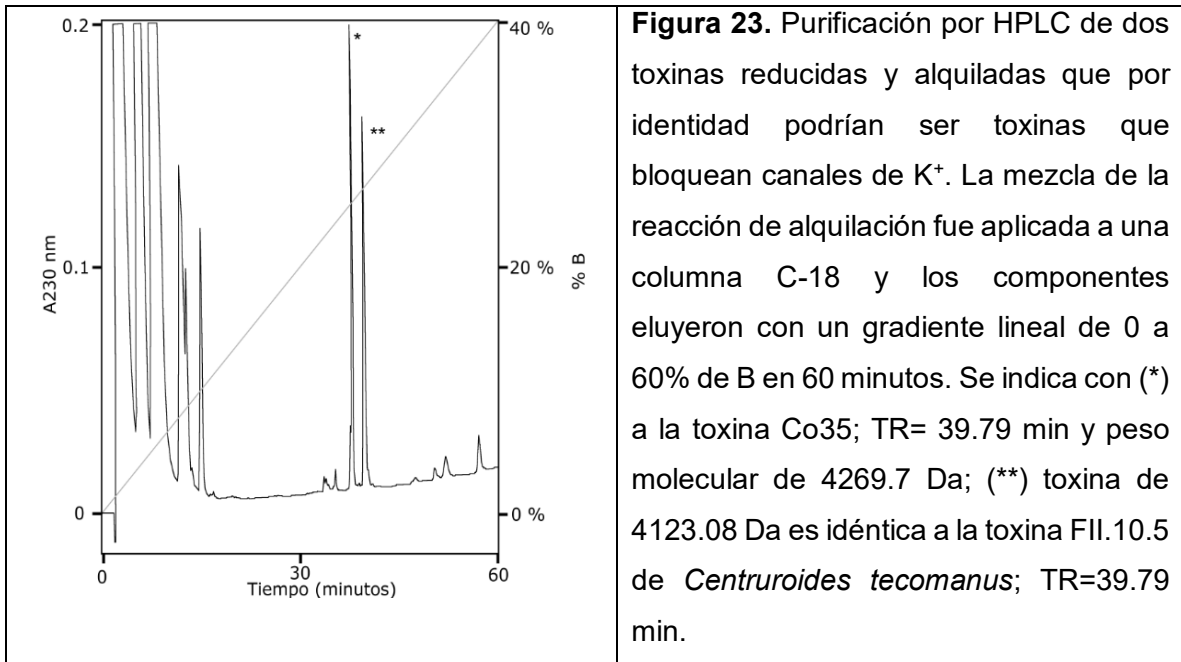
Se realizó un alineamiento de las secuencias de las toxinas Co52, Co1, Co2 y Co3 junto con las secuencias de las principales toxinas de relevancia médica de alacranes mexicanos. En la Figura 22 se observa la secuencia de la toxina Co1 y los cambios presentes en el resto de toxinas. Como se indicó en la sección 6.2.3.4, la toxina Co1, sólo difiere en un aminoácido con respecto a las secuencias de las toxinas CII2, Cii1 y también con la toxina Ct1a, mientras que con la toxina Cell9 difiere en 3 aminoácidos. Es de notar que en la mayoría de las toxinas de importancia médica reportadas al momento, en su secuencia se encuentra el residuo de E en la posición 15 y las excepciones son las toxinas CI13, Cn8 y las toxinas Co52, Co2 y Co3 descritas en este trabajo. Otra serie de aminoácidos presentes en la mayoría de las toxinas son QQYG conservados en las posiciones 31-34 y que de igual forma cambian para las toxinas CI13, Cn8, Co52, Co2 y Co3. En el caso particular de las toxinas Co2 y Co3, en la posición 10 se observa un cambio relevante por un residuo de D con carga negativa, mientras que en todas las toxinas reportadas al momento, en esta posición se encuentra un residuo de T con propiedades polares.

Toxina	PM (Da)	
		10 20 30 40 50 60
Co1	7562	KE-GYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQYQKGGAGGYCYAFGCWCCTHLYEQAVVWPLPKKTCN
CII2	7576N.....
Cii1	7579L.....
Ct1a	7591R.....
CII1	7542	..I..L.....Y.....T
Css2	7539SK.....L.....SS.....A.....N.....
Css4	7603SY.....F.....R.....S.....N.....
Cn2	7590DKN.....L.....A.....I.....N..R..S
Cell9	7591R..G.....A.....
Co2	7615	..I..YH..A..V.....LR.....R
Co3	7776	..I..YD..P..V.....RLR..Y..S.....A.....N.....
CI13	7846DYH.....T..A.....V.....RLR..YQS..H.....A.....R.....N..R..R
Cn8	7634YV.....FA..A.....AR.....K..RA
Co52	7343	..D..K.....KS..V..D.....N.....WKHVG..SY.....G..V..E..G..SDSIP..T.....

Figura 22. Alineamiento de secuencias de las toxinas con relevancia médica de alacranes mexicanos y la toxina Co52. PM: peso molecular. Se resaltan en color verde los aminoácidos polares; azul, aminoácidos con carga positiva; rojo, aminoácidos con carga negativa; y en gris, aminoácidos con cadenas alifáticas, no polares o aromáticos. Co52, Co1, Co2 y Co3 de *Centruroides ornatus*; CII2, CII1 y CI13 de *Centruroides limpidus*; Cii1 de *Centruroides infamatus*; Ct1a de *Centruroides tecomanus*; Css2 y Css4 de *Centruroides suffusus*; Cn2 y Cn8 de *Centruroides noxius*; y Cell9 de *Centruroides elegans*.

6.2.3.7. Purificación y secuencia de dos toxinas que reconocen canales de K⁺

Se evaluó el efecto sobre el canal de potasio Kv1.3 de las fracciones 31, 32, 34, 35, 37, 40, 41, 42 y 45 (Sección 6.6.2) obtenidas en el primer fraccionamiento del veneno por HPLC para la determinación del *mass-fingerprinting* (Tabla 2). La fracción que mostró un mayor bloqueo de las corrientes fue la fracción 35; por lo que se decidió caracterizar químicamente los componentes de esta fracción, en la cual coeluyen dos toxinas con pesos moleculares de 4123.08 y 4269.7 Da. En el cromatograma inicial se observa que la fracción 35 es un solo pico (Figura 7). Bajo las condiciones de HPLC no es posible purificar estas toxinas en su forma nativa, debido a que se requiere de pasos cromatográficos adicionales que requieren de mayor cantidad de proteína y nosotros contamos con una cantidad de material limitada. Es por ello, que la fracción se redujo y alquiló (Ver métodos) y el producto de la reacción al equipo HPLC. Con estas modificaciones, como se observa en la Figura 23, la toxina de peso molecular de 4269.7 Da eluyó a los 37.96 min mientras que la toxina de 4123.08 Da a los 39.79 min. La secuencia de ambas toxinas se obtuvo sin requerir cortes proteolíticos (Figura 24). Al realizar un BLAST, se encontró que al toxina de 4123.08 es la misma que la toxina FII-10.5 descrita por nuestro grupo, y encontrada en el alacrán *Centruroides tecomanus* (Olamendi-Portugal, et al., 2016). La otra toxina de peso molecular de 4269.7 Da no ha sido reportada y la llamamos toxina Co35, esta toxina tiene un 75% de identidad con la toxina FII-12.8, también de *Centruroides tecomanus*.



Toxinas	Secuencias	ID	PM (Da)	Ref
Co32	-----10-----20-----30-----40			
FII.12.8	TTINVKCTSPKQCLLPCKQIYGPHAGAKCMNKKCHCSKI	100 %	4271.2	-
Toxina de 4123.08 Da	TINVKCTSPKQCLLPCKQIYGPHAGAKCMNKKCHCSKI	75.7 %	4211.9	C0HJW5
FII.10.5	IFINVKCSSPQQCLKPCKKAFGQHAGGKCKCYP	100 %	4122.98	-
	IFINVKCSSPQQCLKPCKKAFGQHAGGKCKCYP	100 %	4122.98	C0HJW1

Figura 24. Secuencias de dos toxinas que bloquean canales de potasio en el veneno de *Centruroides ornatus*. Se indica con verde los cambios encontrados en la toxina Co32 con respecto a la secuencia de la toxina FII.12.8 de *Centruroides tecomanus*. PM: peso molecular; Ref.: número de referencia de la base de datos del NCBI; ID: porcentaje de identidad.

6.3. BIOENSAYOS

6.3.1. Toxicidad en ratón del veneno total

Se corroboró la toxicidad del veneno de *Centruroides ornatus* en dos ratones CD1 administrando 15 µg / 20g de peso, del veneno soluble por vía intraperitoneal. Aproximadamente a los 5 minutos de la administración el animal presentó signos de intoxicación los cuales comprenden: frecuencia respiratoria disminuida con respecto al control negativo, movimientos ondulatorios en su cola, se observó cianosis en hocico y cola, salivación excesiva, ojos abiertos, ligeros espasmos en músculos de sus extremidades posteriores y finalmente el ratón murió a los 20 minutos post administración.

6.3.2. Toxicidad de fracciones obtenidas por HPLC en ratón

Con la finalidad de identificar a los componentes tóxicos del veneno de *Centruroides ornatus* se probaron las 12 fracciones obtenidas del fraccionamiento del veneno por HPLC (Figura 7). Sólo la fracción F9 produjo muerte, en esta fracción se identificaron en el *mass fingerprinting* al menos 15 péptidos. En la fracción F7 se encontraron principalmente péptidos con pesos moleculares de 4000 Da y un péptido de 7799 Da, la cual produjo síntomas de intoxicación sólo por vía intracraneal, cuando se repitió el ensayo aumentando la cantidad de proteína mientras que por vía intraperitoneal, no se observó ningún efecto notorio. Por lo que el efecto observado tras la administración intracraneal se pudo deber a un daño en la zona durante la punción (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de la toxicidad en ratón de las fracciones obtenidas por HPLC del veneno de *Centruroides ornatus*.

Fracción	TR (min)	Vía de administración	Cantidad Administrada (µg)	Efecto
F1	0-5.5	I.P.	20	No tóxico
F2	5.5-10.2	I.P.	20	No tóxico
F3	10.2-14.2	I.C.	1	No tóxico
F4	14.2-18.7	I.C.	1	No tóxico
F5	18.7-22.9	I.C.	1	No tóxico
F6	22.9-26.3	I.P.	20	No tóxico
F7	26.3-29.6	I.C.	1	Tóxico
		I.P.	20	No tóxico
F8	29.6-33.5	I.P.	20	No tóxico
F9	33.5-37.6	I.P.	20	Letal
F10	37.6-41.9	I.P.	20	No tóxico
F11	41.9-56.8	I.P.	20	No tóxico
F12	56.8-65.4	I.P.	20	No tóxico

TR: Tiempo de retención

I.P.: intraperitoneal

I.C: intracraneal

No tóxico: sin efecto aparente observado.

Tóxico: signos de intoxicación, como temblores y sangrado en la zona de administración.

6.3.3. Toxicidad de fracciones obtenidas por exclusión molecular en ratón

Se probaron por vía intraperitoneal 20 µg / 20 g de peso de cada una de las tres fracciones FI-FIII obtenidas de la separación por Sephadex G-50 fino (Sección 6.2.1). Sólo la fracción FII fue letal con signos similares a los observados con el veneno total.

6.3.4. Toxicidad de fracciones obtenidas por intercambio catiónico en ratón

Se probaron por vía intraperitoneal 20 µg / 20 g de peso de cada una de las 11 fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico (Sección 6.2.2). Las fracciones FII.7 y FII.9 fueron letales. En la fracción FII.7 se determinó que los componentes responsables de letalidad fueron las toxinas Co1 y Co3, mientras que en la fracción FII.9 fue la toxina Co2 (Sección 6.2.3.5). En la fracción FII.8 se encontró a la toxina Co52 que como se ha indicado antes, se trata del componente más abundante del veneno (Sección 6.2.3.3). En esta fracción no se observaron signos aparentes de intoxicación. En la siguiente sección se describen los signos observados para cada una de ellas.

6.3.5. Efecto de las toxinas purificadas en ratón

Considerando que en una picadura de alacrán se encuentran alrededor de 200 µg de proteína, se consideró administrar excedentes de cada una de las toxinas purificadas. La toxina Co52 se encuentra aproximadamente en un 10%, por lo que en una picadura existen alrededor de 20 µg de esta toxina. Se administró el doble de esta cantidad y se confirmó que esta toxina no produce ningún efecto en ratones. La toxina Co1 se encuentra en un porcentaje cercano al 6% del veneno lo que representa una cantidad de aproximadamente 12 µg por picadura; de esta toxina se probaron 15, 5 y 3 µg provocando la muerte en todos los casos. Debido a las cantidades limitadas de las toxinas Co2 y Co3 sólo se probaron 5 µg de cada una, ambas produjeron muerte; sin embargo, los signos observados fueron diferentes a los provocados por la toxina Co1. Las cantidades de estas dos últimas toxinas representarían alrededor de 2.5 veces la cantidad encontrada en una picadura.

Tabla 6. Evaluación de la toxicidad en ratón de toxinas purificadas del veneno de *Centruroides ornatus*.

Toxina	PM (Da)	Cantidad	VA	Efectos observados
Co51	7343.67	40 µg	IP	Sin signos aparentes durante el periodo de observación.
Co1	7560.48	15 µg 5 µg 3µg	IP	A los 5 minutos de la administración se observó disminución de la frecuencia respiratoria. El animal comenzó a rascar su hocico y el pelo erizado. A los 15 minutos se observó cianosis en hocico y cola. La cola del animal presentaba movimientos en <i>zig-zag</i> . La salivación fue notoria e incremento la dificultad respiratoria. Excesiva apertura de ojos, posiblemente por el proceso de sofocación. A los 20 minutos el animal presentó serios problemas para moverse y la muerte ocurrió entre los 20 a 30 minutos.
Co2	7614.3	5 µg	IP	El proceso de intoxicación fue similar al observado con la toxina Co1, pero en los animales administrados con la toxina Co2 se observaron espasmos fuertes y espontáneos. La muerte ocurrió también entre los 20 y 30 minutos.
Co3	7774.4	5 µg	IP	A los 10 minutos el animal empezó con molestias en el hocico, por aparente irritación en las vías respiratorias. A los 15 minutos se observó dificultad respiratoria, sin salivación excesiva. Fuertes contracciones musculares de patas traseras que producían brinco fuertes y aparentemente involuntarios. Se observó fuerte irritación en los ojos ya que el animal permaneció la mayor parte del tiempo con los ojos entre abiertos. Tras 20 minutos, el animal tuvo aparentemente parálisis en las patas traseras y la cola erguida, lo que le dificultaba moverse y los espasmos fuertes se seguían presentando esporádicamente. El animal murió aproximadamente a los 40 minutos.

PM: peso molecular; VA: vía de administración; IP: intraperitoneal

6.3.6. Toxicidad del veneno total en grillo

Considerando que la toxina Co52 es el componente más abundante del veneno y que mostro no tener efecto tóxico en mamífero se decidió probar el efecto del veneno total en insecto. Se administraron 10 µg de veneno en 3 grillos y de acuerdo a lo esperado el veneno fue tóxico; ya que inmediatamente tras la administración, los grillos quedaron paralizados y 2 de ellos murieron en menos de 30 minutos mientras que uno de los grillos permaneció paralizado durante las 24 h de observación permaneciendo vivo.

6.3.7. Toxicidad de fracciones obtenidas por HPLC en grillo

Debido a las cantidades limitadas se evaluó la toxicidad de algunas de las 12 fracciones obtenidas por HPLC que se probaron también en ratón. Las fracciones probadas fueron: F1, F6-F11. Sólo la fracción F9 provocó parálisis de los grillos, sin embargo, no produjo muerte durante el periodo de observación (Tabla 7). Por lo anterior, los componentes que afectan a ratón y grillo se encuentran en la misma fracción.

Tabla 7. Evaluación de la toxicidad en grillo de las fracciones obtenidas por HPLC del veneno de *Centruroides ornatus*.

Fracción	TR (min)	Cantidad Administrada (µg)	Efecto
F1	0-5.5	5 10	No tóxico
F2	5.5-10.2	-	NE
F3	10.2-14.2	-	NE
F4	14.2-18.7	-	NE
F5	18.7-22.9	-	NE
F6	22.9-26.3	10	No tóxico
F7	26.3-29.6	5 10	No tóxico
F8	29.6-33.5	5 10	No tóxico
F9	33.5-37.6	5 10	Tóxico
F10	37.6-41.9	10	No tóxico
F11	41.9-56.8	5 10	No tóxico
F12	56.8-65.4	-	NE

NE: no evaluado

6.3.8. Toxicidad de la toxina Co52 en grillo

La toxina Co52 purificada no mostró efecto tóxico en ratón, por lo que se decidió probar en grillo con la intención de demostrar un posible efecto insecticida. Sin embargo, al administrar 5 y 10 µg de esta toxina purificada no se observó ningún efecto.

6.3.9. Toxicidad de la toxina Co52 en pollo

Se sabe que algunas aves se alimentan de alacranes, por lo que se pensó que la gran cantidad de toxina Co52 producida por *Centruroides ornatus* en su veneno, podría representar un papel de defensa y por su similitud con la toxina CsEI la cual se sabe es tóxica en pollos (Babin, et al., 1975). Es por ello que se administró por duplicado 60 µg de la toxina Co52 por vía intraperitoneal en pollos de dos semanas de edad, sin observar un efecto tóxico notorio.

6.3.10. Ensayos de neutralización en ratón

Se realizaron pruebas de neutralización del veneno completo y la toxina Co3 incubados previamente con el antiveneno *Alacramyn*. Los ensayos se hicieron por duplicado, encontrando que en el control de veneno (2DL50) sin antiveneno, un ratón sobrevivió, aunque la cepa CD1 es sensible a los venenos de alacrán, la resistencia a los efectos de los venenos no es un evento inusual (Padilla , et al., 2003). Los animales administrados con la toxina Co3 murieron aproximadamente a los 40 min. El antiveneno logró neutralizar por completo los signos de intoxicación del veneno completo. En el caso de la toxina Co3, los animales sobrevivieron pero algunos signos se presentaron durante la primer hora de observación, entre los cuales destacan: aislamiento del animal, poca actividad y aparente escurrimiento nasal; los efectos de fuertes contracciones musculares que provoca la toxina, no fueron observados con la mezcla con el antiveneno (Tabla 8)

Tabla 8. Ensayo de neutralización del antiveneno Alacrayn con el veneno completo de *Centruroides ornatus* y la toxina Co3.

Tratamiento	Veneno / toxina	Antiveneno	Sobrevivientes
Veneno completo	26.6 µg (2DL50)	-	1/3
Toxina Co3	5 µg	-	0/2
Veneno completo + antiveneno	26.6 µg (2DL50)	15 mg	3/3
Toxina Co3 + antiveneno	5 µg	5 mg	2/2

6.4. Perfiles electroforéticos de los componentes del veneno de *Centruroides ornatus*

La elaboración de geles de poliacrilamida en condiciones reductoras con SDS, se llevó a cabo con la finalidad de determinar el patrón de separación de los componentes en los venenos y para determinar las cantidades adecuadas de proteínas a transferir para el reconocimiento por el antiveneno mediante Western blot (Sección 6.5.1). También se aplicaron las fracciones FI-FIII obtenidas del fraccionamiento del veneno por filtración en gel (Sección 6.2.1) para determinar la eficiencia en la separación. En la Figura 25, se muestra el patrón de separación de los venenos de *Centruroides ornatus* y *Centruroides noxius*, y las fracciones FI-FIII. En la parte superior de los carriles se observan bandas definidas, las cuales corresponden a los componentes de entre 28 y 40 kDa que podrían corresponder a las enzimas del veneno. Estas bandas no se observan en los carriles correspondientes a la fracción FII y FIII por lo que la cromatografía de filtración en gel fue adecuada. En el caso del carril con la fracción FIII no se observa ninguna banda, lo que indica que en esta fracción se pueden encontrar los componentes de muy bajo peso molecular y que posiblemente no tengan carácter proteico (por ejemplo, lípidos, carbohidratos, sales, entre otros) para poder ser teñidos con azul de Coomassie, pero que sí contienen grupos aromáticos que les confiera la propiedad de absorber en la longitud de onda de 280 nm. En la parte media de los carriles no se observaron bandas definidas, en esta región se encontrarían componentes de aproximadamente 15 kDa, sin embargo, en el veneno existen muy pocos componentes de tamaño de entre 8 a 20 kDa. En la parte inferior de los carriles, se encontraron la mayoría de los componentes proteicos del veneno que corresponden a las toxinas. Este grupo de componentes no se pueden separar bajo estas condiciones y es por ello que se observan en el gel como una banda intensa a lo largo de región donde corren los componentes de entre 3 y 10 kDa.

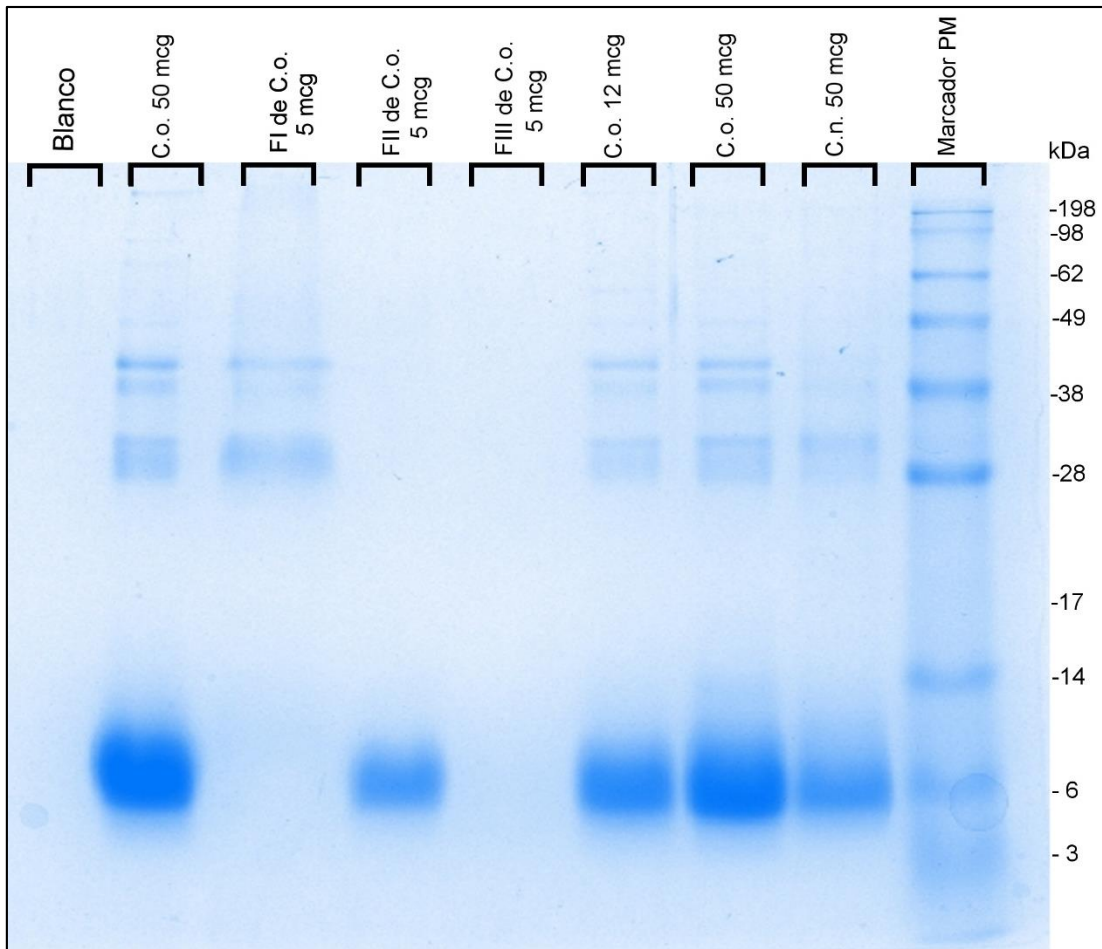


Figura 25. Separación de los componentes de veneno completo y las fracciones FI-FIII. Gel al 12 % de poliacrilamida con 5% de β -mercaptoetanol en solución amortiguadora de TRIS-Glicina. El blanco consistió de solución amortiguadora de carga con agua. Los números indican los valores del marcador de peso molecular en kDa.

Las toxinas del veneno no se pueden separar por SDS-PAGE; sin embargo, mediante electroforesis en condiciones no reductoras a pH ácido se logran separar muchos de los componentes, incluyendo a las toxinas. Se separó el veneno completo de *Centruroides ornatus* y como se ve en la Figura 26 existen dos bandas intensas indicadas con flechas. La que se encuentra en la parte inferior corresponde a la toxina Co1; mientras que la de la parte superior, por la abundancia, podría tratarse de la toxina Co52. Entre estas dos bandas, se distinguen alrededor de 4 bandas adicionales; por lo que este patrón obtenido, corresponde a lo reportado recientemente en el grupo (Riaño-Umbarila, et al., 2017). En este mismo gel se cargaron muestras de la toxina Co1, obtenida de diferentes procesos de purificación por HPLC (Sección 10.1), se observó una sola banda, lo que permitió asegurar la homogeneidad de la toxina para los pasos posteriores de caracterización.

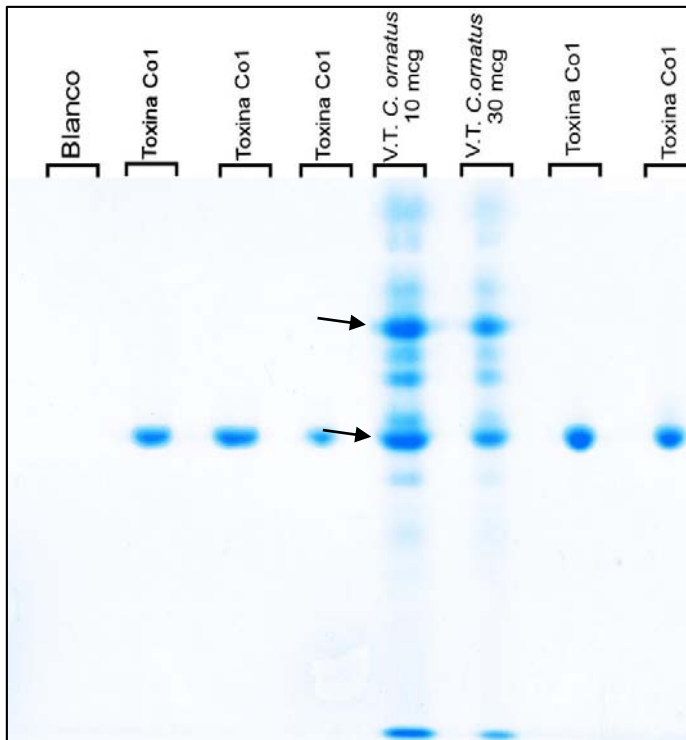


Figura 26. Perfiles electroforéticos del veneno completo de *Centruroides ornatus* y la toxina Co1 en condiciones no desnaturizantes a pH ácido. Se aplicó 1 μg de la toxina Co1 obtenida de diferentes pasos de purificación por HPLC (Sección 10.1). La cantidad de veneno aplicada fue de 10 y 30 μg . El blanco consistió de la solución amortiguadora de carga con agua (1:1).

6.5. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

6.5.1. Detección de los componentes del veneno de *Centruroides ornatus* mediante Westernblot empleando el antiveneno Alacramym

Una forma de evaluar el reconocimiento de los componentes del veneno por el antiveneno es mediante la transferencia de los componentes a una membrana adecuada y hacer la inmunodetección empleando los antivenenos disponibles como anticuerpos primarios. En otro gel de SDS-PAGE se realizó la separación electroforética de los componentes del veneno de los siguientes 5 alacranes: *Centruroides ornatus* (C.o.), *Centruroides noxius* (C.n.), *Centruroides infamatus* (C.i.), *Centruroides suffusus* (C.s.) y *Vaejovis mexicanus* (V.m.). En la Figura 27 se observa que el antiveneno *Alacramyn* reconoce a la mayoría de los componentes en los venenos analizados y sólo para el caso del veneno de *V. mexicanus*, se observa que en la banda donde se encuentran las toxinas (4-7 kDa) no existe un reconocimiento claro como en el resto de los venenos. Se observan las bandas del marcador del peso molecular debido a la pre-tinción del fabricante.

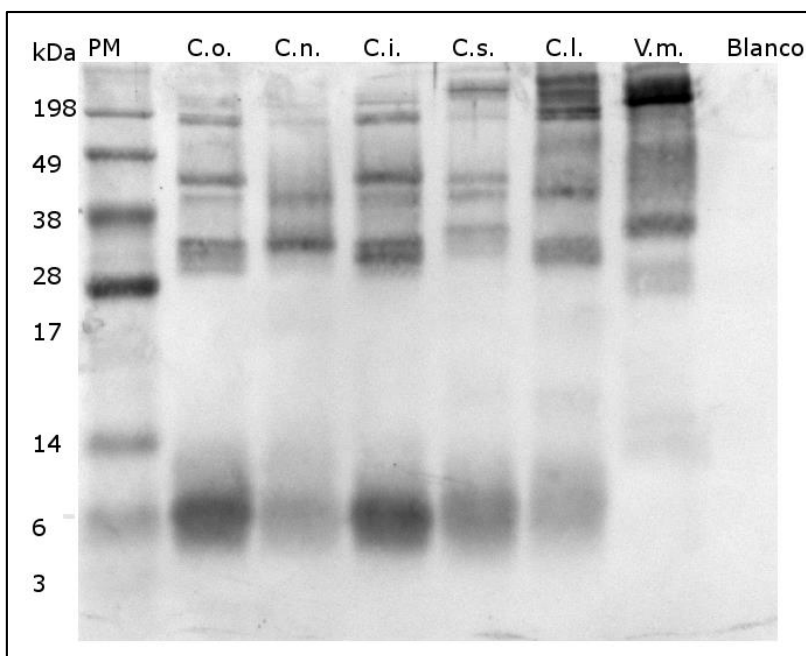


Figura 27. Western blot de los componentes de venenos de alacranes mexicanos tras la separación por SDS-PAGE (12%). PM: marcador de peso molecular. Los números indican los valores del marcador de peso molecular en kDa.

6.5.2. Determinación de la EC50 del veneno de *Centruroides ornatus* empleando el antiveneno *Alacramyn*

El reconocimiento de los componentes de los venenos de alacrán por el antiveneno *Alacramyn* también fue evaluado mediante un ensayo de ELISA fijando en la placa, cantidades determinadas de los venenos completos y toxinas purificas. En la Figura 28, se muestra que los venenos de los alacranes del género *Centruroides* presentaron un reconocimiento similar, ya que las curvas prácticamente se traslapan y los valores de EC50 son similares (la EC50 se define como la concentración en la cual la absorbancia del antiveneno alcanza el 50% de la máxima absorbancia). La diferencia fue notoria para el veneno de *Vaejovis mexicanus*, ya que el reconocimiento fue menor y el valor de la EC50 fue aproximadamente 4 veces mayor con respecto a la obtenida con los venenos de los alacranes *Centruroides*.

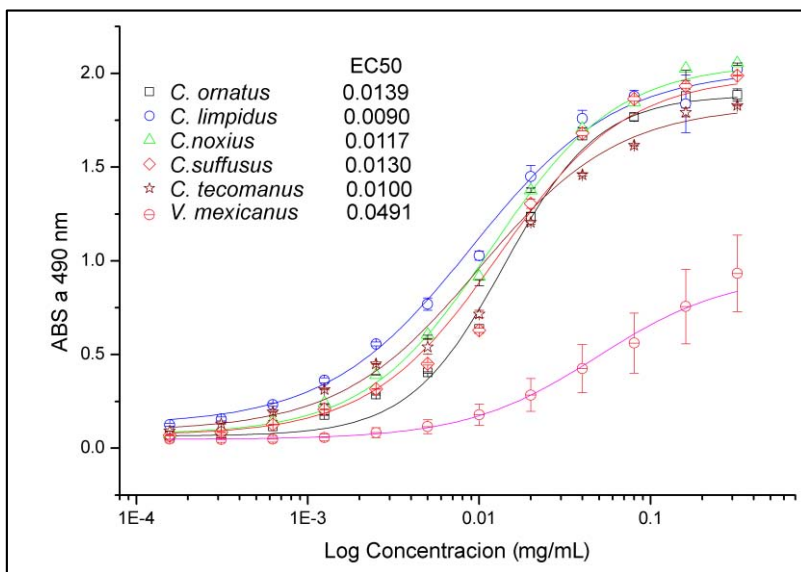


Figura 28. Curva de reconocimiento del antiveneno *Alacramyn* sobre los diferentes venenos pertenecientes al género *Centruroides* y el veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus*.

En el caso del reconocimiento de toxinas purificadas se emplearon las tres toxinas que afectan mamíferos del veneno de *Centruroides ornatus*, Co1, Co2 y Co3; y también se emplearon las toxinas CII1, CII2, Ct1a y Cn2. En la Figura 29 se muestran las curvas de las diluciones del antiveneno mostrando una disminución en el reconocimiento de todas las toxinas evaluadas con respecto al veneno total de *Centruroides ornatus* (C.o.). Las toxinas Co1, CII1, CII2, Cn2 tuvieron un reconocimiento muy semejante ya que las curvas de estas toxinas se traslapan y lo cual se ve también reflejado en los valores similares de EC50. Las toxinas Co2 y Co3 tuvieron el menor reconocimiento con valores de EC50 mayores con respecto al resto de toxinas y el veneno total. La toxina Co52 que no es tóxica a mamíferos, tuvo un menor reconocimiento que las toxinas Co1, CII1, CII2, Cn2.

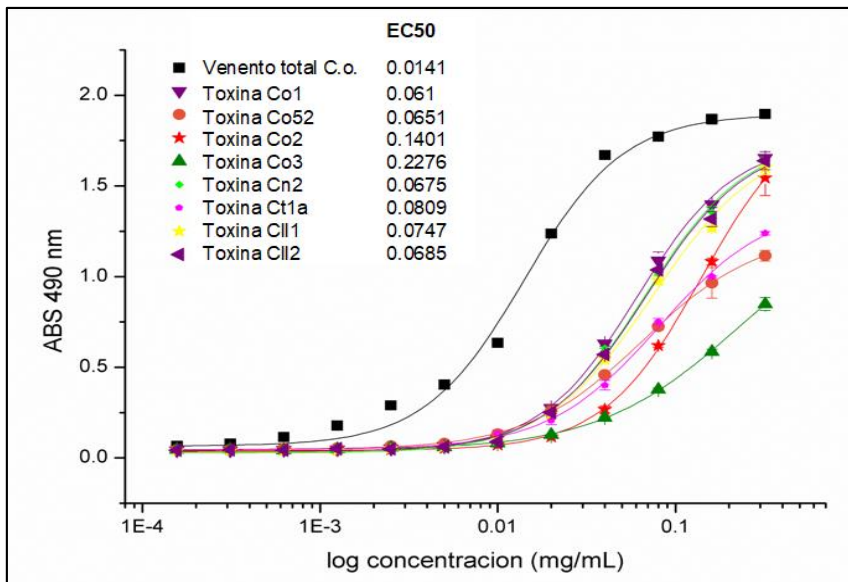


Figura 29. Curva de reconocimiento del antiveneno *Alacramyn* sobre toxinas de importancia médica en venenos de alacranes mexicanos. Se indican los valores de la EC50 determinada.

6.5.3. Ensayos de resonancia superficial de plasmones. Reconocimiento de la toxina Co1 por anticuerpos en formato scFvs

En un ensayo preliminar realizado por la Dra. Lidia Riaño, se evaluó el reconocimiento de la toxina Co1 por los anticuerpos scFvs denominados 10FG2, LR y 9D. Aunque estos resultados son de carácter preliminar, se puede observar que los tres anticuerpos se asocian con la toxina con una cinética similar; mientras que la curva de disociación aparentemente es más lenta para el anticuerpo 10FG2, seguido de los anticuerpos LR y 9D (Figura 30). Se sabe que el anticuerpo 10FG2 neutraliza los efectos tóxicos de la toxina CII2 (comunicación personal con la Dra. Lidia Riaño) por lo que se esperaría que este anticuerpo también neutralice los efectos de la toxina Co1 ya que a nivel de secuencia ambas toxinas difieren sólo en un aminoácido (Sección 6.2.3.6).

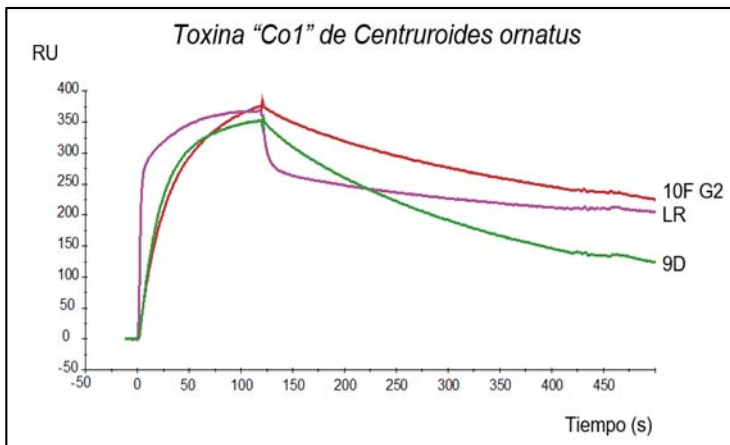


Figura 30. Sensograma que muestra la cinética de interacción de los anticuerpos scFvs 10FG2, LR y 9D con la toxina Co1. Se observa que los 3 scFvs (100 nM) reconocen a la toxina principal de *Centruroides ornatus*.

6.6. ELECTROFISIOLOGÍA

6.6.1. Efecto de las toxinas Co1 y Co3 en los canales de sodio Nav 1.5 y Nav1.6

Hasta el momento, sólo se ha realizado la caracterización funcional de la toxina Co1 en el canal Nav 1.6. Los resultados preliminares muestran que en presencia de la toxina Co1 (100 nM), la activación del canal empieza a potenciales más negativos. Aún con un pulso de prueba de -70 mV las corrientes iónicas son evidentes, y este efecto es más claro a -40 mV mientras que en condiciones control estos valores de voltaje no producen ninguna corriente aparente (Figura 31-A). El efecto de la toxina Co3 se evaluó en este mismo canal, Figura 31-B, mostrando resultados similares a los de la toxina Co1, ya que las corrientes iónicas aparecen desde potenciales de -70 mV y en el control inician a partir de un potencial de 0 mV. La toxina Co3 también fue evaluada en el canal Nav 1.5 (Figura 31-C), en donde aparentemente existe una disminución en la amplitud de las corrientes a potenciales despolarizantes, lo que da un indicio de un bloqueo del canal, estudios adicionales se requieren para confirmar este efecto.

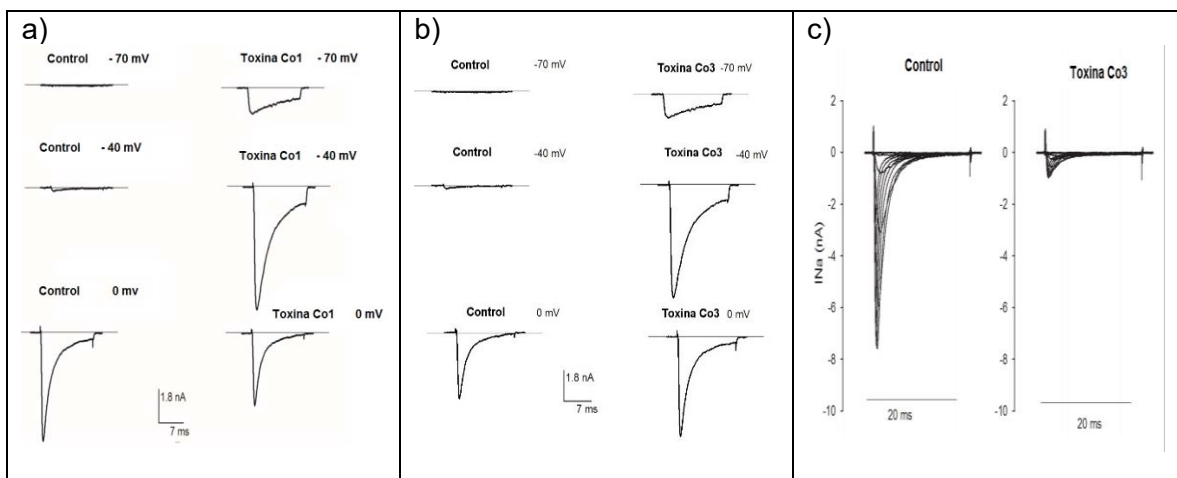


Figura 31. Experimentos de electrofisiología de las toxinas Co1 y Co3 sobre los canales de sodio Nav1.5 y Nav 1.6. Se muestran ejemplos de los registros electrofisiológicos. Las concentraciones de las toxinas fueron de 100 nM. A) efecto de la toxina Co1 en el canal Nav1.6. B) Efecto de la toxina Co3 en el canal Nav 1.6 y C) en el canal Nav 1.5.

6.6.2. Efecto de fracciones del veneno sobre el canal de potasio Kv1.3

El efecto de varias fracciones del veneno obtenidas por HPLC se evaluó con la técnica de fijación de voltaje (*Patch-clamp*) en los canales de potasio Kv1.3 de linfocitos activados. Las fracciones evaluadas fueron las 31, 32, 34, 35, 37, 40, 41, 42 y 45 (Tabla 2) a una concentración estimada de 50 nM. En la Figura 32 se muestra un ejemplo de los registros de las corrientes de K⁺ obtenidas con un pulso de prueba de +50 mV a partir de un potencial de reposo de -100 mV, en presencia de las fracciones 35, 37, 40 y 41 y TEA como control. En la misma figura, se indica también que el efecto inhibitorio es reversible (lavado). Se observa que el mayor efecto inhibitorio fue para la fracción 35 donde se encuentran dos toxinas, la que se denomina Co35 y otra toxina con la misma secuencia de la toxina FII-10.5 descrita previamente en el grupo (Olamendi-Portugal, et al., 2016) del alacrán *Centruroides tecomanus* (Sección 6.2.3.7).

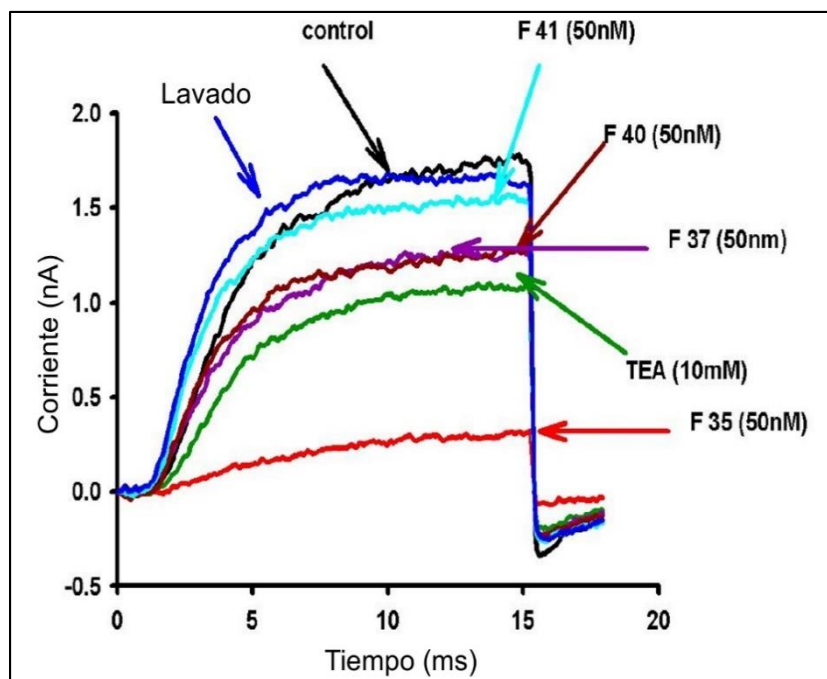


Figura 32. Efecto de las fracciones 35, 37, 40 y 41 sobre el canal Kv1.3. Las corrientes se midieron en la configuración de célula completa en linfocitos humanos activados. El registro muestra las corrientes antes de la aplicación de cada fracción (Control) y después de su aplicación de una concentración estimada de 50 nM. Las fracciones fueron perfundidas a través de la solución exterior.

Los datos de la fracción de corriente remanente (RCF) de todas las fracciones se muestran en la Figura 33. Como se indicó anteriormente, la fracción 35 mostró el mayor efecto inhibitorio de las corrientes, aunque las fracciones 31 y 34 también mostraron una inhibición considerable. El efecto observado en la fracción 34, podría deberse a la presencia de los componentes de la fracción 35 contigua, ya que todos estos péptidos eluyen en tiempos de retención muy cercanos en la condiciones de HPLC. Las fracciones 41, 42 y 45 no mostraron efectos sobre estos canales, por lo que podría esperarse cierta selectividad sobre otros subtipos de canales de K^+ .

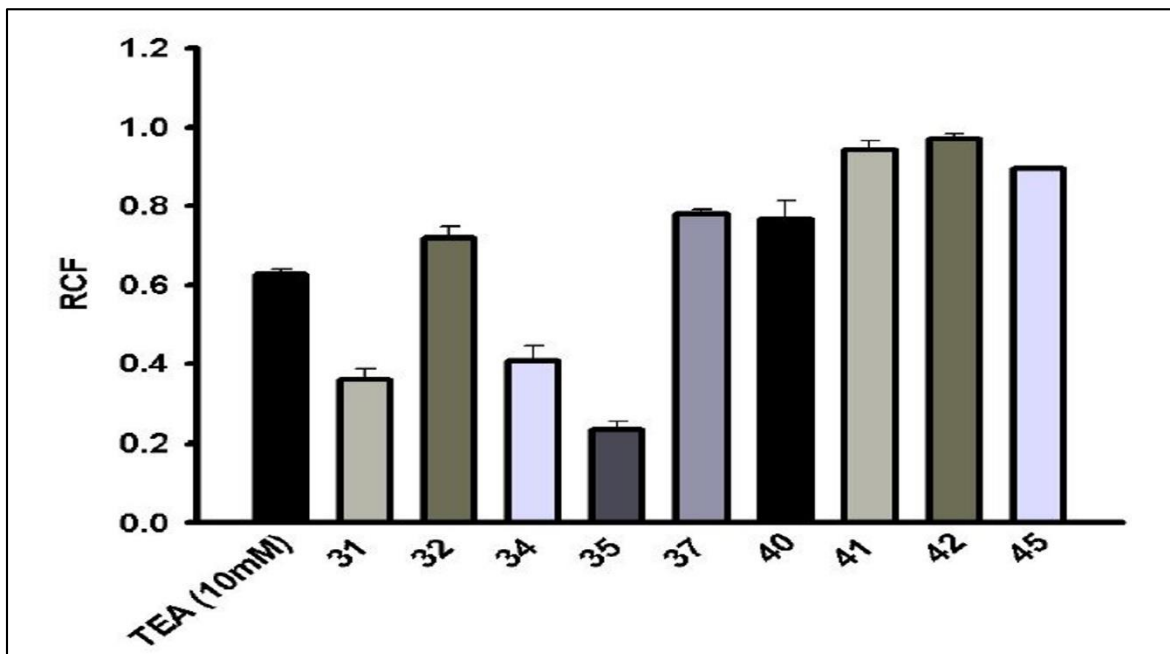


Figura 33. Comparación del efecto de inhibitorio de varias fracciones del veneno de *Centruroides ornatus* sobre las corrientes de K^+ de los canales Kv1.3 de linfocitos humanos activados.

7. DISCUSIÓN

El alacrán *Centruroides ornatus* es una especie considerada de importancia para la salud pública (Riaño-Umbarila, et al, 2017), la cual ha sido descrita desde principios del siglo pasado; aunque no existen reportes sobre la composición de su veneno. Por lo que en este trabajo reportamos la composición de su veneno; la purificación, caracterización química y funcional de sus principales toxinas; y la evaluación inmunológica del veneno y de las toxinas identificadas, empleando el antiveneno comercial *Alacramyn* y un anticuerpo en el formato scFv.

La composición del veneno se analizó mediante *mass fingerprinting* realizado por HPLC y espectrometría de masas. Se identificaron los pesos moleculares, de al menos, 114 componentes (Tabla 2). La mayoría corresponden a péptidos/toxinas que reconocen canales de Na⁺ o K⁺ (Batista, et al., 2007). También identificamos alrededor de 19 componentes de peso molecular menor a 1000 Da. Por otra parte, las proteínas mayores a 20 kDa son las menos abundantes, de las cuales, las proteínas con pesos moleculares identificados entre 16 a 35 kDa podrían corresponder a las enzimas del veneno tales como fosfolipasas, proteasas o hialuronidasas. La separación por HPLC permitió purificar directamente algunos componentes y determinar la secuencia N-terminal de 6 toxinas por degradación de Edman (Tabla 4), identificando secuencias que corresponden efectivamente a toxinas que reconocen canales de K⁺ (Co-F41) o de Na⁺ (Co-F46, Co-F49, Co-F55, Co-F58, Co-F62). Por lo que, la composición del veneno de *Centruroides ornatus* es similar a la de otros alacranes *Centruroides* (Santibáñez-López, et al., 2016).

La toxina Co52 es el componente más abundante del veneno con un 10% del total. Esta toxina se purificó directamente por HPLC (Figura 11). La actividad biológica de este péptido debe estar dirigida a un blanco molecular específico que al momento no se ha podido determinar. Esta toxina tiene un 88% de identidad con la toxina CsEI de *Centruroides sculpturatus*, la cual afecta a aves (Babin, et al., 1975). Es por ello, que se evaluó la toxicidad de la toxina Co52 en pollos, sin observar signos claros de intoxicación (Sección 6.3.9). Tampoco se observó algún efecto tóxico en grillo (Sección 6.3.8). Sin embargo, se podría suponer cierta selectividad de la toxina hacia crustáceos por la similitud en secuencia observada con la toxina Cn5 (66% identidad), la cual es específica para estos artrópodos (García, et al., 1997).

El uso de la filtración en gel (Figura 9), intercambio catiónico con resinas de CM-celulosa (Figura 10) y HPLC, permitió purificar a las 3 toxinas del veneno de *C. ornatus* que son letales para mamíferos (ratón). La primera de ellas es la toxina Co1, la cual es la más abundante con un 5.5%, equiparable al porcentaje de la toxina principal de *Centruroides noxius*, la toxina Cn2, que se encuentra en un 6.8%. Este porcentaje es considerable ya que en los venenos de *Centruroides suffusus* y *Centruroides limpidus*, los porcentajes de las toxinas principales rondan entre el 0.5% al 2.8% (Riaño-Umbarila, et al., 2013). La toxina Co1 es la principal responsable de la intoxicación en mamíferos, ya que los signos provocados por el veneno completo y la toxina pura son similares (Sección 6.3.5). Dichos efectos correlacionan con los síntomas que se presentan en los cuadros de intoxicación en humano (Chippaux, 2012). A nivel de secuencia, las toxinas Co1, CII2, Cii1 y Ct1a son prácticamente idénticas (Figura 22). Estas toxinas presentan un residuo de E en la posición 15, importante para el efecto de las toxinas β sobre los canales de Na^+ (Gurevitz, 2012). También presentan dos series de aminoácidos altamente conservados: la primera considerada el farmacóforo, que consiste de los residuos Y24, R27, E28 y Q32; y la segunda, que corresponde a los residuos en las posiciones 50 a 58, los cuales participarían en la afinidad de las toxinas sobre el canal de Na^+ (Schiavon, et al., 2012).

Las toxinas Co2 y Co3, se encuentran en una cantidad aproximadamente 5 veces menor con respecto a la toxina Co1, con 0.77% y 0.98%, respectivamente. Los efectos tóxicos de la toxina Co2 son similares a los observados para la toxina Co1. Sin embargo, algunos síntomas particulares como fuertes espasmos, son compartidos con la toxina Co3 (Sección 6.3.5). Por otro lado, la toxina Co3 produce efectos muy distintos a los provocados por el veneno total y que se asemejan a los descritos para la toxina CI13 de *Centruroides limpidus* (Olamendi-Portugal, et al., 2017). El efecto de la toxina Co2 y Co3, no es notorio cuando se administra el veneno total, lo cual puede ser explicado por la baja abundancia de ambas toxinas comparadas con la toxina Co1, la cual, al ser mucho más abundante, provoca el efecto letal antes de observar los signos de intoxicación de las toxinas Co2 y Co3. Ambas toxinas, son similares a la toxina Cn8 de *Centruroides noxius* (García, et al., 1997), y la toxina CI13, estas últimas son potentes toxinas que afectan a mamíferos (Figura 18 y Figura 21). En este grupo de toxinas se encuentran una serie de diferencias a nivel de secuencia con respecto a otras toxinas de importancia médica de alacranes mexicanos (CII1, CII2, Css2, Css4, Cn2, Ct1a y Cell9). Los cambios más relevantes identificados son: no poseen el residuo E15 y tienen un cambio significativo Q32R en el farmacóforo. Adicionalmente, la

toxina Co2 cuenta con un residuo R adicional en la posición 63. Se sabe que cargas positivas adicionales en el extremo C-terminal de las toxinas pueden aumentar la activación de diferentes subtipos de canales a potenciales más negativos. Las toxinas Co2 y Co3 presentan un cambio exclusivo, T10D, dado que los aminoácidos de las posiciones 5-10 están estructuralmente cerca del farmacóforo, la adición de carga por el residuo de D, podría conferirle propiedades farmacológicas particulares a estas dos toxinas, como lo sugieren nuestros resultados observados en la evaluación del efecto de la toxina Co3 sobre el canal Nav 1.5 (Figura 31C). Finalmente, todas las toxinas que se muestran en la Figura 22 presentan la serie de aminoácidos L19, N22, Y40 y F44 el cual se conoce que confiere la selectividad de estas toxinas hacia mamífero (Schiavon, et al., 2012, Gurevitz, 2012, Cohen, et al., 2005).

Los resultados de la evaluación electrofisiológica de la toxina Co1 confirman que esta toxina pertenece al grupo de las β -toxinas porque induce un corrimiento de la activación del canal Nav 1.6 a potenciales más negativos (Figura 31A). La toxina Co3 también produjo un efecto tipo beta en este canal (Figura 31B) por los cambios en los parámetros electrofisiológicos reportados anteriormente. Sin embargo, el efecto inhibitorio más importante sería sobre el canal Nav 1.5, ya que aparentemente esta toxina reduce la amplitud de las corrientes de Na^+ incluso a potenciales despolarizantes. Por antecedentes sabemos que la toxina Cl13 presenta efectos similares a los observados para la toxina Co3 en este trabajo (Olamendi-Portugal, et al., 2017). Sin embargo, se requieren estudios electrofisiológicos más detallados sobre el efecto de estas toxinas en los canales de Na^+ aquí descritos.

Por otra parte, el número de toxinas que reconocen canales de K^+ en el veneno de *Centruroides ornatus* es considerable (Figura 8). Un ejemplo de estas lo constituye la toxina Co-41 (Tabla 2), la cual se purificó directamente por HPLC y su secuencia N-terminal tiene similitud con la toxina bloqueadora de los canales de K^+ Slo1. Aunque debido a la cantidad limitada en la que se encuentran estos péptidos en el veneno, no fue posible realizar una caracterización completa. No obstante, de las fracciones 31, 34 y 35 (Sección 6.6.1) se logró determinar la presencia de toxinas bloqueadoras del canal de potasio Kv1.3 (Figura 33). En particular, de la fracción 35, se purificaron un par de péptidos (Figura 23 y Figura 24), la toxina Co35 y un péptido de 4123.08 Da. Este último correspondía al mismo péptido identificado en *Centruroides tecomanus* (FII-10.5) (Olamendi-Portugal, et al, 2016). Considerando que el péptido FII-10.5 tiene efecto sobre los canales de potasio Kv1.3,

KCa3.1, Shaker y una marcada selectividad sobre el canal Kv1.2; y tomando en cuenta que, la toxina Co35 identificada en este trabajo presentó similitud con la toxina FII12.8 de *Centruroides tecomanus*, la cual tiene efecto sobre los canales Kv1.1 y Kv1.2; concluimos que el efecto inhibitorio observado de la fracción 35 sobre el canal Kv1.3 se debió a la presencia del péptido de 4123.08 Da y no al efecto de la toxina Co35 sobre el canal Kv1.3. Sin embargo, la toxina Co35 podría presentar una mayor especificidad sobre otros subtipos de canales de K⁺. Por lo anterior, en el veneno de *Centruroides ornatus*, existen péptidos que bloquean canales de K⁺ que podrían ser empleados como herramientas farmacológicas para el estudio de la estructura-función de los mismos.

La composición del veneno también fue evaluada mediante electroforesis (Figura 25), y Westernblot (Figura 27), se observó que el antiveneno Alacramyn presenta reacción cruzada tanto en los componentes de alto y bajo peso molecular de los venenos evaluados, observando un patrón similar a lo obtenido en estudios previamente reportados (Chase, et al., 2009). Este reconocimiento se debe al carácter policlonal y polivalente del antiveneno (Dehesa-Dávila y Possani, 1994). Mediante una separación electroforética en condiciones no reductoras a pH ácido (Figura 26), observamos que el patrón de bandas de *Centruroides ornatus* es similar al reportado recientemente en el grupo (Riaño-Umbarila, et al., 2017), estos patrones generalmente son consistentes y podrían ser de utilidad para la identificación de especies cuando no se cuenta con el apoyo de expertos entomólogos.

El reconocimiento de los componentes de los venenos por *Alacramyn* también se determinó mediante ensayos de ELISA (Figura 28), en este ensayo se fijó el veneno completo en la placa y se realizaron diluciones del antiveneno. Los valores de la EC50 obtenidos por los ensayos de ELISA para el veneno de *Centruroides ornatus* fueron muy similares a los valores observados para los venenos de los alacranes del género *Centruroides*. Para el caso del veneno de *Vaejovis mexicanus* se obtuvo el valor de EC50 más alto, lo que indica que el antiveneno reconoce en menor proporción los componentes de bajo peso molecular de este último veneno. Se sabe que más del 90% de los componentes del veneno de *Vaejovis mexicanus* tienen pesos moleculares menores a 6000 Da, entre los cuales se encuentran principalmente toxinas que reconocen a canales de K⁺ y péptidos NDPB (Gurrola B., et al., 2012).

Empleando estos mismos ensayos de ELISA, se estudió el reconocimiento del antiveneno con las toxinas Co53, Co1, Co2, Co3, CII1, CII2, Cn2 y Ct1a. El reconocimiento de estas toxinas fue claramente menor con respecto al observado para el veneno (Figura 29), lo cual se explica por la mayor cantidad de componentes en el veneno que son reconocidos por los fragmentos Fab'2 del antiveneno. Por otro lado, se observaron valores de EC50 similares para todas estas toxinas: Co1, CII1, CII2 y Cn2. Este resultado puede explicarse debido a la alta semejanza a nivel de secuencia de este grupo de toxinas. Los valores de la EC50 de las toxinas Co52 y Ct1a son similares a las toxinas anteriores, aunque la pendiente de la curva es menor. De manera interesante, observamos que aún con la dilución más alta del antiveneno, no se alcanzan los mismos valores de absorbancia obtenidos con las otras toxinas, lo que indicaría que el reconocimiento para este par de toxinas no es similar al resto. Las toxinas Co2, Co3 fueron las toxinas con los valores más altos de EC50, indicando un bajo reconocimiento, lo cual se puede explicar por la baja proporción de estos componentes en el veneno y las diferencias encontradas a nivel de secuencia con respecto a las principales toxinas que afectan a los mamíferos.

En el grupo del Dr. Baltazar Becerril y la Dra. Lidia Riaño, se trabaja en el desarrollo de un nuevo antiveneno bajo el formato de scFvs, los cuales son capaces neutralizar el efecto tóxico de venenos completos al neutralizar a la principal toxina. Las ventajas de este nuevo antiveneno sobre el actual antiveneno *Alacramyn* están documentadas en varios reportes (Laustsen, et al., 2016) (Riaño-Umbaril, et al., 2016, Rodríguez-Rodríguez, et al., 2016). En un estudio preliminar (comunicación personal con la Dra. Lidia Riaño) se determinó que aún los mejores scFvs con los que cuenta el grupo del Dr. Becerril y la Dra. Lidia Riaño, no logran neutralizar los efectos tóxicos del veneno de *Centruroides ornatus* en el 25% de la población estudiada. Es por ello que se decidió probar el reconocimiento de la toxina Co1 con tres scFvs (Figura 30). Este ensayo también es de carácter preliminar, se muestra que la toxina es reconocida por los 3 scFvs y que en particular el anticuerpo 10FG2 presentó la menor cinética de disociación. Lo cual significa que, en la experiencia del grupo, este anticuerpo podría ser capaz de neutralizar el efecto tóxico *in vivo*. Con estos resultados, se puede asumir que los efectos tóxicos no neutralizados del veneno completo se deben a un bajo reconocimiento de las toxinas Co2 y Co3 por los mejores scFvs. Este resultado podría ser explicado por las diferencias en secuencia que presenta estas dos toxinas en los sitios donde hacen contacto los scFvs con las toxinas (Riaño-Umbaril, et al., 2016).

8. CONCLUSIONES

En el veneno de *Centruroides ornatus* se encontraron 114 componentes y de acuerdo a sus pesos moleculares se asume que la mayoría son péptidos que reconocen canales de Na⁺ y K⁺. De los cuales, se identificó y secuenció el componente más abundante del veneno, un péptido con efecto biológico desconocido, se nombró toxina Co52. Por otro lado, se identificaron y secuenciaron tres péptidos letales para los mamíferos y se nombraron: toxinas Co1, Co2 y Co3. Estas toxinas presentan alta similitud a toxinas de importancia médica reportadas en alacranes del género *Centruroides* en México. Finalmente, se determinó que el antiveneno *Alacramyn* reconoció *in vitro* los componentes del veneno completo y las toxinas puras de *Centruroides ornatus*. El antiveneno *Alacramyn* neutralizó *in vivo* los efectos letales del veneno completo y de la toxina Co3.

9. PERSPECTIVAS

Se requieren ampliar los estudios para identificar la actividad biológica de la toxina Co52. Al ser un péptido muy abundante en el veneno, podría tener una función muy importante para el alacrán *Centruroides ornatus*. Los estudios de electrofisiología preliminares muestran que las toxinas Co1 y Co3 presentan un típico efecto beta, sin embargo, se requiere ampliar estos estudios para caracterizar adecuadamente las curvas dosis-respuesta, ya que aparentemente la toxina Co3 presenta un efecto inhibitorio sobre el canal Nav 1.5, lo cual, podría ser de interés para el estudio de los efectos tóxicos de los venenos de especies de alacranes mexicanos.

10. REFERENCIAS

- Almeid, F. M., Pimenta, A. C., De Figueredo, S. G., Santoro, M. M., Martin-Eauclaire, M. F., Diniz, C. R., & De Lima, M. E. (2002). Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*, *40*, 1041-1045.
- Babin , D. R., Watt, D. D., Goos, S. M., & Mlejnek, R. V. (1975). Amino acid sequence of neurotoxin I from *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *166*, 125-134.
- Barona, J., Otero, R., & Núñez, V. (2004). Aspectos toxicológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica*, *24*, 42-49.
- Batista, C., Román-González, S. A., Salas-Castilo, S. P., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., & Possani, L. (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*(146), 147-157.
- Bergeron, Z. L., & Bingham, J.-P. (2012). Scorpion toxins specific for potassium (K⁺) channels: a historical overview of peptide bioengineering. *Toxins*(4), 1082-1119.
- Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Coronas-Valderrama, F. I., Corzo, G., & Possani, L. D. (2014). Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na⁺-channel α -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Biochimie*(95), 1216-1222.
- Chase, P., Boyer-Hassen, L., McNally, J., Vazquez, H., Theodorou, A. A., Gardner, W. F., & Alagon, A. (2009). Serum levels and urine detection of *Centruroides sculpturatus* venom in significantly envenomated patients. *Clinical Toxicology*, *47*, 24-28.
- Chaturaka, R., & Gnanathasan, A. (2017). Management of scorpion envenoming: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Systematic Reviews*, *6*(74), 1-12.
- Chippaux, J.-P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug design, development and therapy*, *6*, 165-173.
- Cid-Urbe, J. I., Jiménez-Vargas, J. M., Batista-Ferreira, C. V., Zamudio-Zuñiga, F., & Possani, L. (2017). Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: Novel components found. *Toxicon*, *125*.
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Ilan, N., Benveniste, M., Gordon, D., & Gurevitz, M. (2005). Common features in the functional surface of scorpion β -toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(6), 5045-5053.
- Corona, M., Valdez-Cruz, N., Merino, E., Zurita, M., & Possani, L. (2001). Genes and peptides from the scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing, that recognize Na⁺-channels. *Toxicon*, *39*, 1893-1898.

De Armas, L. F., & Martín-Frías, E. (2008). El género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el estado de Veracruz, México. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 43, 7-22.

De Armas, L. F., Martín-Frías, E., & Estévez-Ramírez, J. (2003). Lista anotada de las especies mexicanas del género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae). *Revista Ibérica de Aracnología*, 8, 93-98.

De Roodt, A. R., Coronas, F. I., Lago, N., González, M. E., Laskowicz, R. D., Beltramino, J. C., . Possani, L. D. (2010). General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivitatus* of Argentina. *Toxicon*, 55, 307-319.

Dehesa-Dávila, M., & Possani, L. D. (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 32(9), 1015-1018.

Dehesa-Dávila, M., Ramírez, A. N., Zamudio, F. Z., Gurrola-Briones, G., Liévano, A., Darszon, A., & Possani, L. D. (1996). Structural and functional comparison of toxins from the venom of the Scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B(2), 331-339.

Dent, M. A., Possani, L. D., Ramírez, G. A., & Fletcher, P. L.-J. (1980). Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, 18, 343-350.

Edman, P., & Begg, G. (1967). A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry*, 1, 80-91.

García, C., Becerril, B., Selisko, B., Delepierre, M., & Possani, L. (1997). Isolation, caracterización and comparison of a novel crustacean toxin with a mammalian toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* hoffman. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and molecular biology*, 116(3), 315-322.

Gopalakrishnakone, P., Possani, L. D., Rodríguez de la Vega, R. C., & Schwartz, E. F. (2015). *Scorpion Venoms* (Primera ed.). Springer.

Gurevitz, M. (2012). Mapping of scorpion toxins receptor sites at voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, 60, 501-511.

Gurrola B., G., Hernández-López, R. A., Rodríguez De la Vega, R. C., Varga, Z., Batista, C. F., Salas-Castillo, S. P., . . . Possani, L. D. (2012). Structure, function, and chemical synthesis of *Vaejovis mexicanus* peptide 24: a novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry*, 51(19), 4049-4061.

Guzmán-Pérez, V. M., & Ponce-Saavedra, J. (2014). Actividad superficial de *Centruroides ornatus* Pocock, 1902 (Scorpiones: Buthidae) en época de lluvias en la cuenca de Cuitzeo. *Entomología mexicana*, 1, 49-52.

Hoffmann, C. (1932). Monografías para la Entomología Médica de México. *Anales del Instituto de Biología, Monografía Num. 2. Los escorpiones de México*(Segunda parte: Buthidae), 243-282, 283-261.

Jiménez-Vargas, J. M., Possani, L. D., & Luna-Ramírez, K. (2017). Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels. *Neuropharmacology*, *128*, 5-14. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.025>.

Jiménez-Vargas, J. M., Quintero-Hernández, V., González-Morales, L., Ortiz, E., & Possani, L. D. (2017). Design and expression of recombinant toxins from Mexican scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms. *Toxicon*, *128*, 5-14.

Laustsen, A. H., Solà, M., Jappe, E. C., Oscoz, S., Lauridsen, L. P., & Engmark, M. (2016). Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development. *Toxins*, *8*(226), 1-33.

Martin, M. F., Garcia y Perez, L. G., El Ayeb, M., Kopeyan, C., Bechis, G., Jover, E., & Rochat, H. (1987). Purification and chemical and biological characterization of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(10), 4452-4459.

Olamendi-Portugal, T., Bartok, A., Zamudio-Zuñiga, F., Balajthy, A., Becerril, B., Panyi, G., & Possani, L. D. (2016). Isolation, chemical and functional characterization of several new K⁺-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*. *Toxicon*, *115*, 1-12.

Olamendi-Portugal, T., Restano-Cassulini, R., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., & Possani, L. D. (2017). Functional and immuno-reactive characterization of a previously undescribed peptide from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus*. *Peptides*, *87*, 34-40.

Ortiz, E., Gurrola B., G., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, *93*, 125-135.

Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Rego, S. C., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2014). Antarease-like Zn-metalloprotease are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1840*, 1738-1746.

Padilla, A., Govezensky, T., Possani, L. D., & Larralde, C. (2003). Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon*, *41*, 959-965.

Pessini, A. C., Takao, T. T., Cavalheiro, E. C., Vichnewski, W., Sampaio, S. V., Giglio, J. R., & Arantes, E. C. (2001). A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, *39*, 1495-1504.

Pintar, A., Possani, L. D., & Delepierre, M. (1999). Solution structure of toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffman, a b-scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J. Mol. Biol.*, *287*, 359-367.

Ponce-Saavedra, J., & Francke B., O. F. (2013). Clave para la identificación de especies de alacranes del género *Centruroides* Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el Centro Occidente de México. *Biologicas*, *15*(1), 52-62.

Ponce-Saavedra, J., Francke-B, O. F., Quijano-Ravell, A. F., & Cortés-Santillán, R. (2016). Alacranes (Arachnida: Scorpiones) de importancia para la salud pública en México. *Folia Entomológica Mexicana*, 2(3), 45-70.

Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., & Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem. FEBS*, 264, 287-300.

Quijano-Ravell, A. F., & Ponce-Saavedra, J. (2015). Comparación de los tamaos de camada usando crías y embriones en *Centruroides ornatus* Pocock 1902 (Scorpiones: Buthidae) en Michoacán, México. *Entomología Mexicana*, 2, 59-65.

Quijano-Ravell, A. F., & Ponce-Saavedra, J. (2016). Uso del hábitat por *Centruroides Pocock 1902* (Scorpiones: Buthidae) en el cerro "El Águila" Morelia, Michoacán, México. *Entomología mexicana*, 3, 85-90.

Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Gurrola B., G., Valdivia, H. H., & Possani, L. D. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*, 76, 328-342.

Ramírez, A. N., Gurrola B., G., Martin, B. M., & Possani, L. D. (1988). Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffman. *Toxicon*, 26(9), 773-783.

Ramírez, A., Martin, B. M., Gurrola B., G., & Possani, L. D. (1994). Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon*, 32(4), 479-490.

Rein-Ove, J. (14 de Noviembre de 2017). *The Scorpion files*. Obtenido de https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/higher_phylogeny.php

Riaño-Umbaril, L., Candanoza, L. L., Serrando-Posada, H., Fernández-Taboada, G., Olamendi-Portugal, T., Rojas-Trejo, S., . . . Becerril, B. (2016). Optimal Neutralization of *Centruroides noxius* Venom Is Understood through a Structural Complex between Two Antibody Fragments and the Cn2 Toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(4), 1619-1630.

Riaño-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Corzo, G., Possani, L. D., & Becerril, B. (2011). Exploiting Cross-reactivity to Neutralize Two Different Scorpion Venoms with One Single Chain Antibody Fragment. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6143-6151.

Riaño-Umbarila, L., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Gurrola, G., Possani, L. D., & Becerril, B. (2013). A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicon*, 76, 370-376.

Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Rodríguez, E. R., Santibañez-López, C. E., Güereca, L., Uribe-Romero, S. J., Gómez-Ramírez, I. V., . . . Becerril, B. (2017). Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*, 138, 130-137.

Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon*, 43, 865-875.

Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationship and evolution. *Toxicon*, 46, 831-844.

Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2007). Novel paradigms on scorpion toxins that affects that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon*, 49, 171-180.

Rodríguez de la Vega, R. C., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2010). Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon*, 56, 1155-1161.

Rodríguez-Rodríguez, E. R., Olamendi-Portugal, T., Serrano-Posada, H., Arredondo-López, J., Gómez-Ramírez, I., Fernández-Taboada, G., Becerril, B. (2016). Broadening the neutralizing capacity of a family of antibody fragments against different toxins from Mexican scorpions. *Toxicon*, 119, 52-63.

Salazar-Cruz, I., Montes-Yedra, J., Martínez-Muñoz, J. P., Velásquez-Cabrera, R. A., & Hernández-Santiago, E. (2014). Distribución del género *Centruroides* (Scorpionida: Buthidae) en el estado de Oaxaca. *Revista mexicana de Agroecosistemas*, 1(2), 121-131.

Santibáñez-López, C. E., & Possani, L. D. (2015). Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: insights on their classification and evolution. *Toxicon*, 107, 317-326.

Santibáñez-López, C. E., Francke, O. F., Ureta, C., & Possani, L. D. (2016). Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity. *Toxins*, 8(2), 1-18.

Schiavon, E., Pedraza-Escalona, M., Gurrola, G., Olamendi-Portugal, T., Corzo, G., Wanke, E., & Possani, L. D. (2012). Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by β -toxins from *Centruroides* scorpion in sodium channels. *Toxicon*, 59, 283-293.

SSA. (2011). *Norma Oficial Mexicana NOM-033-SSA2-2011*. Obtenido de Diario Oficial de la Federación: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5223520&fecha=08/12/2011

SSA. (2013). *Secretaría de Salud. CENAPRECE*. Obtenido de Prevención y Control de la Intoxicación por picadura de alacrán: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevenccionControllntoxicacionPicaduraAlacran2013_2018.pdf

SUIVE/DGE/SSA. (2016). *Epidemiología, SSA*. Obtenido de Incidencia por picadura de alacrán 2016: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2016/incidencia/enfermedad_grupo_edad_entidad_federativa/094.pdf

Towler, W. I., Ponce-Saavedra, J., Gantenbein, B., & Fet, V. (2001). Mitochondrial DNA reveals a divergent phylogeny in tropical *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) from Mexico. *Biogeographica*, 77(4), 157-172.

Valdez-Velázquez, L. L., Quintero-Hernández, V., Romero-Gutiérrez, M. T., Coronas, F. I., & Possani, L. D. (2013). Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *Centruroides tecomanus*. *PLOS one*, 8(6), 1-15.

Valdez-Velazquéz, L. L., Romero-Gutiérrez, M., Delgado-Enciso, I., Dobrovinskaya, O., Melnikov, V., Quintero-Hernández, V., . . . Possani, L. (2016). Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities. *Toxicon*, 118, 95-103.

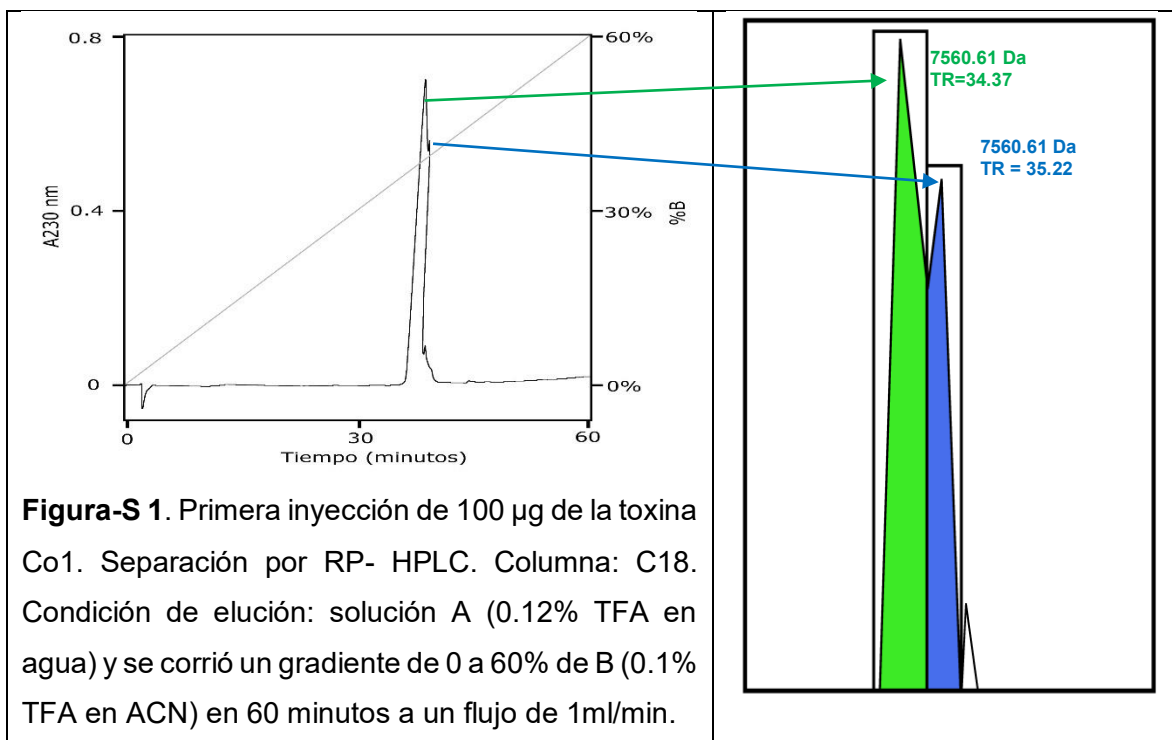
Vandendriessche, T., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F. Z., Possani, L., & Tytgat, J. (2010). Isolation and characterization of two novel scorpions toxins: The α -toxin-like Cell8, specific for Nav1.7 channels and the classical anti-mammalian Cell9, specific for Nav1.4 channels. *Toxicon*(56), 613-623.

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

11. MATERIAL SUPLEMENTARIO

11.1. Purificación de la toxina Co1

En las Figuras S1-S3 se muestran los cromatogramas de HPLC con los cuales se verificó la homogeneidad de la toxina Co1. Lo anterior se hizo debido a que el pico del cromatograma de la purificación de esta toxina mostraba aparentemente dos componentes, por lo que al inicio, se sospechaba de un contaminante. Este efecto ya se ha observado en las toxinas Cii2 y Cii1, que precisamente difieren en un solo aminoácido con la toxina Co1 (Dehesa-Dávila, et al, 1996). Cuando se resolvió la estructura tridimensional de la toxina Cn2, se observó que el residuo de cis-prolina en la posición 59 produce una “torcedura” de la cadena polipeptídica en el extremo C-terminal (Pintar, Possani, y Delepieyre, 1999), las posibles conformaciones generadas pueden presentar propiedades hidrofóbicas diferentes que son identificadas en la columna C-18. Para facilitar el seguimiento se indica el comportamiento de los picos cromatográficos con esquemas, todos se corrieron bajo las mismas condiciones y se indican los tiempos de retención y los pesos moleculares determinados. (Figuras S1-S3).



De la primera inyección (Figura-S 1) se colectaron la “subida” que forma el primer pico y la “bajada” donde se distingue el segundo pico. Al reinyectar estos picos, se observaron en los correspondientes cromatogramas el mismo comportamiento, obteniendo picos “partidos” con tiempos de retención muy semejantes (Figura-S 2). Para descartar que en el pico de “subida” estuviera contaminado con el de bajada, se tomó la parte inicial del pico de subida (Figura-S 2a) y se reinyectó una vez más al HPLC, encontrando de nuevo el mismo comportamiento y tiempos de retención similares (Figura-S 3).

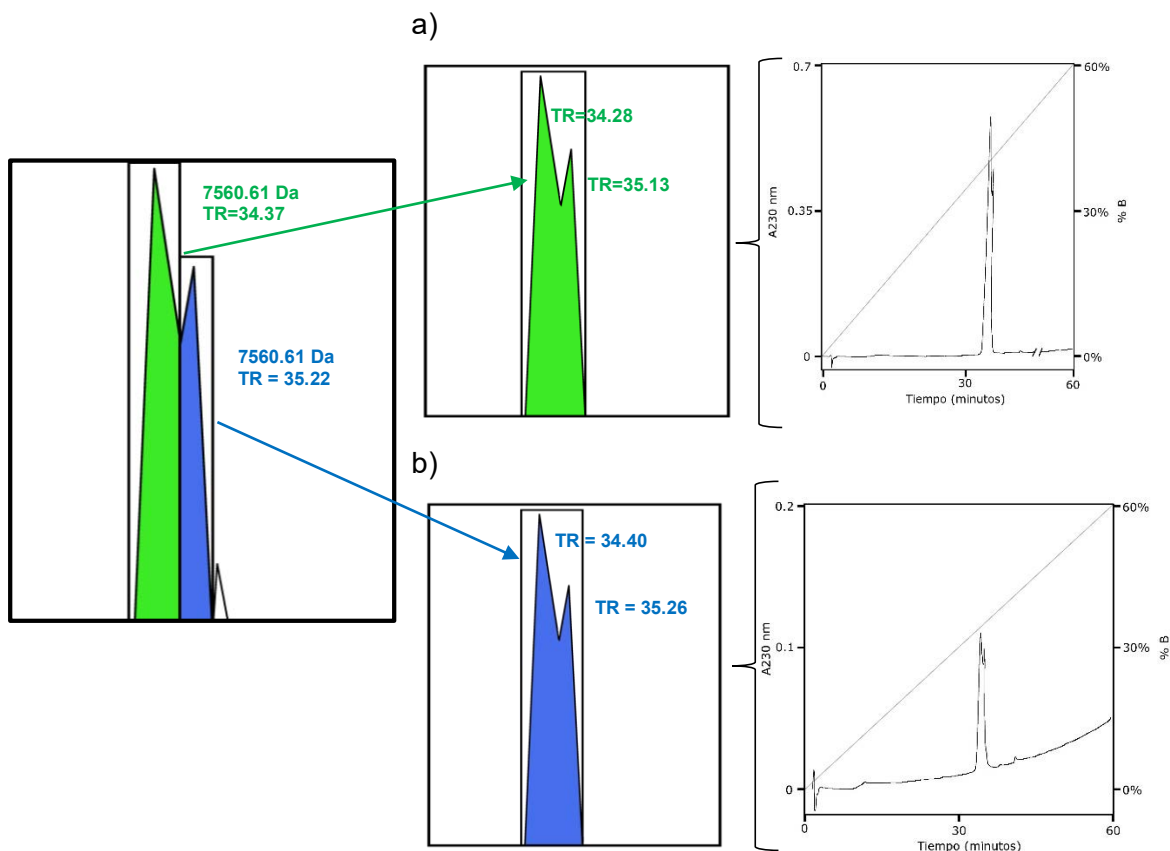


Figura-S 2. Segundas inyecciones. a) Pico de subida y b) de bajada del cromatograma inicial de la toxina Co1.

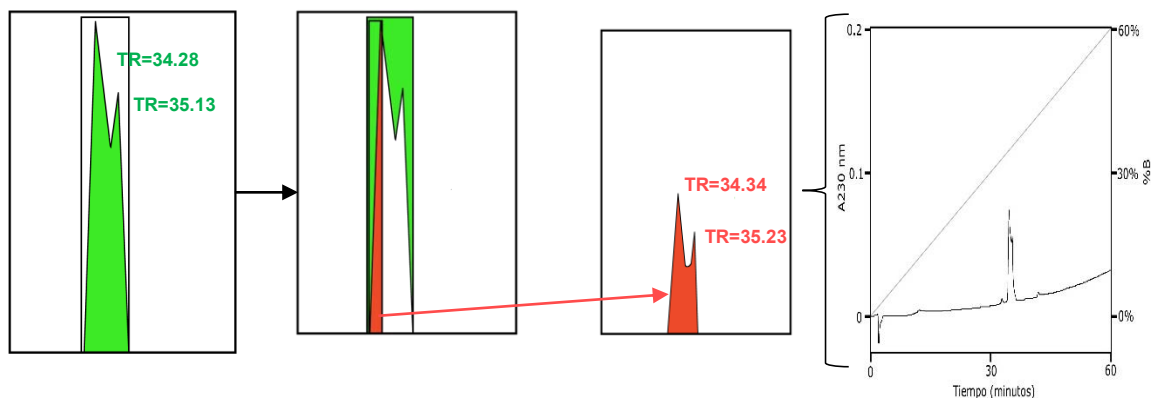


Figura-S 3. Tercera inyección del pico de “subida” de la toxina Co1.

Se verificó también la pureza de la toxina Co1 mediante la obtención de una sola banda en un gel de electroforesis en condiciones ácidas. En la Figura-S 4 (misma Figura 26. Perfiles electroforéticos del veneno completo de *Centruroides ornatus* y la toxina Co1 en condiciones no desnaturizantes a pH ácido. Se aplicó 1 μg de la toxina Co1 obtenida de diferentes pasos de purificación por HPLC (Sección 10.1). La cantidad de veneno aplicada fue de 10 y 30 μg . El blanco consistió de la solución amortiguadora de carga con agua (1:1).). En la imagen se indican las muestras aplicadas en cada carril de cada pico cromatográfico de HPLC de la toxina.

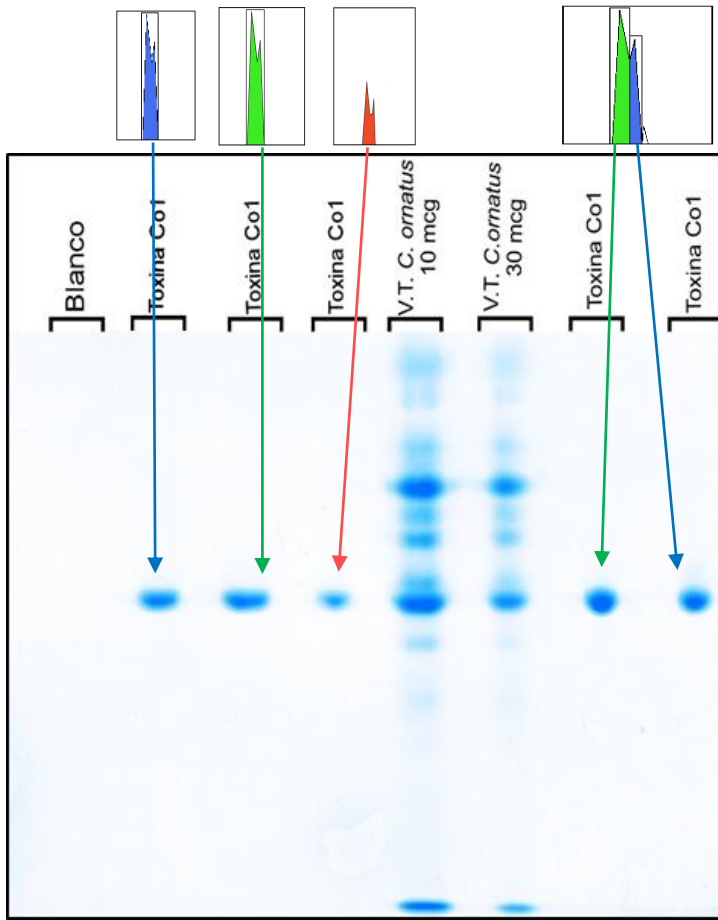


Figura-S 4. Gel de electroforesis en condiciones no reductoras a pH ácido.

En la Figura-S 5 se muestra el ejemplo del espectro de masas de la toxina Co1, el cual fue similar en los picos cromatográficos obtenidos por HPLC (Figuras S1-S3).

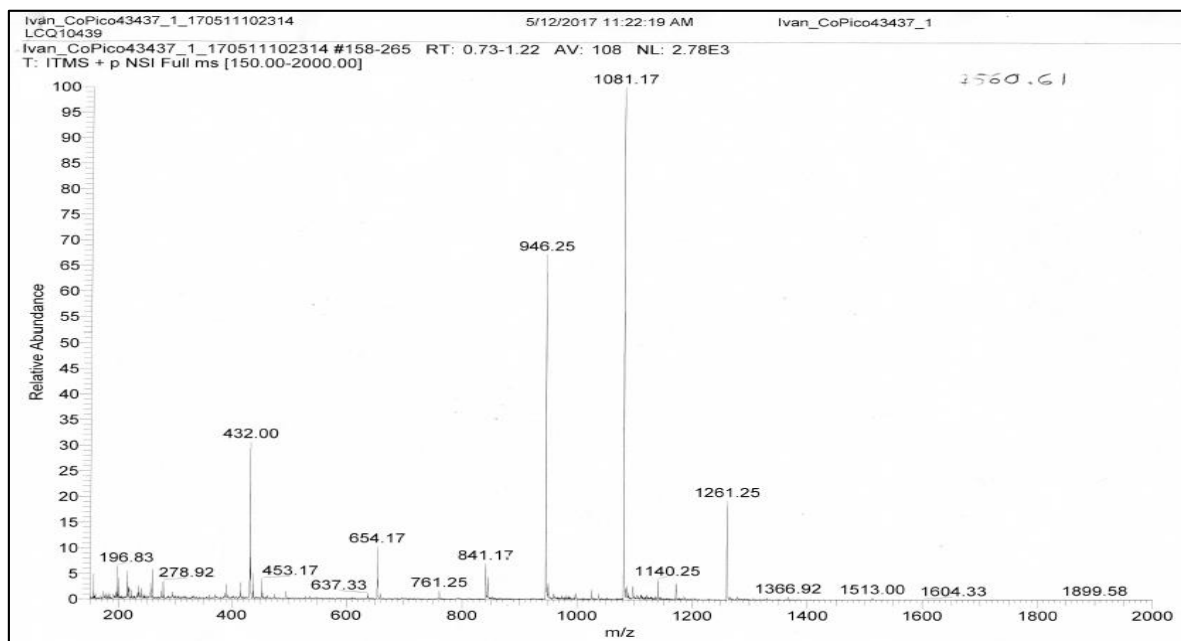


Figura-S 5. Serie iónica de la toxina Co1.

11.2. Caracterización química de la toxina Co1

En la Figura-S 6, se muestra el cromatograma de la alquilación de la toxina Co1, el pico principal corresponde al péptido alquilado, con un peso de 8028 Da, se confirma la alquilación de las 8 cisteínas (cada cisteína adquiere un grupo alquilante de acetamida con masa de 58 Da).

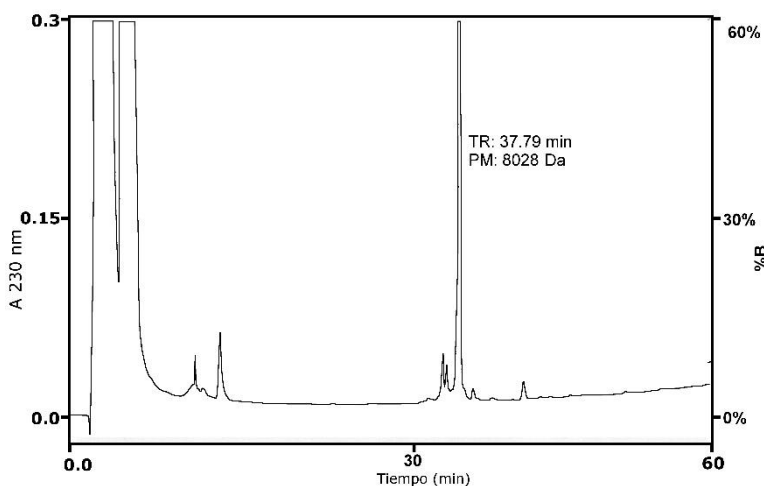


Figura-S 6. Cromatograma de la purificación de la toxina Co1 reducida y alquilada.

En la Figura-S 7, se muestra la purificación de los péptidos de digestión por la enzima Glu-C de la toxina Co1 alquilada.

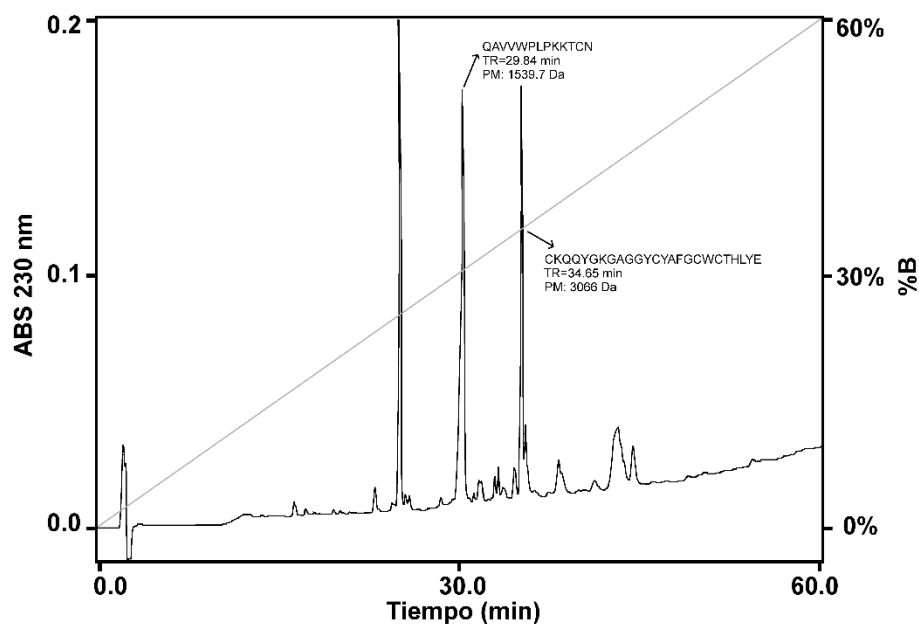


Figura-S 7. Digestión de la toxina Co1 con endoproteasa Glu-C.

En la Figura-S 8, se muestra la purificación de los péptidos de digestión por la enzima Asp-N de la toxina Co1 alquilada.

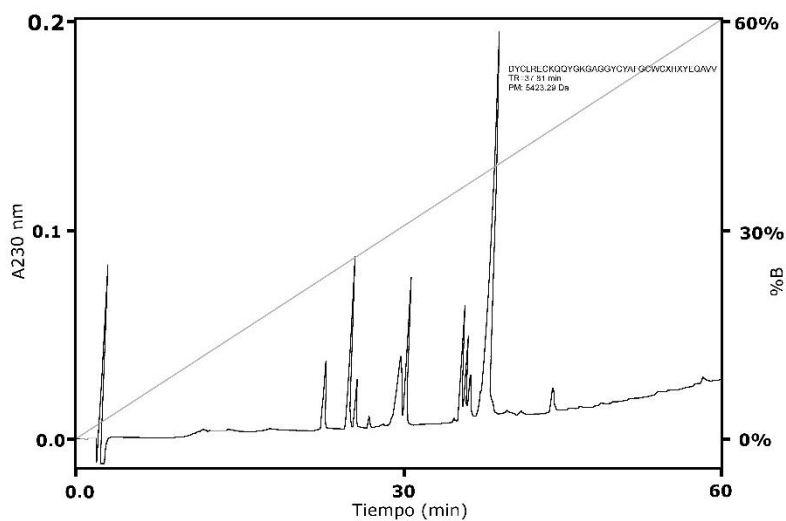


Figura-S 8. Digestión de la toxina Co1 con endoproteasa Asp-N.

11.3. Caracterización química de la toxina Co2

En la Figura-S 9, se muestra el cromatograma de la alquilación de la toxina Co2, el pico principal corresponde al péptido alquilado, con un peso de 8076.7 Da, se confirma la alquilación de las 8 cisteínas (cada cisteína adquiere un grupo alquilante de acetamida con masa de 58 Da).

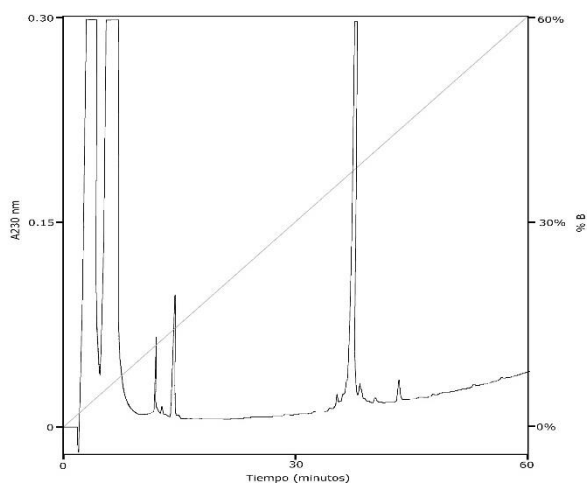


Figura-S 9. Cromatograma de la purificación de la toxina Co2 reducida y alquilada.

En la Figura-S 10, se muestra la purificación de los péptidos de digestión por la enzima Glu-C de la toxina Co2 alquilada.

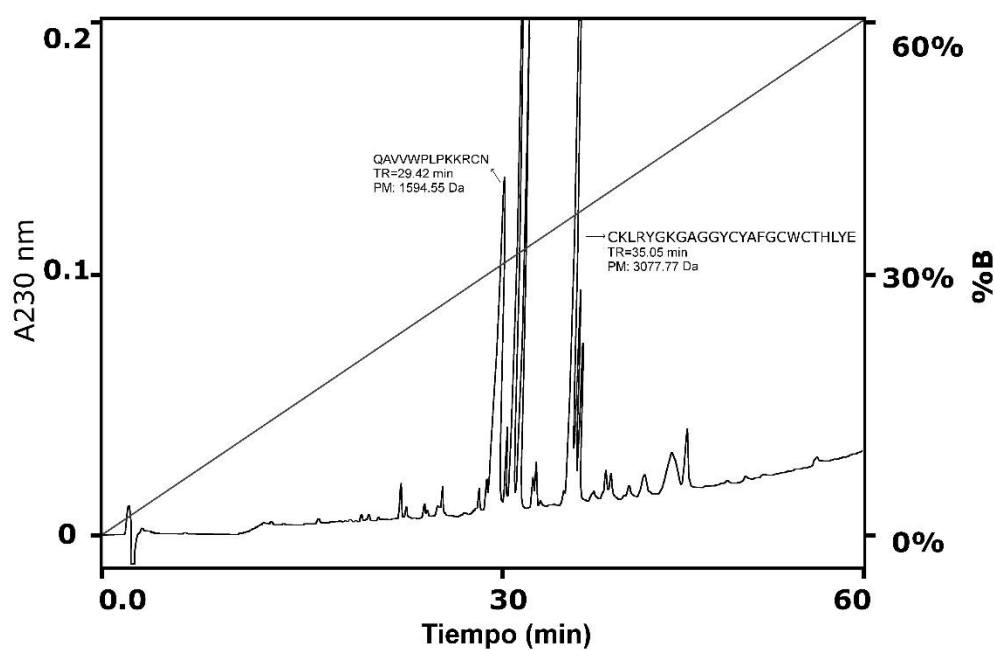


Figura-S 10. Digestión de la toxina Co2 con endoproteasa Glu-C.

11.4. Caracterización química de la toxina Co3

En la Figura-S 11, se muestra el cromatograma de la alquilación de la toxina Co3, el pico principal corresponde al péptido alquilado, con un peso de 8240 Da, se confirma la alquilación de las 8 cisteínas (cada cisteína adquiere un grupo alquilante de acetamida con masa de 58 Da).

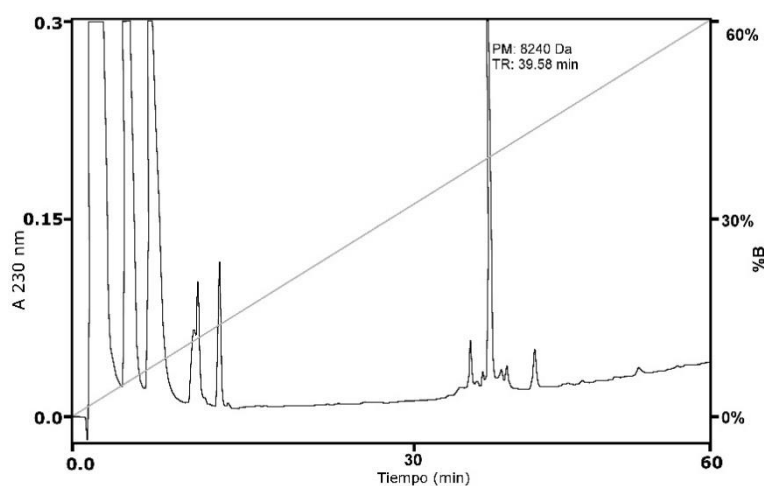


Figura-S 11. Cromatograma de la purificación de la toxina Co3 reducida y alquilada.

11.5. Caracterización química de la toxina Co52

En la Figura-S 12, se muestra el cromatograma de la alquilación de la toxina Co52, el pico principal corresponde al péptido alquilado, con un peso de 7807.98 Da, se confirma la alquilación de las 8 cisteínas (cada cisteína adquiere un grupo alquilante de acetamida con masa de 58 Da).

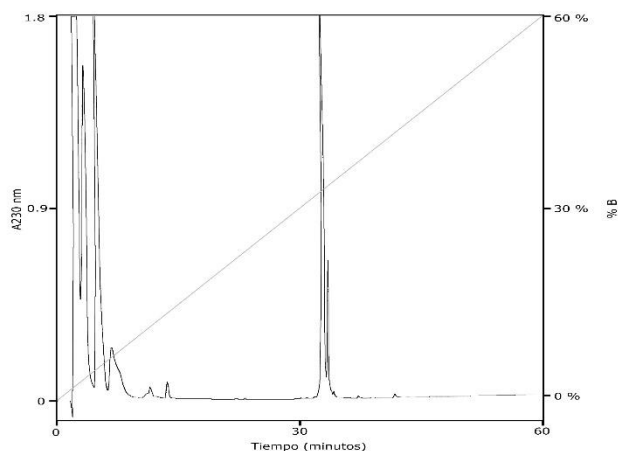


Figura-S 12. Cromatograma de la purificación de la toxina Co52 reducida y alquilada.

En la Figura-S 13, se muestra la purificación de los péptidos de digestión por la enzima Asp-N de la toxina Co52 alquilada.

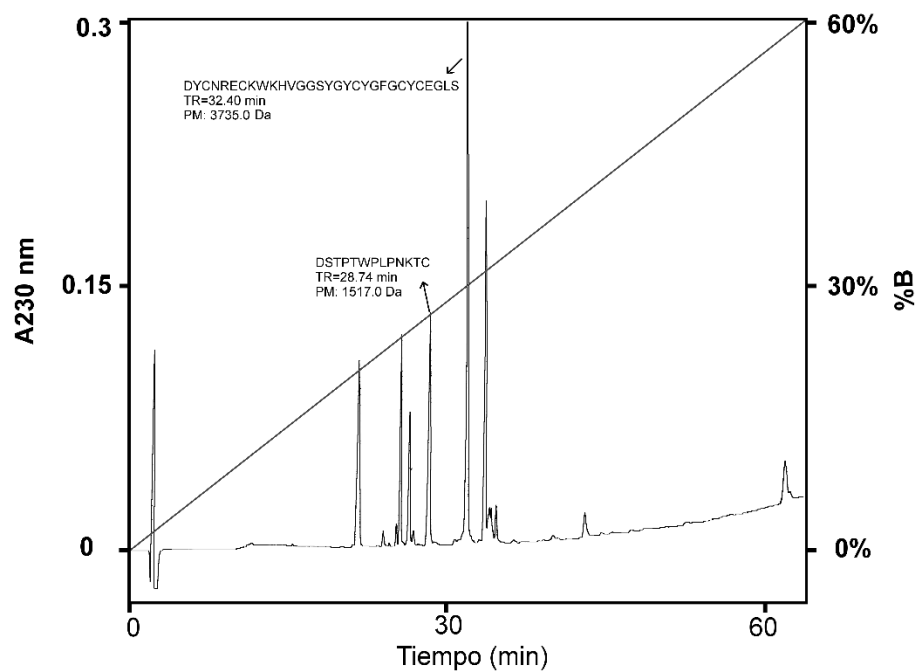


Figura-S 13. Digestión de la toxina Co52 con endoproteasa Glu-C.