

11261

2eja  
19

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA



## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LAS TOXINAS DEL VENENO DEL ALACRAN

C. Limpidus tecomanus Hoffmann.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(AREA: FARMACOLOGIA)  
P R E S E N T A  
**ANGELINA RAMIREZ NAVARRO**  
MEXICO, D. F. 1987

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

### 1. INTRODUCCION

A) ANTECEDENTES HISTORICOS.	1
B) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE TOXINAS DE VENENO DE ALACRAN.	5
1.- Purificación.	10
2.- Caracterización Química.	11
3.- Toxinas Caracterizadas.	13
4.- Estructura Secundaria y Terciaria.	18
C) CARACTERIZACION FISIOLOGICA Y FARMACOLOGICA DEL VENENO DE ALACRAN.	19
1.- Generalidades.	19
2.- Estudios Toxicológicos.	21
3.- Efectos Cardiovasculares.	22
4.- Efectos Vasculares.	25
5.- Efectos Respiratorios.	26
6.- Efectos Musculares.	27
7.- Acción Sobre Canales Iónicos y Diferenciación Farmacológica.	28
a) Mecanismo de acción de las toxinas $\alpha$ de alacrán.	
b) Mecanismo de acción de las toxinas beta.	
c) Estudios electrofisiológicos.	
d) Estudios de flujo iónico y liberación de transmisores.	
e) Estudios de unión de ligandos.	

8.- Relación Estructura - Función.	36
D) OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS.	38
<b>II. MATERIAL Y METODO.</b>	39
A) OBTENCION Y CONSERVACION DEL VENENO.	39
B) SEPARACIONES CROMATOGRAFICAS.	39
a) Exclusión Molecular.	
b) Intercambio Iónico.	
C) BIENSAYOS.	40
a) Pruebas de Toxicidad.	
b) Determinación de la Dosis Letal Media.	
D) DESALADO DE LAS PROTEINAS.	41
E) DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LAS TOXINAS.	42
a) Electroforesis.	
b) Análisis de Aminoácidos.	
c) Determinación de la Secuencia de Aminoácidos.	
<b>III. RESULTADOS.</b>	43
A) SEPARACION POR PESO MOLECULAR.	43
B) SEPARACION POR INTERCAMBIO IONICO.	43
C) PURIFICACION DE LA TOXINA II.20.3.4.	47
D) SEPARACION DEL COMPONENTE TOXICO II.19.	50
E) SEPARACION DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCION II.21.	61
F) PURIFICACION DE LA FRACCION II.22.5.	61

G) PURIFICACION DE LAS FRACCIONES II.23.4 y II.23.5.	61
H) DOSIS LETAL MEDIA.	66
I) CARACTERIZACION QUIMICA DE LOS COMPONENTES PUROS.	66
IV. DISCUSION.	80
V. PERSPECTIVAS FUTURAS.	90
VI. BIBLIOGRAFIA.	92

## NOMENCLATURA DE LOS AMINOACIDOS COMUNES

Asp	Acido aspártico	D
Asn	Asparagina	N
Tre	Treonina	T
Ser	Serina	S
Glu	Acido glutámico	E
Gln	Glutamina	Q
Pro	Prolina	P
Gli	Glicina	G
Ala	Alanina	A
Met	Metionina	M
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Tir	Tirosina	Y
Fen	Fenilalanina	F
His	Histidina	H
Lis	Lisina	K
Arg	Arginina	R
Cis	Cisteína	C
Trp	Triptófano	W
Val	Valina	V

## RESUMEN

### Aislamiento y Caracterización de las Toxinas del Veneno del Alacrán C. l. tecomanus Hoffmann.

En México más del 50 % de los accidentes por picadura de alacrán (aproximadamente 100,000 cada año) es a causa del C. limpidus, siendo el C. limpidus tecomanus la subespecie responsable de que el Estado de Colima tenga la mayor tasa de mortalidad por picadura de alacrán en el país. Esta es la razón por la cual se decidió estudiar el veneno de este arácnido.

El veneno crudo se obtuvo por estimulación eléctrica de los telsons de ejemplares anestesiados. El veneno se recuperó con agua bidestilada, se centrifugó y el sobrenadante se liofilizó inmediatamente guardándose el veneno seco a -20 °C.

El veneno fue fraccionado en una columna de Sephadex G-50 obteniéndose tres componentes (I, II y III) de los cuales sólo la fracción II fue tóxica en ratón. A la fracción II se le calculó una dosis letal media de 0.45 mg/Kg. Esta fracción se recromatografió en CMC-32 separándose en 24 componentes, de éstos sólo las fracciones II.19, II.20, II.21, II.22 y II.23 fueron tóxicas a mamíferos, el resto no presentó actividad biológica en ellos.

Cada una de las fracciones tóxicas se recromatografió en CMC, en otro sistema de amortiguadores lográndose obtener en forma homogénea los péptidos II.19.5, II.21.4 y II.22.5 que son tóxicos a mamíferos. Las fracciones II.21.6 y II.23.5 no mostraron toxicidad administrándose cantidades de hasta 100 µg por ratón.

Para poder purificar el componente tóxico de la fracción II.20.3 fue necesario un paso cromatográfico más en CMC-32 en condiciones de corrida diferentes.

Los análisis de aminoácidos de estas toxinas sugieren que son moléculas de peso molecular cercano a 7000. La fracción II.20.3.4 se logró secuenciar casi en su totalidad, faltando por identificar sólo el carboxilo terminal. De la fracción II.22.5 se identificaron 30 aminoácidos del N-terminal y a la fracción II.21.4 se le determinaron dos secuencias, lo que nos indica que realmente no estaba pura. La secuencia de aminoácidos de la toxina II.20.3.4 indica que hay una importante similitud entre las estructuras primarias de esta toxina y de otras toxinas secuenciadas del veneno de alacranes del mismo género, como son la toxina II del C. suffusus suffusus y la toxina II.9.2 del C. noxius.

## I. INTRODUCCION

### A). ANTECEDENTES HISTORICOS:

En el mundo los accidentes por picadura y mordedura de animales ponzoñosos son todavía frecuentes; en nuestro país la mortalidad más elevada en este campo es, quizá, a causa de la picadura de alacrán.

Los alacranes fueron de los primeros artrópodos que invadieron el habitat terrestre. Los fósiles más antiguos de arácnidos encontrados son escorpiones del Silúrico, por lo que se les estima una antigüedad de 350 millones de años ( Mazzotti, 1963; Meglitsch, 1972).

En México, los alacranes eran bien conocidos desde la época Precolombina y, según Herrera (1921), recibían el nombre de "colotl".

Clavijero (1780) en su obra "Historia antigua de México" observó el problema del escorpionismo en forma tan acertada que sus afirmaciones son todavía válidas. Al respecto escribió " Los escorpiones son comunes en todo aquel país, pero en los países frios y templados hay pocos y estos no son muy dañosos. En las tierras calientes y demasiado secas, aunque el calor sea moderado, abundan más, y es tal su veneno que basta a matar un niño y a ocasionar terribles dolencias a los adultos. Se ha observado que el veneno de los escorpiones pequeños y amarillos es más activo que el de los grandes y pardos ".

El estudio científico de estos artrópodos se inició hace un



Poco más de dos siglos cuando Maupertuis presentó en 1731, a la Academia de Ciencias de París, sus observaciones sobre los alacranes de la antigua Provincia de Languedoc, en el sur de Francia ( citado por Berland, 1945 ).

En el pasado, los aspectos médicos del veneno fueron la motivación más fuerte para trabajar con ellos. En nuestro medio Altamirano en 1809 y Ocaranza en 1923 publicaron los primeros reportes de acciones fisiológicas de la ponzoña de alacranes mexicanos. En 1926, De la Peña y Venzor iniciaron la producción de un antisuero contra la "toxina alacránica" en la Ciudad de Durango, Dgo. (Venzor, 1930). Ochoterena, en 1930, publicó una nota sobre la acción de la "toxina alacránica" en el mesencéfalo de cobayo. En 1946, Anguiano y Córdoba se ocuparon de la terapia experimental de la intoxicación por picadura de alacrán y a partir de 1944 Del Pozo y cols. iniciaron el estudio de la acción farmacológica de las toxinas de los alacranes mexicanos. Este grupo caracterizó las acciones fisiológicas de los venenos de diferentes especies del género Centruroides ( C. suffusus, C. limpidus limpidus, C. noxius y C. limpidus tecomanus ) en diferentes partes del organismo, e intentaron explicar los mecanismos mediante los cuales se producían los efectos sobre aparato respiratorio, sistema vasomotor y músculo estriado ( contracción, fibrilación, etc. ) y su relación con la innervación periférica y/o central ( Del Pozo, 1946, 1948b, 1944, 1945 ).

En América del Sur, el estudio de la subfamilia Titynæ fue

motivado por la alta incidencia de picaduras por tres especies de este grupo: T. serrulatus, T. bahiensis y T. trinitatis. En 1909, Vital Brazil describió el envenenamiento por picadura de alacrán en Brasil, seguido por Naurano (1915) en Río de Janeiro. En 1919, Houssey, en Buenos Aires, Argentina, inició el estudio experimental de los mecanismos de acción del veneno, mientras que Megalhaes (1925, 1928, 1938, 1939 y 1946) estudió la intoxicación clínica y experimental por el veneno de Tityus, haciendo una extensa descripción de los efectos del veneno tanto en el ser humano como en animales de laboratorio.

El estudio bioquímico del veneno fue hecho por Diniz y Gómez en Brasil (Gómez y Diniz, 1966; Diniz, 1978) y por Possani y su grupo en México (Possani y col., 1980; Rode y col., 1984).

A pesar de que los alacranes eran estudiados en todos aquellos lugares donde el problema era más grave, fue el grupo de Miranda, en Europa, el que orientó sobre la estrategia para la purificación de los componentes tóxicos de estos venenos. En sus experimentos preliminares con venenos de la familia Buthinae se observó que los principios tóxicos migran hacia el cátodo cuando se someten a electroforesis a pH 8.6, que son solubles en agua pura, que precipitan con acetona, y que son componentes de bajo peso molecular (Lissitzky y col., 1956; Miranda y Lissitzky, 1958; Miranda y col., 1960, 1961). Fueron Rochat, Miranda, Lissitzky y sus colaboradores los que purificaron, caracterizaron y secuenciaron las toxinas conocidas de los alacranes Norte Africanos. Se pudo establecer que cada veneno de alacrán posee un

conjunto de toxinas distintas entre sí pero que guardan cierta homología entre ellas, lo cual permitió clasificarlas en grupos estructurales ( Rochat y col., 1979 ). Se observó que varias de las toxinas no presentan antigenicidad cruzada, es decir, que son inmunogénicamente diferentes por lo que se pudo ordenarlas en grupos inmunogénicos ( El-Ayeb y Delori, 1984 ).

También se encontró heterogeneidad en las propiedades farmacológicas de las toxinas. Algunas fueron más activas en vertebrados que sobre artrópodos (toxinas a vertebrados), otras activas en insectos pero no sobre vertebrados (toxinas a insectos), y otras más activas en crustáceos que en vertebrados e insectos (toxinas a crustáceos) (Zlotkin y col., 1978).

Las toxinas a mamíferos fueron las primeras en ser purificadas y caracterizadas. Cabe mencionar que la investigación a nivel molecular de las toxinas a insectos apenas se inicia, mientras que el mecanismo de acción de las toxinas a crustáceos es prácticamente desconocido.

Actualmente, además del interés médico, se añade la inquietud por el descubrimiento de nuevas herramientas bioquímicas que ayuden al esclarecimiento del funcionamiento del sistema nervioso y de las membranas celulares. Es decir, que la investigación de los venenos no se centra sólo en el conocimiento de los componentes directamente relacionados con los efectos letales para el hombre, sino también en muchas sustancias que poseen un amplio espectro de acciones biológicas.

B). AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE TOXINAS DE VENENO DE ALACRAN:

La presencia en el veneno de algunos factores que no son letales a mamíferos pero que producen un fenómeno excitatorio reversible en algún sistema, tienen importancia farmacéutica inmediata ya que pueden ser útiles herramientas en la caracterización de diferentes procesos fisiológicos de fenómenos excitatorios neuronales o inducción de la transmisión química, como fuentes potenciales para nuevos agentes terapéuticos, y que con el conocimiento de la estructura molecular de sus componentes ayudan en la clasificación taxonómica con bases moleculares (Zlotkin y col., 1978).

A pesar de que se conocen más de 700 especies de alacranes (agrupadas en cinco familias) distribuidas en todo el mundo, todos los alacranes con un veneno potencialmente letal para el hombre pertenecen a la familia Buthidae (Shulov y Levy, 1978), y tienen una distribución más limitada: Tamulus en la India; Scorpio y Androctonus en Africa del Norte; Parabuthus, en Bostwana; Buthus en Manchuria y países del Mediterráneo; Leiurus, en Asia Menor; Centruroides en México y suroeste de los Estados Unidos (Mazzotti y Bravo-Becherelli, 1963) y Tityus, en Trinidad-Tobago, Venezuela y Brasil ( Bucheri, 1971 ).

El veneno de los alacranes está compuesto por aminoácidos libres, sales inorgánicas, nucleótidos, lípidos, mucopolisacáridos,

proteínas y péptidos de diferentes pesos moleculares, que son neurotóxicos a invertebrados y/o vertebrados. El contenido enzimático es pobre (proteinasas, fosfolipasas, etc.) pero la hialuronidasa parece ser un componente constante en todos ellos. Poseán, además, moléculas de bajo peso molecular, tales como serotonina (Master y col., 1963) o histamina (Ismail y col., 1975), inhibidores de proteasas y liberadores de histamina (Chhatwal y Habermann, 1981).

Todos estos compuestos, de tan diversos efectos farmacológicos (hipotensión, incremento de frecuencia cardíaca, contracción del músculo liso intestinal, broncoconstricción, vasoconstricción, bradicardia, etc.) actúan directa (Grupp y col., 1980) o indirectamente (Noss y col., 1973; El-Atmar y col., 1979) para manifestar sus efectos.

El veneno crudo liofilizado y a 4 °C conserva su actividad neurotóxica por tiempo indefinido. Calentándolo a 92 °C por espacio de 40 min. la toxicidad disminuye considerablemente, y calentando a esta temperatura por más de 80 min. la toxicidad se pierde totalmente. Estudios fisicoquímicos han demostrado que el veneno es bastante estable en un amplio rango de pH (Lissitzky y col., 1956; Miranda y col., 1960, 1961).

La historia del estudio de los componentes del veneno de alacrán es paralela a la historia de los nuevos conceptos y técnicas desarrolladas en la química de proteínas.

El método de preparación utilizado por Wilson (1904) basado en la extracción salina (0.15 N) de los telsons, seguida de precipi-

lación por etanol fue adoptado, con ciertas modificaciones, por Mohammed (1942) y Adam y Weiss (1959), pero no obtuvieron productos puros.

Estos se obtuvieron después de la introducción de técnicas cromatográficas basadas en filtración en gel e intercambio iónico (Zlotkin, 1978). En la actualidad la mayor parte de los trabajos, de tipo bioquímico de venenos de alacrán se han llevado a cabo con productos extraídos por estimulación eléctrica o manual de los telsons (Possani, 1984).

De los géneros Androctonus (Rochat, 1967, 1970, 1972; Zlotkin, 1971), Buthus (Miranda, 1970; Rochat, 1976), Centruroides (Babin, 1974, 1975; García, 1976; Possani, 1978, 1980; Dent, 1980), Leiurus (Miranda, 1970; Rochat, 1976) y Tityus (Gómez, 1966; Toledo, 1976; Possani, 1977) se han aislado varias toxinas, las cuales difieren entre sí en composición de aminoácidos y en su toxicidad, tanto a mamíferos como a insectos, crustáceos y aves (ver tabla 1).

Estos polipeptidos tóxicos se han clasificado en dos grupos principales: péptidos de 61-70 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 7000 daltons (Miranda y col., 1970; Grishin y col., 1980; Darbon y col., 1982; Possani y col., 1983) y péptidos de 36-39 aminoácidos de longitud, cuyo peso molecular es cercano a los 4000 daltons (Zhdanova y col., 1978; Possani y col., 1982).

Ambos grupos de toxinas son de naturaleza básica y mantienen

TABLA # 1  
 NUMERO Y TIPO DE TOXINAS AISLADAS \*

Especie alacrán	Toxinas contra				Total	REFERENCIAS.
	Mamíferos	Insectos	Crustaceos	Otros <sup>a</sup>		
<u>A. australis</u>	5	1	1	b	7	Rochat y col.,1967,1970a,1972, 1979;Miranda y col.,1979;Kopeyan 1979;Zlotkin y col.,1971,1975; Darbon y col.,1982.
<u>A.m. sauretanicus</u>	6	1	-	-	7	Rosso y Rochat,1982;Rochat y col. 1979;Darbon y col.,1982.
<u>Bothotus judaicus</u>	-	2	-	-	2	Zlotkin y col.,1982.
<u>Buthacus arenicola</u>	5	-	-	-	5	Griens y col.,1982.
<u>Buthus eupeus</u>	11	5	-	-	16	Grishin y col.,1978,1979,1980, - 1981,1982;Zhdanova y col.,1978.
<u>B. minax</u>	2	-	-	-	2	Hagag y col.,1983.
<u>B.o. mardochei</u>	6	-	-	-	6	Vargas y col.,1982.
<u>B.o. paris</u>	2	-	-	-	2	Rochat y col.,1979.
<u>B.o. tunetanus</u>	13	-	-	-	13	Rochat y col.,1979;Vargas y col. 1982.
<u>B. tamulus</u>	3	-	-	-	3	Chhatwal y Haberman,1981.
<u>C. elegans</u>	2	-	-	-	2	Possani y col.,1978;Ramirez y - col.,1981.
<u>C. limpidus limpidus</u>	3	-	-	-	3	Tato y col.,1978.
<u>C. limpidus tascomanus</u>	3	-	-	-	3	Possani y col.,1980.
<u>C. noxius</u>	7	-	1	-	8	Possani y col.,1981a.

<u>C. sculpturatus</u>	-	-	-	13	13	Babin y col.,1974,1975;Watt y - col.,1978b.
<u>C.s. suffusus</u>	3	-	-	-	3	García,1976;Haberset-Rochat y - Sampieri,1976;Rochat y col.,1979.
<u>H. scaber</u>	1	-	-	-	1	Nair y Kurup,1975.
<u>L.g. quinquestriatus</u>	5	-	-	-	5	Miranda y col.,1970;Kopeyan y col. 1978,1982;Rochat y col.,1979.
<u>M. gibbosus</u>	3	-	-	-	3	Griene y col.,1982.
<u>S. saurus palmatus</u>	1	3	-	-	4	Lazarovici y col.,1982a,b;Lazarovici y Zlotkin,1982;Pelhate y Zlotkin,1982.
<u>T. serrulatus</u>	4	1	-	-	5	Possani y col.,1977,1981b,1982, 1983.
<b>Número total.</b>	<b>85</b>	<b>13</b>	<b>2</b>	<b>13</b>	<b>113</b>	

<sup>a</sup>Otros significa toxinas contra pollos y grillos.

<sup>b</sup>(-) significa que las toxinas contra estos animales no han sido reportadas.

El género de los alacranes fue abreviado como sigue: A ( Androctonus ), B ( Buthus ), C ( Centruroides ), H ( Heterometrus ), L ( Leiurus ), M ( Mesobothus ), S ( Scorpio ), T ( Tityus ).

<sup>c</sup>TOMADO DE POSSANI, 1984.



su estructura tridimensional por tres o cuatro puentes disulfuro (Kopeyan y col., 1974; Fontecilla-Camps y col., 1980; Possani y col., 1982) aunque también se han reportado neurotoxinas que no cumplen esta regla (Possani y col., 1978; Lazarovici y col., 1982a; Lazarovici y Zlotkin, 1982).

Hasta 1983, el número de toxinas aisladas en forma homogénea era de 113, de éstas, 23 han sido totalmente secuenciadas y de 23 se conoce su extremo N-terminal (Possani, 1984). Esto da una idea del avance tan considerable en este campo, por lo cual nos limitaremos a mencionar los antecedentes de los trabajos realizados con el veneno de los alacranes Latinoamericanos: Tityus y Centruroides.

#### 1.- Purificación.

La purificación de los péptidos tóxicos que componen el veneno de los alacranes implica un cierto grado de dificultad debido a la presencia de distintas moléculas con pesos moleculares semejantes y propiedades fisicoquímicas parecidas.

La técnica más ampliamente utilizada para la purificación de estos polipéptidos consiste de su extracción del veneno crudo por solubilización en agua y centrifugación, seguido por un paso cromatográfico. Este paso cromatográfico, que generalmente es por filtración en gel, es seguido por uno o dos más de intercambio iónico en distintas resinas, tales como: carboximetilcelulosa (Rochat y col., 1979; Possani y col., 1981 a y c), Amberlita IRC-50 o CG-50 (Miranda y col.,

1966), DEAE-Sephadex A-50 (Rochat y col., 1966), o Bio-Rex 70 (Hagag y col., 1983). Las resinas son equilibradas y corridas con diferentes sistemas de amortiguadores a valores específicos de pH y fuerza iónica.

En algunos casos la estrategia de purificación incluye un paso cromatográfico de intercambio iónico, seguido por una cromatografía en Sephadex (Babin y col., 1974; Watt y col., 1978; Hagag y col., 1983).

Especificar cual es la mejor estrategia de purificación es difícil, ya que lo que funciona para una molécula dada no es funcional para otra.

La homogeneidad de las toxinas se verifica generalmente por el comportamiento cromatográfico (simetría de los picos del cromatograma), por electroforesis en geles de poliacrilamida y por secuenciación automatizada de los aminoácidos de la porción N-terminal de las moléculas (Possani, 1983).

## 2.- Caracterización Química.

Una vez que se ha logrado obtener en forma homogénea alguna de las proteínas, esta es analizada en relación a su composición de aminoácidos. Para esto es necesario someterla a una digestión total, la cual dará el número y tipo de aminoácidos que se espera encontrar al momento de hacer la secuencia. El análisis de aminoácidos total ayuda, además, a la localización de péptidos o aminoácidos que pudieran perderse después de la digestión enzimática de la muestra.

Las toxinas están formadas de 28 a 78 aminoácidos y tienen una abundancia relativa ( 5 a 10 ) de aminoácidos como lisina, cisteína y tirosina. Poseen un bajo contenido en fenilalanina e histidina ( uno o dos ) en algunas especies, y fenilalanina e isoleucina en otras. La metionina se encuentra rara vez en la composición de ellas ( Possani y col., 1977 ).

Puesto que las toxinas son ricas en puentes disulfuro, uno de los pasos iniciales durante la determinación de la secuencia es la reducción y alquilación de los residuos de cisteína (Zlotkin y col., 1978 ). Este tratamiento permite identificar fácilmente la posición de las cisteínas derivatizadas en la cadena polipeptídica.

La gran mayoría de las neurotoxinas secuenciadas se han sometido a una degradación automática de Edman la cual, permite determinar inequívocamente la posición de varias docenas de aminoácidos de la estructura primaria total. Desafortunadamente no es esto lo difícil, sino la determinación de la secuencia completa.

La estrategia utilizada para resolver este problema es someter a la molécula a una secuenciación directa. A otra muestra de la misma molécula romperla, química o enzimáticamente, y analizar los péptidos resultantes. La sobreposición de cada uno de los fragmentos de manera coherente nos dará un único resultado (Possani, 1984).

Un buen ejemplo de esta estrategia es el trabajo de Babin y cols. (1974, 1975), en el cual cuatro toxinas del C. sculpturatus

fueron secuenciadas por degradación automática de Edman de pequeños péptidos, los cuales fueron obtenidos después de someter a la molécula a digestión enzimática con tripsina, quimotripsina y papaína.

La proteinasa V8 de Staphylococcus aureus fue utilizada en la determinación de la secuencia de la toxina III-10 de T. serrulatus (Possani y col., 1983 ). El rompimiento químico con bromuro de cianógeno es poco utilizado puesto que, como ya se mencionó, la metionina es un aminoácido raro en las toxinas. El Único ejemplo en la literatura fue reportado para toxinas del veneno de T. serrulatus (Possani y col., 1983 y 1985).

Para la determinación del carboxilo terminal, la mayoría de los investigadores han utilizado carboxipeptidasa A, aunque para la determinación del carboxilo terminal de la noxiustoxina se ha utilizado carboxipeptidasa Y ( Possani y col., 1984 ).

### 3.- Toxinas Caracterizadas.

De las tres especies más peligrosas de Tityus solamente el T. serrulatus Lutz y Hello ha sido estudiado en detalle.

El grupo de Diniz, en Brasil, purificó dos toxinas contra mamíferos a las cuales llamaron " Tityustoxina " I y II, la primera con una dosis letal media más baja que la segunda (Gómez y Diniz, 1966; Toledo y Neves, 1976).

Possani y su grupo purificaron, por lo menos, cuatro tipos diferentes de toxinas contra mamíferos y una contra insectos. De todas

estas toxinas se identificó su N-terminal y de una, la fracción III-10, se conoció la secuencia total (Possani y col., 1981, 1982) (ver tabla No. 2). Probablemente la Tilyustoxina descrita por Gómez y Diniz (1966) y otras dos fracciones tóxicas descritas en la literatura (Miranda y col., 1966; Linden y Raftery, 1976; Toledo y Neves, 1976) correspondan con alguna de las arriba mencionadas.

En relación al género Centruroides Watt (1973) en Estados Unidos logró purificar cuatro toxinas (con actividad en pollos) del C. sculpturatus, designadas I, II, III y IV; de estas, sólo de la toxina I se conoce la secuencia completa (Babin y col., 1975). Además, se han purificado tres variantes que son tóxicas a insectos y, en dosis mayores, a mamíferos, las cuales han sido secuenciadas en su totalidad y muestran grandes homologías entre sí (Babin y col., 1974) (ver tabla No. 2).

En Francia, García (1976), trabajando con el veneno de C. suffusus, logró aislar y secuenciar dos toxinas (I y II). De este mismo veneno se aisló otra toxina denominada III, la cual fue secuenciada en su totalidad (Habersetzer-Rochat y Sampieri, 1976).

Los alacranes mexicanos han sido estudiados ampliamente, lográndose aislar 17 toxinas de las especies C. noxius (Dent y col., 1980; Possani y col., 1981), C. elegans (Possani y col., 1978), C. limpidus limpidus (Guzmán y col., 1983), y C. l. tecomanus (Possani y col., 1980) y se han obtenido secuencias N-terminal de ocho de ellas (ver tabla # 2).

TABLA # 2.

## SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LAS TOXINAS DE ALACRAN \*

TOXINA <sup>a</sup>	SECUENCIA COMPLETA O SECUENCIA DEL N-TERMINAL							REFERENCIAS.
	1	10	20	30	40	50	60	
Ce II-6.3	KZGYLVBHSTGCKYVZCFKLGBBBYCLRECR...							Ramírez y col., 1981.
Clt II-9.3	KZGXLVBHXTGC...							Possani y col., 1980.
Cn II-11	TIINVKCTSPKQCKSPCKELYGSSAGAKCNGKCKCYBN							Possani y col., 1982.
Cn II-9.2.2	KEGYLVKNTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQGYKAGGYCYAFACWC...							Possani y col., 1981a.
Cn II-10	KEGYLVNLYTGCKYECFKLGDNYCL...							Possani y col., 1981a. <sup>d</sup>
Cn II-10.2	TFIDVKGSSKEXP...							Possani y col., 1982.
Cn II-13	KEGYIVDYHDGCKYKCYKLGNDY...							Possani y col., 1981a.
Cn II-14	KDGYLVDAKGCCKKNCYKLGKNDYCNRECRMKHRG...							Possani y col., 1981a.
CeE I	KDGYLVKTKGCKKCTCYKLGENDFCNRECKMKWHIGGSYGYCYGFCYCEGLPDSTQTWPLPNKCT							Babin y col., 1975.
CeE V1	KEGYLVKKS DGCKYDCFWLGNENHTCECKAKNQGGSYGYCYAFACWCEGLPESTPTTYPLPNKCS							Babin y col., 1974.
CeE V2	KEGYLVKSTGCKYGCCLKLGENEGNCKECKAKNQGGSYGYCYAFACWCEGLPESTPTTYPLPNKCSS							Babin y col., 1974.
CeE V3	KEGYLVKKS DGCKYGCCLKLGEQEGCDTECKAKNQGGSYGYCYAFACWCEGLPESTPTTYPLPNKSC							Babin y col., 1974. <sup>b</sup>
CeE II	KEGYLVKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWVPLPNKTCN							García, 1976.
CeE III	KEGYLVKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKSSGGYCYAFACWCEALPDHTQVWVPLPNKCT							Rochat, 1974. <sup>c</sup>
CeE I	KEGYLVKSTGCKYECLKLGDN DYCL...							García, 1976.
Ta III-10	KEGYLLNDHEGCKLSCFIRPSGYCGREGGINKGSSGYCAMPACYCYGLPNWVKVMDRATNKC							Possani y col., 1983.
Ta II-10	KEGYLLNDHEGCKLSCFIRPSGYCGREGGINKGSSGYCAMPACYG...							Possani y col., 1983.
Ta	KEGYLLNDHEGCKLSCFIRPSGYCGREGGINKGSSGYCAMP...							Possani y col., 1981b.
Ta III-8	KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDCYCKTHLKASSGYCAMP...							Possani y col., 1981b.
Ta IV-6	KKDGYPVEYDNCAYICWNYD...							Possani y col., 1983.

CONTINUACION

Ts II-9B KEGYANTHEGCKYSCFIRTAGPCDGYCKTH...

Possani y col.,1983.

Ts II-9A VFINAKCRGSPECLPKCKEAXGKAAGKCKN...

Possani y col.,1982.

<sup>a</sup> Las toxinas estan ordenadas alfabéticamente. Las secuencias completas preceden a las secuencias N-terminal. Las abreviaciones de los nombres científicos de los alacranes fueron: Ca ( Centruroides elegans ), Clt ( C.l. tecomanus ), Cn ( C. noxius ), CsE ( C. sculpturatus Ewing ), Csa ( C.s. suffusus ) y Ts ( Tityus serrulatus ).

<sup>b</sup> Algunos de los aminoácidos de esta secuencia fueron corregidos por Fontecilla-Camps y col. ( 1980 ).

<sup>c</sup> Esta referencia fue citada por Habersetzer-Rochat y Sampieri ( 1976 ).

<sup>d</sup> El incremento en la secuencia fue tomado de Carbone y col. ( 1984 ).

<sup>e</sup> TOMADO DE POSSANI, 1984.

En vista de que este trabajo se refiere al alacrán de Colima, C. limpidus tecomanus Hoffmann, es necesario detallar el trabajo existente en la literatura.

El veneno de los alacranes C.l.tecomanus se obtuvo de dos formas diferentes. Una, por estimulación eléctrica de los telsons de ejemplares anestesiados con bioxido de carbono (veneno soluble) y la otra fue por extracción con etanol de un homogenado de los telsons (extracto de los telsons). Las fracciones tóxicas de estas preparaciones se obtuvieron al pasarlas por una columna de Sephadex G-50, equilibrada con acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, seguida por una cromatografía en carboximetilcelulosa en el mismo buffer. Del extracto de los telsons se obtuvieron dos fracciones tóxicas, mientras que del veneno soluble se detectaron tres. La última de estas tres fracciones se recromatografio en una columna de intercambio iónico (Aminex A-50) lograndose obtener así una toxina homogénea a la cual se le llamo II.9.3. Por análisis de aminoácidos, esta toxina esta compuesta por 65 aminoácidos y tiene un peso molecular de 7335.

La secuencia N-terminal fue: H-Lis-Glx-Gli-X-Leu-Val-Asx-His-X-Tre-Gli-Cis que es homóloga a otras toxinas de alacrán.

Las fracciones I y III obtenidas al fraccionar el veneno soluble en Sephadex G-50 se analizaron para determinar su composición. En la fracción I se encontró actividad de hialuronidasa y la fracción III posee, por lo menos, 15 componentes positivos a ninhidrina (Possani y cols., 1980)."



#### 4.- Estructura Secundaria y Terciaria.

Además de conocer la estructura covalente completa de las toxinas, es necesario conocer la posición de los puentes de disulfuro; desgraciadamente, de los alacranes Latinoamericanos sólo del C. sculpturatus se conocen la posición de sus puentes de disulfuro. El estudio por difracción de rayos X de la variante 3, ha mostrado que los puentes están formados por las cisteínas en las posiciones 12-65, 26-41, 25-46 y 29-48 ( Fontecilla-Camps y col., 1980 ).

De las estructuras secundarias y terciarias no existe información abundante. Generalmente se acepta que la estructura secundaria y terciaria de un polipéptido depende de la interacción de los aminoácidos, de sus posición en la estructura primaria, y del medio ambiente que los rodea tanto in vivo como in vitro. Y así, una secuencia de aminoácidos particular puede favorecer una o varias formas posibles de organización molecular, ya sea  $\alpha$ -hélice, lamina  $\beta$  -plegada o estructura de enrollamiento al azar.

Estas estructuras se han estudiado utilizando diferentes técnicas, tales como dispersión óptica rotatoria, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear (muestras en solución acuosa) y difracción por rayos X de cristales de la molécula.

Recientemente, seis toxinas de alacranes Latinoamericanos fueron caracterizadas espectroscópicamente (Possani y col., 1981d), encontrándose que estas moléculas termorresistentes contienen de 20 a

22 % de estructura  $\beta$ -plegada y de 4 a 11 % de estructura  $\alpha$ -hélice.

Por difracción de rayos X se han analizado cristales de la variante 3 de C.sculpturalis y se ha observado que su estructura tridimensional es similar a un " puño de la mano derecha " con los nudillos representados por rizos de la estructura  $\alpha$  - hélice y la estructura  $\beta$  - plegada sobre la unión entre el segundo y el tercer dedo formando una porción densa con tres puentes de disulfuro; la muñeca corresponde a la porción C-terminal de la proteína (Fontecilla-Camps y col.,1980, 1982)(ver fig.A).

#### C). CARACTERIZACION FISIOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA DEL VENENO DEL ALACRAN.

##### 1.- Generalidades.

El envenenamiento por picadura o mordedura de un animal ponzoñoso es la inyección de veneno, una mezcla de compuestos externos, al interior del cuerpo de un animal. Algunos de éstos compuestos son tóxicos y reflejan su toxicidad por diferentes medios. Ejemplos de ellos son las neurotoxinas, las cardiotoxinas y las nefrotoxinas (El-Asmar, 1984).

El veneno del alacrán puede actuar alterando el funcionamiento del sistema nervioso central, incluyendo el sistema nervioso autónomo y la transmisión neuromuscular (Gómez y col., 1973; Ismail y col., 1973; Diniz y col., 1974 ). También puede afectar el sistema cardiovascular (Yarom y Gueron, 1971; Gueron y Yarom, 1970; Ismail y col.,

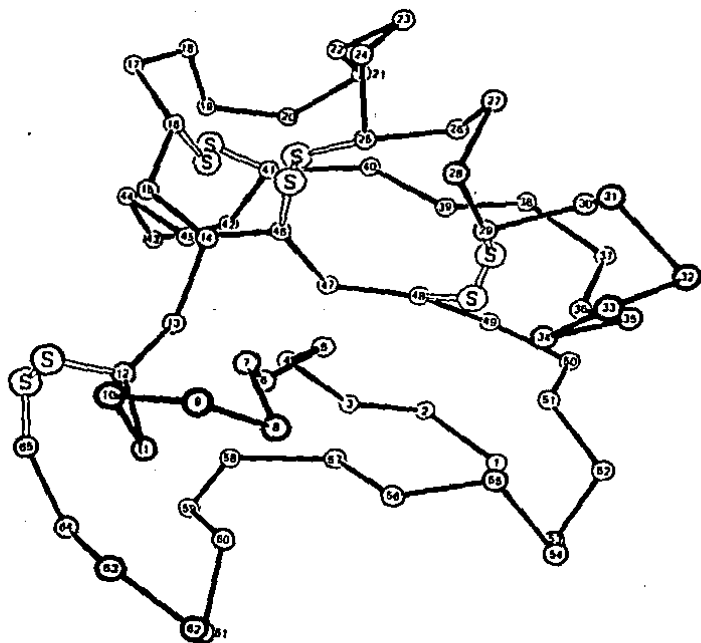


Figura A: Estructura de Unión de Carbonos  $\alpha$  de la Variante 3 del C. sculpturatus.

Los círculos numerados coinciden con los átomos de carbono  $\alpha$ . Los átomos de azufre de los residuos de -cisteína se muestran a lo largo con uniones a los átomos de carbono  $\alpha$ . (Tomado de Possani, 1984).

1972), el sistema respiratorio (Ismail y col., 1973; Freire-Maia y col., 1973) y los mecanismos homeostáticos del cuerpo. En este caso, modificando, la liberación hormonal (Henriques y col., 1968; Ismail y col., 1978) y/o actuando sobre centros nerviosos superiores (hipotálamo, talamo, hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, etc.) (Efrati, 1978).

## 2.- Estudios Toxicológicos.

Es común en la práctica de la toxicología que los primeros conocimientos de las propiedades farmacológicas de un material tóxico se obtengan por determinación de su potencia letal y de la observación cuidadosa de la sintomatología que precede a la muerte de los animales de laboratorio. Además, se ha observado una gran semejanza en la sintomatología inducida por diferentes venenos de alacrán, tanto de los Norteamericanos como de los Latinoamericanos. Las manifestaciones más comunes incluyen efectos parasimpáticos, tales como salivación, lagrimeo, relajación de esfínteres, distensión gástrica, bradicardia e hipotensión; así como efectos típicamente simpáticos como midriasis, piloercción, sudoración, hiperglucemia, taquicardia e hipertensión, acompañados por un claro efecto sobre músculo esquelético (espasmo, sacudidas y contracciones musculares).

La letalidad en el humano está generalmente relacionada a colapso cardiovascular y edema pulmonar (Sturman, 1962; Gueron y col., 1967; Gueron y Yaron, 1970). Una observación interesante es que, a pesar de que el cuadro clínico sea muy grave y el paciente sufra

ceguera temporal, persiste una excelente claridad mental, hasta que el paciente cae en coma ( Velasco-Castrejón, y col., 1976 ).

Desde luego no todos los individuos accidentados sufren este cuadro clínico. Existen algunos que han sido picados en varias ocasiones anteriores y que no presentan sintomatología y otros que sólo sufren intoxicaciones leves. Esta variabilidad deja entrever que quizá exista cierta información genética que ayude a estos individuos contra la picadura del alacrán. En un estudio realizado por Guzmán (1984), el cual consistió en la determinación de la dosis letal media de la fracción II de C. limpidus limpidus en diferentes cepas de ratón, reportó que la cepa SSA albina es la más sensible al veneno (DL50 = 0.61 mg/kg) mientras que la BALB/K albina es la más resistente al mismo, teniendo una dosis letal 50 de 3.31 mg/kg (ver tabla # 3 ).

Las diferencias atribuidas a los venenos de los alacranes radica en las dosis letales medias determinadas para cada una de las especies, estas varían dependiendo de la especie estudiada y de su distribución geográfica. Sin embargo, existen diferencias de DL50 por las cepas de ratones estudiadas, la vía de administración y la manipulación estadística de los datos (ver tabla # 4).

### 3.- Efectos Cardiovasculares.

En el hombre, los efectos cardiovasculares mas frecuentes se refieren a anomalías en el electrocardiograma, hipertensión, colapso vascular periférico, edema pulmonar y cambios morfológicos en el miocardio (Gueron, 1970).

TABLA N 3.

DOSIS LETALES MEDIAS ( DL50s ) DEL VENENO DE <sup>N</sup>  
C. limpidus limpidus EFECTUADAS EN DIFERENTES CEPAS DE RATON.

Cepa de ratón	DL50s: ( mg/kg )
BALB/C ( albina )	2.78
BALB/k ( albina )	3.31
CD1 ( albina )	3.30
C57 ( negra )	1.20
DBA ( parda )	1.20
NIH ( albina )	1.32
SSA ( albina )	0.61

<sup>N</sup>  
 Tomada de Guzmán, 1984.

TABLA No. 4. DOSIS LETALES MEDIAS ( DL50 ) SOBRE RATONES Y SOBRE LARVAS  
DE MOSCAS DE DIFERENTES ESPECIES DE ALACRANES.

Espece de alacrán	DL50 mg/kg en ratón	DL50 mg/kg en larva
<u>L. quinquestríatus</u>	0.25	2.2
<u>C. noxius</u>	0.26 +	-
<u>A. aeneas aeneas</u>	0.31	0.5
<u>A. mauretanicus mauretanicus</u>	0.31	4.7
<u>A. australis</u>	0.32	2.9
<u>C. santa maria</u>	0.39	32.2
<u>A. crassicauda</u>	0.40	6.8
<u>Tityus serrulatus</u>	0.43 - 1.25 &	21.7
<u>Buthiscus bicalcaratus</u>	0.60	0.7
<u>C. limpidus tecomanus</u>	0.69	2.2
<u>A. amoreuxi</u>	0.75	3.6
<u>Buthacus leptochelis</u>	0.77	0.9
<u>B. occitanus tunetanus</u>	0.90	0.7
<u>B. arenicola</u>	0.99	0.7
<u>C. sculpturatus</u>	1.12 *	-
<u>B. occitanus paris</u>	4.15	0.3
<u>Buthotus minax</u>	4.25	3.0
<u>Parabuthus transvaalicus</u>	4.25	3.5

Tomado de Zlotkin y col. ( 1971 )

& Tomado de Possani y col. ( 1977 )

+ Tomado de Bent y col. ( 1980 )

\* Tomado de Stahnke ( 1963 ).

Los estudios histopatológicos han reportado degeneración de las fibras musculares, necrosis local y edema intersticial (Guéron y Yarom, 1970). La miocarditis también se ha observado en pacientes picados por Tityus trinitatis (Patric y cols., 1976). Estos cambios cardiovasculares no pueden explicarse tan solo por un exceso de catecolaminas por lo que se ha sugerido la posibilidad de que sea un efecto directo sobre la permeabilidad iónica de la membrana celular (Yarom y Braun, 1971). De estos trabajos se puede concluir que si bien los cambios morfológicos descubiertos son provocados por el veneno, no significa que ésta sea su acción primaria, más bien serían manifestaciones secundarias que se presentan después de una liberación de sustancias farmacológicas, ya sea por un efecto sistémico sobre sistema nervioso central y/o por liberación local de transmisores como resultado de la estimulación de fibras nerviosas postganglionares o en terminales nerviosas en la unión neuromiocardial.

#### 4.- Efectos Vasculares.

Se ha reportado que la aplicación intravenosa del veneno de los principales géneros tóxicos de la familia Buthidae, tales como Centruroides (Del Pozo, 1960), Tityus (Freire-Naia y col., 1970, 1974), Leiurus (Braun y cols., 1969; Cheymol y cols., 1974) Androctonus y Buthus (Cheymol y col., 1974) provoca un inotropismo positivo inicial, taquicardia e hipertensión, seguidas de arritmias, bradicardias e hipotensión.



La hipertensión puede considerarse como un efecto característico de todos ellos.

El efecto hipertensivo provocado por el veneno de los Centruroides fue atribuido a la activación postganglionar y liberación adrenal ya que éste no fue afectado por destrucción espinal (Del Pozo, 1956) pero sí por la ligación o extirpación de las glándulas adrenales (Patterson, 1960; Del Pozo, 1956).

Los trabajos de Mohammed (1950) y Mohammed y cols. (1954) señalaron la posibilidad de que el veneno de Leiurus quinquestratus puede inducir liberación simpática, apoyando esto la elevación en las concentraciones sanguíneas de azúcar y potasio y la disminución del sodio.)

#### 5.- Efectos Respiratorios.

La muerte provocada por picadura de alacranes de los géneros Buthinae (Balozet, 1971), Centruroides (Del Pozo, 1956) y Tityus (Magalhaes, 1928) es generalmente atribuida a parálisis respiratoria.

La inyección de veneno crudo a animales de laboratorio causa hiperpnea, taquipnea, parálisis respiratoria y respiración periódica (Magalhaes, 1928; De Pozo y cols., 1945; Paterson, 1964; Stahnke, 1966).

La parálisis respiratoria inducida por el veneno de Centruroides se atribuyó a alguna acción sobre el sistema nervioso central (Del Pozo, 1956). Mientras que Patterson y Waley (1970) sugirieron que

las alteraciones respiratorias pudieran ser posteriores a una descarga aferente periférica provocada por la activación de los receptores de cuerpo carotídeo.

#### 6.- Efectos Musculares.

Los trabajos iniciales de Del pozo y Anguiano (1947) determinaron algunos de los efectos esenciales del veneno sobre la función muscular. Estos autores encontraron:

- a) Que la contractura muscular y la fibrilación muscular provocadas por la administración intravenosa del veneno de Centruroides desaparece si se destruye el cordón espinal o si se cortan los nervios motores, indicando esto su origen central.
- b) Que la aplicación local del veneno en el músculo, o a través de una inyección intraarterial, produce contractura y fibrilación, sugiriendo esto el origen periférico de la acción muscular.
- c) Que la aplicación local del veneno a un tronco nervioso motor no produce ningún efecto sobre los músculos, señalando la relativa impermeabilidad del tronco nervioso.
- d) Que el veneno no activa músculos denervados. Este dato enfatiza el papel de la acción axonal periférica en los efectos musculares del veneno del alacrán.

También se ha encontrado que el calcio está relacionado con la respuesta del músculo al veneno, ya que los efectos son antagonizados por altas concentraciones de calcio, mimetizados por veratrina

(asumiendo que actúa desplazando el calcio de la membrana celular e incrementando la conductividad al sodio) (Frank, 1958; Nickerson, 1971), y por citrato (el cual fija iones de calcio). También se ha postulado que la acción excitatoria del veneno en la membrana muscular puede deberse al desplazamiento del calcio de sus sitios de unión en la fibra muscular por el veneno (Adam y Weiss, 1959).

#### 7.- Acción Sobre Canales Iónicos y Diferenciación Farmacológica.

Los canales iónicos son elementos excitables en las membranas celulares nerviosas, musculares y de otros tejidos que producen y traducen señales eléctricas en las células vivas. El número de clases de canales conocidos se ha incrementado y una sola membrana excitable puede tener de 5 a 10 clases y el genoma puede codificar, posiblemente, para más de 50.

La excitación y las señales eléctricas en el sistema nervioso involucra el movimiento de iones a través de estos canales. Los iones sodio, potasio, calcio y cloro parecen ser responsables de toda la acción. Cada canal puede ser considerado como una molécula excitable que responde específicamente a un estímulo químico, a una deformación mecánica, etc. La respuesta del canal llamada "disparo", es aparentemente, la abertura o el cerrado del poro. El poro abierto tiene la importante propiedad de permeabilidad selectiva.

En sus análisis clásicos de corrientes iónicas en el axón gigante de calamar, Hodgkin y Huxley (1952) reconocieron tres dife-

rentes componentes de corriente, a los cuales llamaron sodio, potasio y fuga. Hoy los nombres de canales de sodio y canales de potasio son universalmente aceptados para los canales iónicos correspondientes en el axón. El nombre de canal de fuga o escape también se usa, aunque no hay evidencias experimentales que registren el mecanismo iónico o de transporte en el cual se encuentre involucrado.

Hasta mediados de los años sesenta, había poco conocimiento de como se movían los iones a través de las membranas de células excitables. Una gran variedad de mecanismos fueron considerados como posibles; estos incluían permeación en membranas homogéneas, unión y migración a lo largo de sitios cargados, acarreadores, y el flujo a través de poros. Los experimentos farmacológicos con moléculas tales como la tetrodotoxina, saxitoxina y tetraetilamonio proporcionaron las evidencias necesarias para determinar cual era este mecanismo.

La tetrodotoxina (llamada TTX por K.S. Cole) es un veneno paralizante de algunos peces globo y de otros peces del orden tetraodontiformes (Hairstead, 1978) que bloquea la conducción del potencial de acción en el nervio y el músculo. El primer estudio de voltaje sostenido en axón gigante de cangrejo reveló que la TTX bloquea selectivamente la corriente de sodio, sin alterar la de potasio y la de fuga.

En la misma época se observó que otra toxina natural, la Saxitoxina (STX), poseía propiedades farmacológicas casi idénticas a la

TTX. Como ésta, la saxitoxina es una molécula pequeña, soluble en agua, que bloquea la corriente de sodio en concentraciones nanomolares cuando se aplica fuera de la célula. La saxitoxina es una de las varias toxinas paralizantes sintetizadas por dinoflagelados del género *Gonyaulax* y otros (Taylor y Seliger, 1979).

Un tercer agente bloqueador importante con acción complementaria a la de la TTX y STX es el ión tetraetilamonio (TEA). Este ión prolonga la fase de caída del potencial de acción por bloqueo selectivo de la corriente de potasio, pero no la de sodio.

La TTX, STX y TEA no son los únicos agentes bloqueadores de canales de sodio y potasio. La lista de bloqueadores de canales de potasio incluyen los cationes inorgánicos  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Ba}^{2+}$  y los cationes orgánicos 4-aminopiridina y muchas moléculas pequeñas relacionadas con átomos de nitrógeno cuaternario o protonado. Particularmente valiosos en la clínica son los agentes bloqueadores del canal de sodio como los anestésicos locales.

En las células donde existen canales de sodio (axones, neuronas, cuerpos celulares y muchos de los músculos de los vertebrados) es más impresionante la similitud de función que la diferencia.

La más importante diversificación se ha presentado en los canales de potasio dependientes de voltaje. Muchos abren sólo después de que la membrana se ha despolarizado, otros sólo lo hacen después que se ha hiperpolarizado; unos abren rápidamente y otros lentamente;

algunos son modulados por otras influencias tales como mensajeros intracelulares.

Aunque los iones potasio son siempre la corriente mensajera mayor, las respuestas y las diferencias farmacológicas son suficientes para hacer que los canales sean fundamentalmente diferentes.

Todas las toxinas de alacrán conocidas actúan en sistemas neuromusculares de vertebrados y deben su efecto a una modificación de los canales sensibles a voltaje.

A través de estudios electrofisiológicos, flujo de iones radioactivos y unión de ligandos se han definido cuatro sitios de unión de neurotoxinas en el canal de sodio (Catterall, 1980 ; Couraud y col., 1982). El sitio I reconoce a la tetrodotoxina y la saxitoxina, dos moléculas heterocíclicas que semejan las funciones de la guanidina. Su ocupación induce una inhibición específica de la permeabilidad al sodio. Al sitio II se unen las toxinas liposolubles batracotoxina, veratrina, aconitina y grayanotoxina. Su ocupación modifica la dependencia de voltajes de activación e inactivación resultando esto en una activación persistente (Catterall, 1977). El sitio III une toxinas  $\alpha$  de alacrán o toxinas de anemona de mar cuya acción fisiológica es una inhibición de la inactivación y potenciación de la activación persistente provocada por toxinas del sitio II (Lazdunski, 1980; Catterall, 1977 ). Finalmente el sitio IV une toxinas de alacrán del tipo beta.

Esta clasificación genera la distinción entre toxinas de alacrán  $\alpha$  y  $\beta$ .

a) Mecanismo de Acción de las Toxinas  $\alpha$  de Alacrán ( $\alpha$  ScTx).

La toxinas  $\alpha$  ScTx fueron las primeras toxinas en ser estudiadas y hasta 1980 cualquier referencia a toxinas de alacrán era una alusión a las toxinas alfa.

Muchas de las toxinas han sido purificadas a partir del veneno de los alacranes de Africa y Asia, que pertenecen a la subfamilia Buthinae. Están presentes en el veneno de A. australis Hector, A.m. mauretanicus, Leiurus quinquestriatus, Buthus occitanus tunetanus y Buthus eupeus. Algunas toxinas han sido purificadas del veneno de T. serrulatus, el cual pertenece a la subfamilia Titynae (Barhanin y col., 1982).

Parece ser que el veneno de los alacranes Buthinae contiene sólo toxinas  $\alpha$ , mientras que el veneno de los Centruroides contiene sólo toxinas  $\beta$  y el veneno de T. serrulatus posee ambos tipos de toxinas  $\alpha$  y  $\beta$ .

La unión de estas toxinas al sitio III del canal de sodio produce un bloqueo irreversible de la inactivación del canal, en estado de apertura con prolongación del potencial de acción. Cuando se inyectan subcutáneamente se producen las siguientes manifestaciones: dolor local inmediato, hiperexcitabilidad y saltos violentos, salivación y lagrimeo, respiración acelerada, convulsiones, contracciones y contracciones musculares, parálisis espástica con entumecimiento de los miembros y falla respiratoria. La muerte se presenta a los pocos minutos u horas dependiendo de la dosis ( Zlotkin y col., 1978 ).

b) Mecanismo de Acción de las toxinas Beta (  $\beta$ ScTx ).

Las toxinas beta de alacran se han encontrado en el veneno de especies pertenecientes a las subfamilias Centruroides y Tityras, o más específicamente en el veneno de C.s. suffusus, C. sculpturatus y T.serrulatus.

Cuando se inyectan subcutáneamente estas toxinas en animales de laboratorio provocan efectos similares a aquellos causados por toxinas alfa (dolor local inmediato, hiperexcitabilidad, respiración acelerada, convulsiones, contracciones y contracturas musculares, parálisis espástica y fallas respiratorias), excepto que las convulsiones, salivación y lagrimeo son menos pronunciadas.

c) Estudios Electrofisiológicos.

El efecto del veneno de C. sculpturatus se ha estudiado en nervio mielinizado de rana en condiciones de voltaje sostenido (Cahalan, 1973). Se ha encontrado que los disparos repetidos inducidos por el veneno son debidos a la aparición de una corriente de sodio anormal sobre la repolarización. Esta corriente es dependiente del tiempo y del potencial. Efectos semejantes son provocados por una toxina purificada (toxina II) del C.s.suffusus (Couraud y col., 1982) y por una toxina del C. sculpturatus (Wang y Strickartz, 1982). El análisis de la cinética de la corriente de sodio inducida por toxinas alfa y beta adicionadas Juntas mostró que el mismo canal de sodio fue modificado simultáneamente por ambas toxinas (Wang y Strickartz, 1982).



En el músculo esquelético de rana, la toxina II de C. suffusus bloquea la fase inicial de la corriente de entrada de sodio que surge del influjo a través de los canales de sodio de superficie de membrana, pero no afecta la fase tardía de la corriente de entrada que corresponde al flujo de sodio a través de los canales de membrana del túbulo-T (Jaimovich y col., 1982). La toxina no modifica la contracción muscular.

En conclusión, los efectos de las toxinas beta son diferentes en nervio mielinizado y músculo esquelético, pero en ambos casos están mediados por una modificación del proceso de activación de los canales de sodio sensibles a voltaje.

#### d) Estudios de Flujo Iónico y Liberación de Transmisores.

Se ha reportado que la toxina II de C.s. suffusus provoca la liberación de GABA y noradrenalina de sinaptosomas de cerebro de rata, de manera similar a las toxinas alfa (Couraud y col., 1982). Estos efectos de las toxinas alfa y beta fueron aditivos, antagonizados por tetradoxina y producto, probablemente, de una despolarización de la membrana causada por un incremento de la permeabilidad del sodio en la membrana. Esto se comprobó midiendo el flujo de sodio, lo que señaló que las toxinas beta por sí solas no tienen un efecto detectable pero causan un incremento en la recaptura de sodio por sinaptosomas en presencia de toxinas alfa. En contraste, no se observa sinergismo entre las toxinas beta y la veratridina (Jover y col., 1984). Todos estos

datos prueban que las toxinas de alacrán del tipo beta afectan el canal de sodio en sinaptosomas de rata en forma diferente de como lo hace la veratridina y las toxinas alfa.

e) Estudios de Unión de Ligandos.

Algunos datos electrofisiológicos y de flujo iónico sugieren que las toxinas de alacrán alfa y beta se unen a diferentes sitios receptores en las fibras nerviosas mielinizadas y en sinaptosomas de cerebro de rata. Los experimentos de unión de toxinas sugieren la existencia de distintos sitios de unión en sinaptosomas de rata (Jover y col., 1980). Las toxinas de alacrán del tipo alfa y las toxinas de anemona de mar se unen de manera dependiente de voltaje y las otras, las del tipo beta, se unen independientemente del potencial de membrana. En la clasificación propuesta por Catterall (1980), el sitio de unión de las toxinas alfa fue el sitio III y el sitio de las toxinas beta sería el IV. Hasta la fecha, no hay otros tipos de toxinas que actuando en el canal de sodio se haya demostrado que compitan con las toxinas beta por el sitio IV.

Más recientemente, los sitios de unión específicos para la toxina II de C.s. suffusus fueron descritos en preparaciones de membranas de músculo esquelético de rana (Jaimovich y col., 1982) y electroplaca de Electrophorus electricus (Wheeler y col., 1982). Estos sitios presentan las mismas propiedades que los ubicados en los sinaptosomas de cerebro de rata. También se ha encontrado que una toxina del veneno de T. serrulatus (Toxina gama, Possani y col., 1981) se une a sinapto-

sonas de cerebro de rata y membranas de electroplaca en el mismo sitio receptor que lo hace la toxina II de C. s. suffusus (Barhanin y col., 1982), demostrando que esta toxina pertenece a la clase beta.

#### 8.- Relación Estructura-Función.

La selectividad y especificidad de la acción de los diferentes componentes del veneno crudo han impulsado la investigación de la composición y estructura de dichas moléculas, así como el estudio de la relación estructura-función.

En la literatura se reportan dos formas para analizar el segundo punto, una es comparando una serie de estructuras similares conocidas con su acción en sitios biológicos específicos y, la otra, es tomar una toxina e introducirle modificaciones químicas en diferentes posiciones y probar la función biológica en el mismo sistema ( Possani, 1984 ).

Desde el punto de vista funcional las toxinas de alacrán se pueden clasificar en cuatro grupos:

a) Toxinas contra mamíferos cuya acción es a nivel de canales de sodio. Este grupo es el más numeroso y por ende el más estudiado química, fisiológica y farmacológicamente. Son toxinas de cadena larga que poseen similitud estructural y funcional. Los estudios de modificación, sustitución, delección o inserción de nuevos aminoácidos en la estructura primaria de estas toxinas, reportaron inactivación de la toxina o, por lo menos, un tipo diferente de modulación de la función a nivel molecular.

b) El segundo grupo está formado por toxinas contra mamíferos pero que actúan a nivel de canales de potasio. El grupo está constituido por la noxiustoxina y la toxina II.10.2 ambas aisladas del veneno de C. noxius, y por la toxina II.9A aislada del veneno de Tityus serrulatus.

Estas toxinas son polipéptidos de cadena corta, que poseen similitud estructural y funcional. En el axón gigante de calamar (ensayos in vitro) disminuyen la permeabilidad del canal de potasio selectiva, reversible e independientemente de la polarización, sin afectar las propiedades del canal de sodio (Carbone y col., 1982; 1983; Passani y col., 1982). Desde el punto de vista estructural estas toxinas son diferentes a las que bloquean el canal de sodio.

c) El tercer grupo esta formado por toxinas caracterizadas en otros bioensayos, como larvas de mosca, grillos, músculo aislado de cucaracha y otros insectos (Babin y col., 1974; revisión de Zlotkin y col., 1978; Grishin y col., 1974; Palhate y Zlotkin, 1982). Estructuralmente, estas toxinas se dividen en péptidos de cadena larga y péptidos de cadena corta (Grishin y col., 1980; Zhdanova y col., 1978), y son muy diferentes a las toxinas contra mamíferos. Constituyen un buen ejemplo de diferente estructura, diferente acción biológica.

d) Finalmente, el cuarto grupo está compuesto por las toxinas a crustáceos (Zlotkin y col., 1978), las cuales no han sido caracterizadas estructuralmente.

#### D). OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS.

Aun cuando el C. noxius, alacrán de Nayarit, ha sido reportado como la especie de veneno más tóxico de los alacranes Latinoamericanos y el C. suffusus suffusus, alacrán de Durango, es la especie tóxica más famosa de México, es el C. limpidus tecomanus, la especie responsable de que el Estado de Colima tenga la mayor tasa de mortalidad por picadura de alacrán de todos los Estados del País.

La tasa promedio anual de mortalidad por 100 000 habitantes, en el Estado de Colima, fue de 19.2 en el lapso de 1969-1975 (De la Garza y cols. 1978).

Esta fue la razón por la cual se decidió estudiar detalladamente el veneno de este arácnido, estudio que constituye la parte medular de esta tesis, cuyos objetivos primarios fueron:

- a) Obtención del veneno.
- b) Separación cromatográfica mediante filtración por peso molecular.
- c) Separación cromatográfica por intercambio iónico de las fracciones tóxicas.
- d) Caracterización química por análisis de aminoácidos y por determinación de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos tóxicos.

## II. MATERIAL Y METODO.

### A) OBTENCION Y CONSERVACION DEL VENENO.

Los alacranes del género Centruroides limpidus tecomanus fueron capturados en el Estado de Colima; el veneno crudo se obtuvo por estimulación eléctrica de los telsons, previa anestesia de los ejemplares con bióxido de carbono, y recogido en cajas de Petri. Una vez seco, se recuperó con agua bidestilada y se centrifugó a 15,000 r.p.m. por 15 min (centrífuga Sorval equipada con un rotor SS-34), liofilizándose inmediatamente el sobrenadante y guardándolo el veneno seco a -20 °C hasta su uso posterior.

El veneno liofilizado (1516.6 mg) se resuspendió en 16 ml de amortiguador de acetato de amonio 0.02 N, pH 4.7, y se aplicó en alícuotas de 2ml a una columna de Sephadex G-50 medio.

### B). SEPARACIONES CROMATOGRAFICAS.

#### a) Exclusión Molecular.

Para este tipo de cromatografías se utilizó Sephadex G-50 medio obtenido de Pharmacia Fine Chemicals (UPPSALA, SWEDEN) hidratado y preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las columnas usadas fueron de 0.9 cm de diámetro por 200 cm de largo, empacadas por gravedad y corridas a presión constante con ayuda de un reservorio de Mariotte.

## B) Intercambio Iónico.

La resina usada para estas cromatografías fue carboximetilcelulosa (CM-32), la cual se obtuvo de Whatman Inc. (Clifton, N.J., U.S.A) y se procesó siguiendo las indicaciones del fabricante. Las columnas (0.9 x 34.5 cm) fueron empacadas con presión de nitrógeno, aproximadamente a una atmósfera de presión, y corridas con una bomba peristáltica tipo Milton Roy de flujo controlado.

Todas las sustancias químicas utilizadas en la elaboración de los amortiguadores fueron de grado analítico.

## C). BIOENSAYOS.

### a) Pruebas de Toxicidad.

La letalidad de los diferentes componentes obtenidos en el proceso de purificación fue probada administrando por vía intraperitoneal concentraciones variables de proteína (40-100 µg/20g) a ratones albinos, cepa CDI.

Las fracciones se consideraron letales si producían la muerte del animal; tóxicas si sólo inducían algún tipo de efecto (sialorrea, disnea, taquicardia, convulsiones, diarrea, etc.) pero no la muerte; y no tóxicos cuando no produjeron efectos detectables, o cuando el comportamiento era semejante a la aplicación de solución salina o de un volumen igual del amortiguador utilizado. Los animales se mantenían en observación por un lapso de 24 hrs.

b) Determinación de la Dosis Letal Media.

Para la determinación de la dosis letal cincuenta se utilizaron 30 ratones hembras, cepa CD1, entre 18 y 20 g de peso corporal, los cuales se dividieron en seis lotes de cinco ratones cada uno. A cada uno de estos lotes se les administró una dosis diferente de la fracción II. Los animales se mantuvieron sin agua y sin alimento durante el transcurso de la determinación. El tiempo de observación fue de 24 horas. El procedimiento estadístico utilizado fue el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

Las concentraciones de proteína, a menos que se especifique lo contrario, se determinaron por densidad óptica, asumiendo que una unidad de absorbancia a 280 nm es igual a 1 mg/ml, medida en una celda de cuarzo de un cm de camino óptico. Ninguno de los amortiguadores fue tóxico en las cantidades administradas.

D). DESALADO DE LAS PROTEINAS.

Para desalar las fracciones obtenidas de las cromatografías de intercambio iónico se utilizaron bolsas de diálisis Spectrapor tipo 3, límite de exclusión de 3,500 Daltons (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, C.A., U.S.A.).

Las diálisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente, contra agua bidestilada (tres cambios), el último cambio contra el amortiguador de corrida del siguiente paso cromatográfico.



## B). DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LAS TOXINAS.

### a) Electroforesis.

Para determinar el número de componentes protéicos se corrieron geles cilíndricos de poliacrilamida en el sistema  $\beta$ -alanina/acetato/urea (Reisfeld y col., 1962), tanto del veneno sin fraccionar como de las diferentes fracciones cromatográficas. Las bandas de proteína se colorearon con azul brillante de Coomassie G-250.

### b) Análisis de Aminoácidos.

Los análisis fueron por duplicado hidrolizando las muestras con HCl 6 N a 110 °C y 0.5 % de fenol ( para protección de tirosinas ) por 24, 48 y 72 hrs. en tubos sellados al vacío. La determinación y cuantificación de los aminoácidos se realizó en un analizador Durrum 500 calibrado en el rango de nanomoles.

### c) Determinación de la Secuencia de Aminoácidos.

Las proteínas homogéneas fueron reducidas y piridiladas, quitando el exceso de reactivos por filtración en gel ( Bio-gel P-30, eluida con ácido acético al 20 % ). La secuencia de aminoácidos se obtuvo por degradación automática de Edman en un secuenciador Beckman modelo 890 M. Los feniltiohidantoíne aminoácidos (PTH aminoácidos) se identificaron por cromatografía líquida de alta presión (Possani y col., 1985).

### III. RESULTADOS

#### A.- SEPARACION POR PESO MOLECULAR.

1516.6 mg del veneno soluble fueron fraccionados en ocho corridas cromatográficas. El veneno se disolvió en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 aplicándose en alícuotas de 2 ml a una columna (0.9 x 200 cm) de Sephadex G-50 equilibrada y eluida con el mismo amortiguador.

El veneno se separó en tres fracciones (I, II y III) siendo la fracción II en la que se encontraron todos los componentes tóxicos ya que las fracciones I y III no fueron tóxicas a mamíferos en las cantidades administradas (94.15 µg, 94.1 µg, 138.1 µg respectivamente). En la Fig. 1 se muestra el perfil cromatográfico de una de las corridas, y en la tabla # 5 se encuentran los porcentajes de recuperación.

Los geles cilíndricos de poliacrilamida mostraron la presencia de por lo menos 13 componentes proteicos en el veneno total y seis bandas de proteína en la fracción II (Fig. 2).

#### B.- SEPARACION POR INTERCAMBIO IONICO.

En vista de que los componentes de la fracción II de Sephadex G-50 son de naturaleza básica y, por lo tanto, están cargados positivamente en las condiciones de corrida, se procesó esta en una columna (0.9 x 34.5 cm) de CN-32 equilibrada con amortiguador de

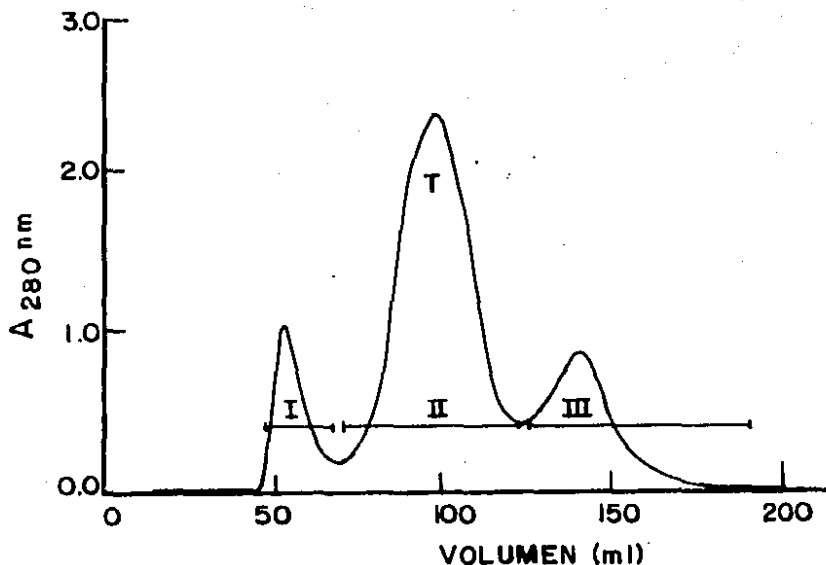


Fig.1: FILTRACION EN SEPHADEX G-50 DEL VENENO TOTAL DE C.l. tecomanus.

En una columna ( 0.9 x 200 cm ) de Sephadex G-50 equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 0.02 M a pH 4.7, se aplicaron 2 ml del veneno soluble de C.l.t. (217.5 U.A.). La velocidad de flujo fue de 25 ml/hr y las fracciones colectadas de 2.5 ml cada una. Las líneas horizontales indican los cortes que se hicieron. El porcentaje de recuperación fue del 97.2 %, correspondiendo el 14.06 % a la fracción I, el 64.11 % a la fracción II y el 19.03 % a la fracción III. T indica cual de las fracciones es tóxica y/o letal a mamíferos. U.A. = Unidades de absorbencia a 280 nm.

280

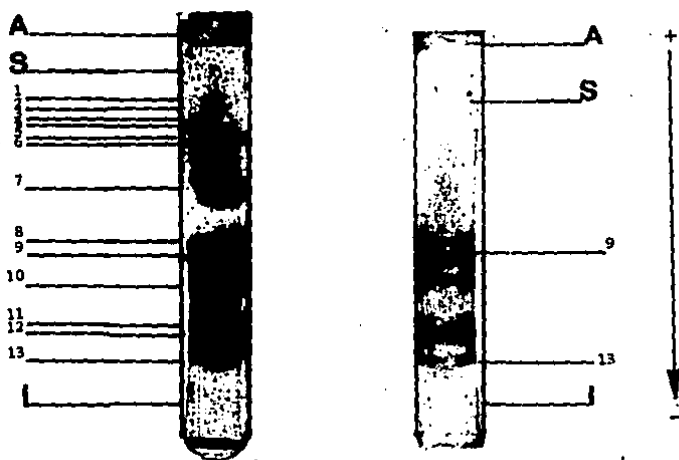
TABLA # 3

RECUPERACION Y LETALIDAD DE LOS COMPONENTES CROMATOGRAFICOS  
OBTENIDOS DE LA COLUMNA DE SEPHADEX G-50 ( Fig. 1 ).

Componente proteico	Cantidad recuperada	% <sup>a</sup> Recuperación	Letalidad <sup>b</sup>	
Veneno soluble	217.5 mg	211.37 mg	97.2	Letal
Fracción I		30.50	14.06	No tóxico
II		139.45	64.11	Letal
III		41.40	19.03	No tóxico

a) Los valores reportados son porcentajes calculados del número de unidades de absorción a 280 nm recuperadas.

b) La letalidad de la proteína fue determinada administrando las diferentes fracciones a ratones albinos CDI de 20 g de peso, generalmente un ratón por pico. El término "no tóxico" significa que los ratones tienen un comportamiento similar a los ratones que fueron tratados con solución salina. "letal" significa que los animales murieron con las dosis inyectadas ( ver la sección de material y métodos pag. 40 ).



**Fig.2: ELECTROFORESIS EN GELES CILINDRICOS DE POLIACRILAMIDA DEL VENENO TOTAL Y LA FRACCION II DE C. limpidus tecomanus.**

Se utilizaron geles cilindricos de poliactilamida en el sistema  $\beta$ -alanina/acetato/urea ( Reisfeld y col., 1962 ). Se aplicaron 100  $\mu$ g de veneno total y 75  $\mu$ g de F II. Las proteínas corren hacia el cátodo en un buffer  $\beta$ -alanina-acético pH 4.42 ( 4 mA/gel ), y se tñieron con azul de Coomassie G-250.

En el gel de veneno total ( V.T ) se aprecian 13 bandas protéicas, seis de las cuales son tenues ( 1,2,3,4,8 y 13 ), cuatro moderadas ( 7,10,11 y 12 ) y tres fuertes ( 5,6 y 9 ).

A = Punto de aplicación; S = gel separador; I = colorante indicador.

acetato de amonio 20 mM (pH 4.7) y se eluyó con un gradiente salino de 0 a 0.4 M de NaCl disuelto en el mismo amortiguador. La cantidad de proteína fraccionada fue de 776.2 mg (peso seco) en un total de nueve cromatografías corridas en las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos fueron altamente reproducibles y para fines ilustrativos se muestra el perfil de una de ellas (Fig. 3).

Con el gradiente salino se separaron 22 fracciones y al lavar la columna con alta fuerza iónica (1 M de NaCl) se obtuvieron las fracciones II.23 y II.24. Mayores detalles sobre las condiciones de corrida aparecen en el pie de la figura. Posteriormente las fracciones análogas de cada corrida fueron mezcladas.

Al probar la toxicidad de cada una de las fracciones obtenidas se encontró que la fracción II.19 es tóxica y las fracciones II.20, 21, 22 y 23 son letales a mamíferos, mientras que la fracción # 24 no tiene actividad alguna en ellos (Tabla # 6).

Considerando a las fracciones letales más importantes se procedió a la purificación de sus componentes.

#### C.- PURIFICACION DE LA TOXINA II.20.3 (Componente tóxico mayor).

La fracción más importante en cuanto a concentración fue la No. II.20, razón por la cual se inició la purificación con este componente.

Para la purificación de esta toxina se tuvo que recurrir a

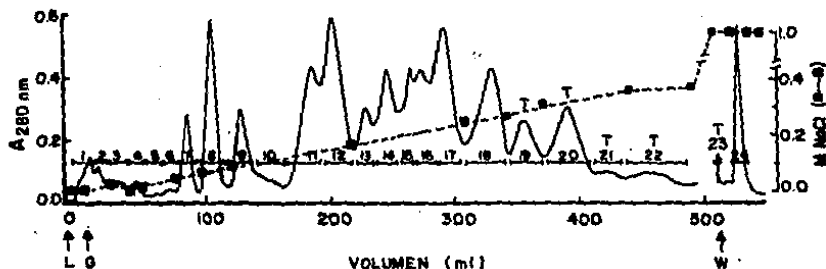


Fig.3: CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION II DE SEPHADEX 0-50.

5 ml de la fracción II ( 143 U.A ) se aplicaron a una columna (0.9 x 35.4 cm) de CN-32 equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 20 mM a pH 4.7. La columna se eluyó con un gradiente salino de 0 (250 ml) a 0.4 (250 ml) M de NaCl en el mismo amortiguador, la velocidad de flujo fue de 30 ml/hr y las fracciones colectadas fueron de 2.5 ml cada una.

Las barras indican los cortes que se hicieron. L es el cargado de la columna, G es el inicio del gradiente, W indica el lavado de la columna con alta fuerza iónica (1 M de NaCl) y T denota las fracciones tóxicas y letales a ratón.

TABLA N 6

RECUPERACION Y LETALIDAD DE LOS COMPONENTES PROTEICOS DE LA FRACCION II

Columna usada	Componente protéico	% Recuperación	a	b Letalidad
CNC-32	Fracción II	142.8 mg	100	Letal
	Fracción II.1		1.56	No tóxico
	II.2		0.80	No tóxico
	II.3		0.60	No tóxico
	II.4		0.27	No tóxico
	II.5		0.13	No tóxico
	II.6		0.14	No tóxico
	II.7		2.23	No tóxico
	II.8		5.70	No tóxico
	II.9		3.89	No tóxico
	II.10		1.55	No tóxico
	II.11		4.87	No tóxico
	II.12		11.40	No tóxico
	II.13		4.77	No tóxico
	II.14		6.78	No tóxico
	II.15		8.13	No tóxico
	II.16		4.37	No tóxico
	II.17		8.29	No tóxico
	II.18		9.82	No tóxico
	II.19		4.79	Tóxico
	II.20		6.62	Letal
	II.21		1.92	Letal
	II.22		3.63	Letal
II.23		0.54	Letal	
II.24		3.72	No tóxico	
Proteína recuperada		138.10 mg	96.90	

a y b tienen el mismo significado que en la tabla anterior.



dos pasos cromatográficos adicionales de intercambio iónico. La mezcla de la fracción II.20 se dializó contra amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM (pH 6) y se aplicó a una columna de carboximetilcelulosa equilibrada con el mismo amortiguador y se separó con un gradiente salino de 0 a 0,5 M de NaCl (ver Fig. 4 y cuadro # 4).

De los cinco componentes separados sólo uno fue tóxico a ratón. Dado que la electroforesis de la fracción II.20.3 (letal) mostró dos bandas proteicas, se procedió a un tercer paso cromatográfico, ahora en amortiguador de acetato de amonio 75 mM a pH 5.8 logrando de esta manera obtener la proteína en forma homogénea (ver Figs. 5 y 6).

La cantidad de proteína homogénea recuperada fue de 13 mg, esta proteína es el componente tóxico más abundante de la fracción II - (ver tabla # 7).

#### D.- SEPARACION DEL COMPONENTE TOXICO II.19.

El componente tóxico II.19, de importancia mediana en cuanto a su concentración relativa en el veneno separado en la columna de CM-celulosa a pH 4.7 (Fig. 3) fue sometido a cromatografía en amortiguador de fosfatos, 50 mM, pH 6.0, como lo demuestra la Fig. 7.

De los cinco componentes de la fracción II.19 sólo uno fue tóxico a mamíferos (F-II.19.5, ver cuadro # 4) y utilizando el sistema de electroforesis de Reisfeld (1962), mencionado en la Fig. 6, se obtuvo una sola banda (ver adelante Fig. 8).

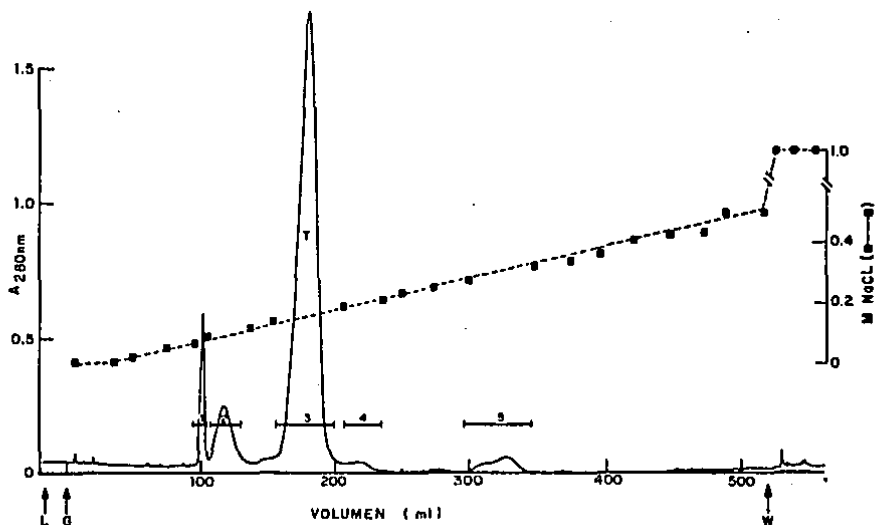


Fig.4: CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION II.20.

36.1 mg de la fracción II.20 se aplicaron en una columna (0.9 x 35.4 cm) de CN-32, eluyendose la columna con un gradiente lineal de fosfatos de potasio 50 mM, pH 6, y cloruro de sodio 0.5 M disuelto en el mismo amortiguador ( 250 ml para cada uno ). La velocidad de flujo fue de 30 ml por hora y se colectaron fracciones de 2.5 ml cada una. L, G, U, y T tienen el mismo significado que en la figura 2, y las barras corresponden a subfracciones. Los porcentajes de recuperación se encuentran en la tabla número 7.

CUADRO # 4  
TABLA DE TOXICIDAD

Fracción	µl	µg	síntomas	toxicidad
II.19.1	150	51.6		No tóxico
II.19.2	100	99.2		No tóxico
II.19.3	200	51.8		No tóxico
II.19.4	200	32.4		No tóxico
II.19.5	200	26.2	salivación, apnea	Letal
II.20.1	150	58.65		No tóxico
II.20.2	200	42.6		No tóxico
II.20.3	150	100.7	disnea, convulsiones	Letal
II.20.4	200	11.2		No tóxico
II.21.3	100	36.5	salivación, convulsiones	Letal
II.21.5	150	27.3	salivación, disnea	Tóxico
II.21.6	200	10.4		No tóxico
II.21.7	200	8.0		No tóxico
II.21.8	200	17.8	salivación	Tóxico
II.21.9	200	10.4	salivación	Tóxico
II.21.10	100	27.4		No tóxico
II.22.1	200	22		No tóxico
II.22.2	200	9.8	convulsiones, salivación	Letal
II.22.3	200	44.4	convulsiones, salivación	Letal
II.22.4	200	34.8	convulsiones, salivación	Letal
II.22.5	200	11.6	convulsiones, salivación	Letal

Continuación cuadro # 4.

II.22.6	200	10.65		No tóxico
II.23.1	200	15.0	salivación,convulsiones	Letal
II.23.2	200	12.2	convulsiones	Tóxico
II.23.3	200	168	comezón,salivación	Tóxico
II.23.4	200	142.4	salivación	Tóxico
II.23.5	200	114		No tóxico

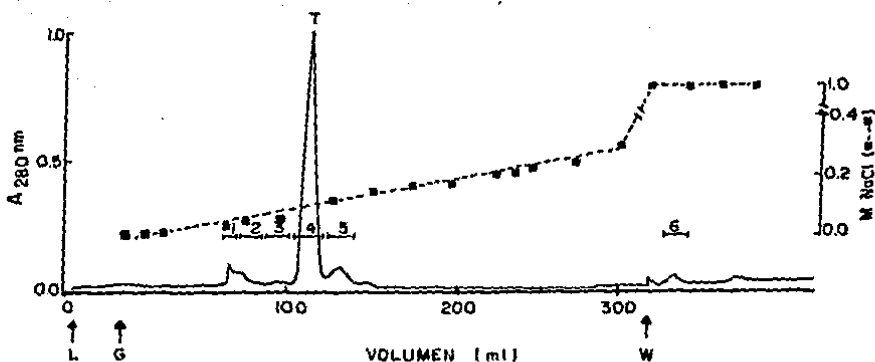


Fig.5: PURIFICACION DE LA TOXINA 11.20.3.4.

El componente tóxico de la figura 4 se aplicó a una columna de CM-32 equilibrada con acetato de amonio 0.075 N (pH 5.8). El volumen total cargado fue de 29 ml con una concentración de proteína, por densidad óptica, de 10 mg. La columna se eluyó con un gradiente salino de 0 a 0.3 N (150 ml para cada uno) de NaCl en el mismo amortiguador. La velocidad de flujo fue de 30 ml/hr y las fracciones colectadas de 2.5 ml cada una. L, U y T tienen el mismo significado que en las figuras anteriores. Las barras indican las subfracciones y la recuperación total fue del 89.69% (ver tabla número 7).

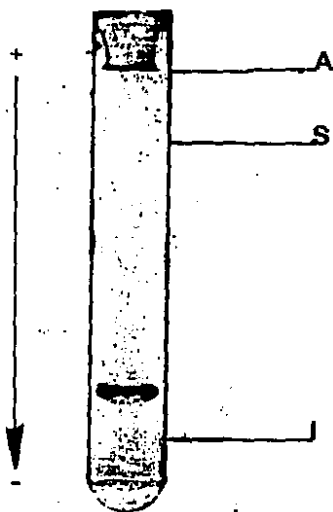


Fig.6: ELECTROFORESIS DE LA FRACCION II.20.3.4.

50  $\mu$ g de la proteína se corrieron en un gel cilíndrico de poliacrilamida ( 5.5 cm, 4 mA ) conteniendo 10 M de urea, en buffer de  $\beta$ -alanina y teñido con azul brillante de Coomassie, observándose una sola banda la cual corresponde a la proteína homogénea.

A = Punto de aplicación de la muestra, S = indica el gel de corrimiento, I , señala el colorante indicador.

TABLA N 7

RECUPERACION Y TOXICIDAD DE LOS COMPONENTES OBTENIDOS DE LAS COLUMNAS DE CARBOXIMETILCELULOSA EN FOSFATOS DE POTASIO Y ACETATO DE AMONIO.

Componente Protéico	Cantidad Recuperada mg	%	
		Recuperación	Letalidad
Fracción II.19	32.98	100	letal
II.19.1	1.78	5.3	no tóxico
II.19.2	10.94	33.17	no tóxico
II.19.3	2.97	9.00	no tóxico
II.19.4	2.31	7.00	no tóxico
II.19.5	2.56	7.76	letal
Tubos laterales	7.75	23.49	
Total	28.31	85.92	
Fracción II.20	36.1	100	letal
II.20.1	1.99	5.51	no tóxico
II.20.2	1.74	4.81	no tóxico
II.20.3	24.88	68.91	letal
II.20.4	0.41	1.13	no tóxico
II.20.5	1.40	3.87	no tóxico
Tubos laterales	1.96	5.42	
Total	32.38	89.69	

TABLA # 7 (continuación)

Fracción	11.20.3	10.40	100	letal
	11.20.3.1	0.42	4.03	no tóxico
	11.20.3.2	0.39	3.75	no tóxico
	11.20.3.3	0.75	7.21	no tóxico
	11.20.3.4	7.67	73.75	letal
	11.20.3.5	0.88	8.46	no tóxico
	11.20.3.6	0.27	2.59	no tóxico
<b>Total</b>		<b>10.38</b>	<b>99.80</b>	
Fracción	11.21	22.80	100	letal
	11.21.1	1.62	7.1	no tóxico
	11.21.2	0.68	2.9	letal
	11.21.3	3.85	16.8	letal
	11.21.4	2.03	8.9	letal
	11.21.5	5.80	25.4	letal
	11.21.6	1.11	4.86	no tóxico
	11.21.7	0.79	3.46	no tóxico
	11.21.8	1.73	7.58	tóxico
	11.21.9	0.92	4.03	tóxico
	11.21.10	0.56	2.45	no tóxico
<b>Tubos laterales</b>		<b>2.15</b>	<b>9.42</b>	
<b>Total</b>		<b>21.24</b>	<b>93.15</b>	



TABLA # 7 (continuación)

Fracción 11.22	22.3	100	letal
11.22.1	3.33	14.93	no tóxico
11.22.2	1.02	4.57	letal
11.22.3	1.36	6.09	no tóxico
11.22.4	8.79	39.41	letal
11.22.5	0.95	4.26	letal
11.22.6	0.81	3.63	no tóxico
11.22.7	1.25	5.60	no tóxico
Tubos laterales	2.35	10.53	
Total	19.86	89.05	
Fracción 11.23	13.00	100	letal
11.23.1	2.68	20.6	tóxico
11.23.2	2.16	16.6	tóxico
11.23.3	1.74	13.3	tóxico
11.23.4	1.34	10.3	tóxico
11.23.5	1.36	10.46	no tóxico
Total	9.28	71.30	

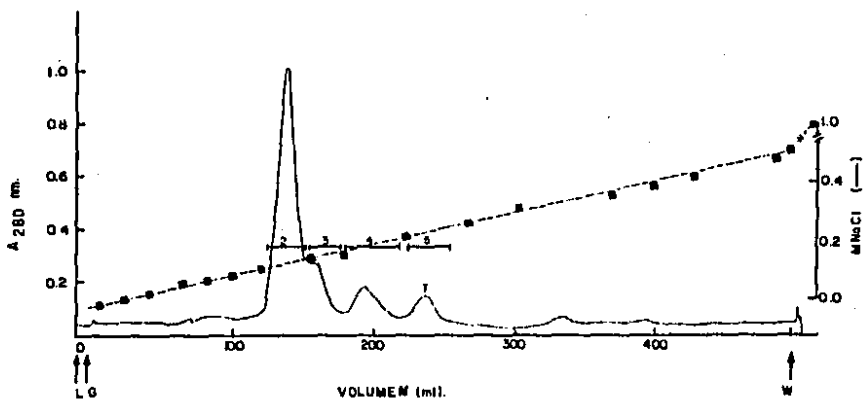
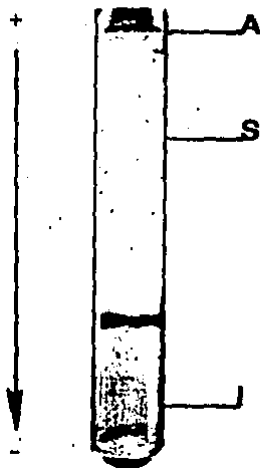


Fig.7: SEPARACION CRONATOGRAFICA DE LA FRACCION II.19.

170 ml de la fracción II.19, conteniendo 32.9 mg de proteína se aplicaron en una columna de CH-32 equilibrada con amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM, pH 6. Las condiciones de corrida fueron similares a las de la figura 4, sólo que la velocidad de flujo fue de 27 ml/hr. El rendimiento total fue del 85.9 % y el 7.76 % corresponde a la fracción II.19.5 (ver tabla 7).



**Fig.8: ELECTROFORESIS DE LA FRACCION II.19.5.**

50  $\mu$ g de la proteina se aplicaron en un gel cilíndrico de poliacrilamida y se corrió siguiendo la metodología de la figura No. 6.

A,S,I tienen el mismo significado de la fig. 2.

#### E.- SEPARACION DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCION II.21.

La mezcla de la fracción II.21 se dializó contra amortiguador de fosfatos de potasio y se aplicó en una columna de CM-32. La columna se eluyó con un gradiente salino de 0 - 0.5 M de NaCl logrando así separar nueve componentes, cuatro de los cuales fueron tóxicos a mamíferos ( ver cuadro # 4, pag. 52). Con alta fuerza iónica se separó otro componente más, el cual no posee actividad tóxica en estos organismos (mayores detalles de las condiciones de corrida se encuentran en el pie de la Fig. 9 ).

La electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida señaló que dos de las fracciones se encontraban puras, es decir, una sola banda protéica en cada gel. Una de ellas tóxica (F-II.21.4) y la otra sin actividad (II.21.6) (ver Fig. 10).

#### F.- PURIFICACION DE LA FRACCION II.22.5.

Entre los llamados componentes tóxicos menores del veneno está la fracción II.22. Esta fracción se procesó de la misma manera que la fracción II.21. Con el gradiente salino se separaron siete componentes de los cuales tres fueron tóxicos a mamíferos (ver cuadro # 4, pag. 52) y de estos sólo se encontró en forma homogénea la fracción II.22.5 (ver Figs. 11 y 12).

#### G.- PURIFICACION DE LAS FRACCIONES II.23.4 y II.23.5.

También el componente II.23 es parte de los componentes

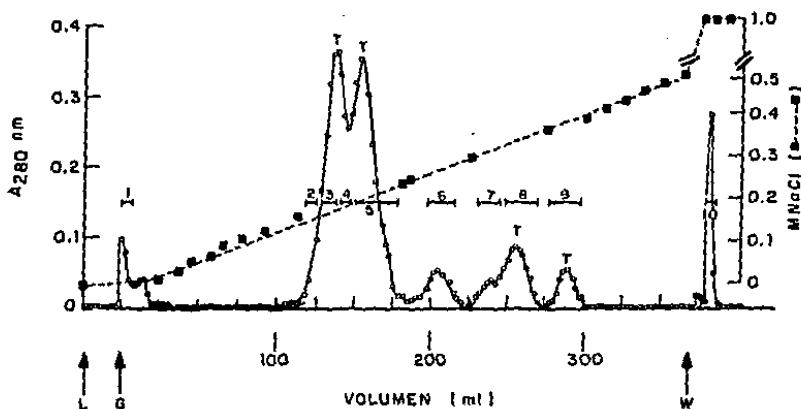
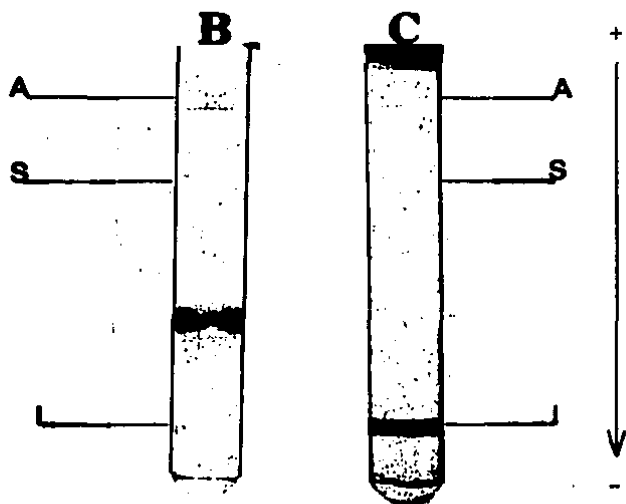


Fig. 9: CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION II.21.

En una columna ( 0,9 x 35,4 cm ) de carboximetilcelulosa equilibrada con amortiguador de fosfatos de potasio 0.05 M a pH 6, se aplicaron 22.8 mg ( 240 ml x 0.095 U.A. ) de la fracción II.21 del veneno de *C. l. teocomanus*. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 0 (250 ml) a 0.5 (250 ml) M de cloruro de sodio en el mismo amortiguador. La velocidad de flujo fue de 30 ml/hr y se colectaron fracciones (160 en total) de 2.5 ml cada una. El rendimiento total fue del 93.3 %. El 8.9 % correspondió a la fracción II.21.4 y el 4.9 % a la fracción II.21.6 (ver tabla número 7 para porcentaje de recuperación). Las flechas, G, L, W y T tienen el mismo significado que en la figura número 3.



**Fig. 10: ELECTROFORESIS EN GELBS CILINDRICOS DE POLIACRILAMIDA DE LAS FRACCIONES II.21.4 y II.21.6.**

Se aplicaron 50  $\mu$ g de proteina en cada gel y se corrieron en condiciones similares a las de la fig. 2. A,S,I tienen el mismo significado que en las electroforesis anteriores. B es la fracción II.21.4 y C es la fracción II.21.6.

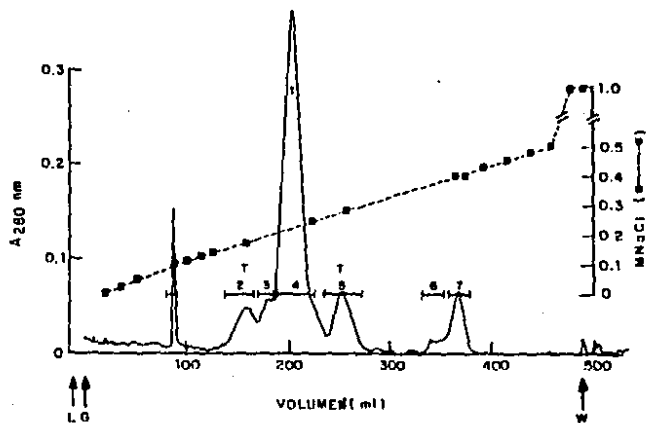


Fig. 11: CROMATOGRAFIA EN CARBOXIMETILCELULOSA DE LA FRACCIÓN II.22.

22.32 mg de la fracción II.22 (280 ml x 0.079 U.A.) se aplicaron en una columna de CM-32 en las mismas condiciones de corrida que en la Fig. No. 7. El rendimiento total de la columna fue del 89.05 % siendo la fracción II.22.5 el 4.26 % de la Fracción II.22.

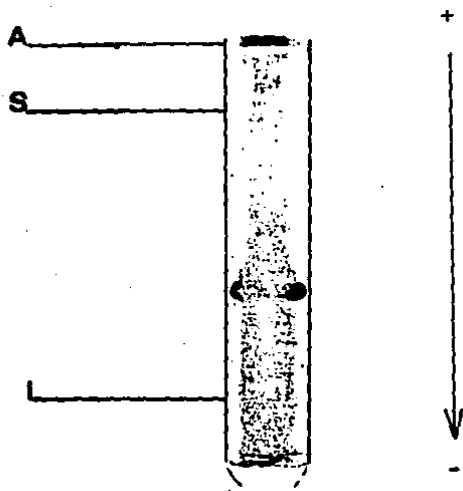


Fig. 12: ELECTROFORESIS DE LA FRACCION 11.22.5.

Se aplicaron en el gel 50  $\mu$ g de la proteina y se siguieron condiciones semejantes a las de la figura número 2. El significado de A, S, I es el mismo que en las electroforesis anteriores.



tóxicos que se encuentran en bajas concentraciones en el veneno. Para esta fracción se realizó la misma estrategia de purificación que para las fracciones 11.21 y 11.22. Con el gradiente salino se lograron separar cinco componentes, cuatro de los cuales fueron tóxicos a mamíferos (ver cuadro # 4, pag. 52), pero sólo la fracción 11.23.4 se encontró en forma homogénea. El último de los componentes, la fracción 11.23.5 no es tóxica en ratón pero la electroforesis en geles cilíndricos mostró un solo componente protéico (Ver Figs. 13 y 14).

#### H.- DOSIS LETAL MEDIA.

El valor de la dosis letal media para la fracción 11 obtenido por el método estadístico de Litchfield y Wilcoxon fue de 9.1  $\mu\text{g}/20$  g de ratón, esto es, 0.45 mg/kg de peso (ver cuadro 1, pag. 67).

#### I.- CARACTERIZACION QUIMICA DE LOS COMPONENTES PUROS.

Una vez obtenidas las toxinas en forma homogénea se inició su caracterización química, y el primer paso fue someterlas a hidrólisis ácida para determinar su composición de aminoácidos.

Los resultados de los análisis de aminoácidos son preliminares ya que para algunas fracciones faltan los datos de hidrólisis a 48 y 72 hrs, así como la determinación de cisteínas (para algunas) y triptófanos para todas (ver Tablas 8-11).

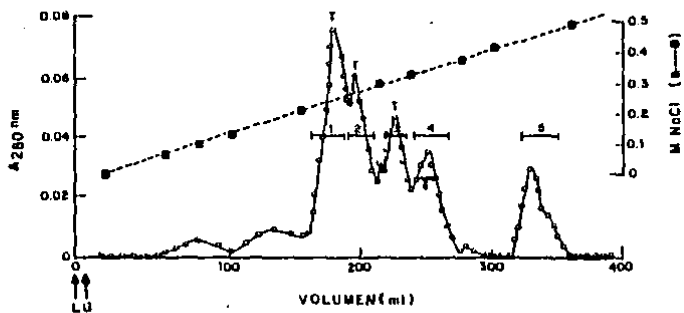
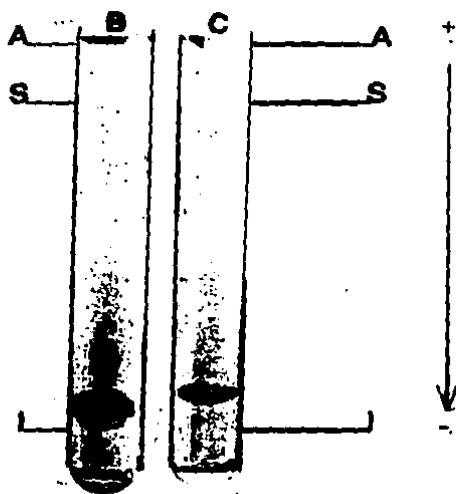


Fig. 13: PATRON CROMATOGRAFICO DE LA FRACCION II.23.

13.2 mg (180 ml x 0.072 U.A.) de la fracción II.23 fueron procesados en las mismas condiciones de corrida que en la figura número 11 sólo que la velocidad de flujo fue de 40 ml/hr. Los porcentajes de recuperación se encuentran en la tabla número 7.



**Fig. 14: ELECTROFORISIS EN GELES CILINDRICOS DE POLIACRILAMIDA DE LA FRACCION II.23.4 Y II.23.5**

La cantidad de protefna aplicada y las condiciones de corrida son similares a las de la figura número 6. A,S,I tienen el mismo significado de las electroforesis anteriores, B es la fracción II.23.4 y C es la fracción II.23.5.

CUADRO No. 1

DOSIS LETAL MEDIA DE LA FRACCIÓN II DE C.I. tecomanus.

No. de lotes: 6

No. de ratones por lote: 5

Cepa: CDI

Peso y sexo: 18 a 20 g, hembras.

DOSIS $\mu\text{g}/20 \text{ g}$	animales con efecto/ animales probados	% anima- les con efecto	% de efecto esperado	% efecto observado menos % e.esperado	2 (CH)
5.0	0/5				
6.6	0/5	7	13	6	0.03
8.0	2/5	40	32	8	0.03
10.0	3/5	60	62	2	0.002
15.0	5/5	95.6	96	0.4	-
20.0	5/5				

DE50 = 9.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( 7.4 - 11.1 )  
Límites de confianza.

TABLA # 8

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA TOXINA 11.20.3.4

Aminoácido	20 hrs	48 hrs	72 hrs
Asx	5.30 (5)	5.09 (5)	5.00 (5)
Tre	3.19 (3)	2.96 (3)	3.01 (3)
Ser	3.88 (4)	3.54 (4)	3.46 (3)
Glx	7.63 (8)	7.30 (7)	7.75 (8)
Pro	( - )	( - )	( - )
Gli	8.34 (8)	8.06 (8)	8.00 (8)
Ala	3.94 (4)	3.67 (4)	3.79 (4)
Val	2.65 (3)	2.82 (3)	2.81 (3)
Met	( - )	( - )	( - )
Ile	0.27 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
Leu	4.71 (5)	4.28 (4)	4.43 (4)
Tir	6.04 (6)	5.45 (5)	5.79 (6)
Pen	2.05 (2)	1.79 (2)	1.93 (2)
His	2.42 (2)	2.72 (3)	2.52 (3)
Lis	5.00 (5)	5.00 (5)	5.30 (5)
Arg	1.43 (1)	1.29 (1)	1.32 (1)
Cis	N.D.	N.D.	N.D.
Trp	N.D.	N.D.	N.D.

a) residuos/mol basados en Lis = 5 para 20 hrs, Lis = 5 para 48 hrs. y Asx = 5 para 72 hrs.

b) N.D. no determinado. (-)=trazas.

c) Los números entre paréntesis representan el número entero más próximo.

TABLA # 9

## COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA TOXINA II.21.4.

Aminoácido	24 hrs	48 hrs	72 hrs	Cis
Asx	5.00 (5)	5.00 (5)	4.90 (5)	5.00 (5)
Tre	2.78 (3)	2.64 (3)	2.75 (3)	2.45 (2)
Ser	6.81 (7)	5.99 (6)	6.38 (6)	6.25 (6)
Glx	5.10 (5)	5.08 (5)	5.00 (5)	4.88 (5)
Pro	2.70 (3)	3.48 (3)	1.89 (2)	1.57 (2)
Gli	6.68 (7)	6.78 (7)	6.70 (7)	6.95 (7)
Ala	3.29 (3)	3.40 (3)	3.32 (3)	3.28 (3)
Val	2.18 (2)	2.49 (2)	2.42 (2)	1.77 (2)
Met	( - )	( - )	( - )	( - )
Ile	1.41 (1)	1.54 (1-2)	1.50 (1-2)	0.58 (1)
Leu	3.39 (3)	3.43 (3)	3.36 (3)	2.56 (3)
Tir	6.30 (6)	6.84 (7)	6.73 (7)	( - )
Fen	2.00 (2)	2.17 (2)	2.15 (2)	1.67 (2)
His	2.14 (2)	2.11 (2)	2.19 (2)	2.59 (3)
Lis	6.25 (6)	6.40 (6)	6.19 (6)	6.02 (6)
Arg	1.13 (1)	1.32 (1)	1.22 (1)	1.14 (1)
Cis	N.D.	N.D.	N.D.	8.13 (8)
Trp	N.D.	N.D.	N.D.	

a) residuos/mol basados en Asx = 5 en 24,48 hrs y ácido cistéico (cis).

b) N.D. no determinado.

c) Los números entre paréntesis representan el número entero más próximo.

d) (-)=trazas.

TABLA # 10

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA TOXINA 11.21.6

Aminoácido	20 hrs	24 hrs	Cis
Asx	6.33 (6)	7.00 (7)	8.35 (8)
Tre	1.81 (2)	2.03 (2)	1.85 (2)
Ser	5.43 (5)	6.33 (6)	5.92 (6)
Glx	4.98 (5)	5.54 (6)	5.21 (5)
Pro	( - )	( - )	( - )
Gli	5.57 (6)	5.73 (6)	6.00 (6)
Ala	2.89 (3)	3.04 (3)	3.02 (3)
Val	( - )	0.75 (1)	( - )
Met	0.71 (1)	0.97 (1)	( - )
Ile	1.21 (1)	1.53 (2)	0.64 (1)
Leu	0.39 (0)	0.48 (0)	0.20 (0)
Tir	3.58 (4)	3.88 (4)	( - )
Fen	2.11 (2)	2.51 (2-3)	0.91 (1)
His	1.45 (1)	1.95 (2)	2.77 (3)
Lis	7.00 (7)	7.95 (8)	7.58 (8)
Arg	3.22 (3)	3.81 (4)	3.42 (3)
Cis	N.D.	N.D.	11.95 (12)
Trp	N.D.	N.D.	N.D.

a) residuos/mol basados en Lis = 7 para 20 hrs, Asx = 7 para 24 hrs.  
y Gli=6 para ácido cistérico (Cis).

b) N.D. = No determinado. (-)=trazas.

c) Los números entre paréntesis representan el No. entero más próximo.

TABLA # 11

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE TOXINAS DEL VENENO DE C.l.t.

Aminoácido	F-II.19.5	F-II.22.5	F-II.23.5
Asx	5.18 (5)	4.00 (4)	8.12 (8)
Tre	1.04 (1)	2.26 (2)	3.18 (3)
Ser	5.38 (5)	5.45 (5)	5.86 (6)
Glx	4.00 (4)	5.17 (5)	2.39 (2)
Pro	( - )	1.79 (2)	4.10 (4)
Gli	7.28 (7)	6.32 (6)	5.49 (5)
Ala	2.99 (3)	3.01 (3)	3.09 (3)
Val	0.72 (1)	1.62 (2)	1.28 (1)
Met	0.38 (0)	0.18 (0)	0.00 (0)
Ile	0.41 (0)	2.29 (2)	1.41 (1)
Leu	0.55 (1)	2.34 (2)	0.5 (1-2)
Tir	0.99 (1)	3.13 (3)	3.82 (4)
Fen	1.54 (2)	0.92 (1)	( - )
His	0.64 (1)	1.21 (1)	1.00 (1)
Lis	4.56 (5)	3.61 (4)	4.26 (4)
Arg	1.38 (1)	3.7 (4)	3.35 (3)
Cis	N.D.	N.D.	N.D.
Trp	N.D.	N.D.	N.D.

a) residuo/mol. basado en Glx = 4 para la F-II.19.5, Asx = 4 para la F-II.22.5 y His = 1 para la F-II.23.5.

b) N.D. No determinado. (-)=trazas.

c) Los números entre paréntesis representan el No. entero más próximo al residuo/mol.



De los análisis de aminoácidos se desprende que de las fracciones tóxicas, la fracción II.19.5 parece ser una toxina de cadena corta (aproximadamente 4000 de peso molecular), mientras que las fracciones II.20.3.4, II.21.4 y II.22.5 parecen pertenecer al grupo de las toxinas de cadena larga (61-70 aminoácidos). Las fracciones no tóxicas (II.21.6 y II.23.5) parecen ser, por análisis de aminoácidos, péptidos de cadena larga (aproximadamente 7000 de peso molecular) (ver tabla # 12, pag.75).

La fracción II.21.6 presenta una metionina y 12 residuos de cisteína lo cual nos daría seis puentes disulfuro, ambas características la excluyen de la generalidad de las otras toxinas.

El segundo paso en la caracterización química fue la determinación de la estructura primaria. Esta parte fue llevada a cabo en el laboratorio del Dr. Brian M. Martin, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (U.S.A) con el cual personal de nuestro laboratorio ha colaborado activamente en esta tarea en los últimos seis años.

Por las cantidades tan bajas que se obtienen de los péptidos en forma homogénea sólo se pudieron secuenciar parcialmente las fracciones II.20.3, II.21.4 y II.22.5. Las toxinas fueron reducidas, piridiladas y sometidas a una degradación automática de Edman, identificándose los PTH aminoácidos por cromatografía líquida de alta presión.

De la fracción II.20.3.4 se identificaron 65 aminoácidos (ver cuadro II), casi la secuencia total, faltando por identificar

TABLA N 12

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS TOXINAS DE *C.l.tecomanus*

AA	II.9.3 <sup>N</sup>	II.19.5	II.20.3.4	II.21.4	II.22.5	II.23.5
Asx	3	5	5	5	3	8
Tre	3	1	3	3	2	3
Ser	2	5	4	7	4-5	6
Glx	7	4	7-8 &	5	4	2
Pro	2	T	2	3	1	4
Gli	8	7	8	7	5	5
Ala	3	3	4	3	2	3
Val	3	1	3	2	1	1
Met	0	T	T	T	T	T
Ile	1	T	T	1-2	2	1
Leu	4	0-1	4-5	3	2	0-1
Tir	6	1	6	7	2-3	4
Fen	2	1-2	2	2	1	T
His	2	1	2-3	2	1	1
Lis	6	4-5	5 &	6	3	4
Arg	2	1	2 &	1	3	3
Cis	8	ND	8	8	ND	ND
Trp	1	ND	ND	ND	ND	ND

N Tomada de Possani y cols. 1990.

& Datos tomados de la secuencia.

T Trazas.

ND No determinado.



sólo tres aminoácidos de la posición C-terminal. De la fracción II.21.4 a pesar de presentar una sola banda en geles de poliacríamida al ser sometida la molécula a degradación presentó dos secuencias, lo cual nos indica que realmente no se encontraba en forma pura (ver cuadro III), y de la fracción II.22.5 se lograron identificar 30 residuos, el N-terminal (ver cuadro III).

De la comparación de los N-terminal de las toxinas II-20.3.4 y II-22.5 se detecta una elevada homología ya que de los 30 primeros aminoácidos determinados 24 son idénticos y son cinco las regiones conservadas en esta parte de la molécula (ver fig. 15, pag.79).



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

	1	5	10
II.20.3.4	Lis- Glu- Gli- Tir-	Leu-	Val- Asn- His- Ser- Tre-
II.22.5	Lis- Glu- Gli- Tir-	Ile-	Val- Asn- Tir- His- Tre-

	15	20
II.20.3.4	Gli- Cis- Lis- Tir- Glu- Cis- Fen-	Lis- Leu- Gli-
II.22.5	Gli- Cis- Lis- Tir- Tre-	Cis- Ala- Lis- leu- Gli-

	25	30
II.20.3.4	ASP- Asn- Asp- Tir- Cis- Leu- Arg- Glu- Cis-	Arg-
II.22.5	Asp- Asn- Asp- Tir- Cis- Leu- Arg- Glu- Cis-	Lis-

Fig. 15. COMPARACION DE LAS SECUENCIAS N-TERMINAL DE LAS TOXINAS  
II.20.3.4 y II.22.5 DEL VENENO DE C.l. teomanus.

Los aminoácidos fuera de los cuadros son aquellos que diferencian una toxina de la otra, el resto de las secuencias son homólogas.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran que el veneno del C.l.tacomanus esta constituido por lo menos de 24 fracciones, de las cuales, exceptuando la última, a partir de la fracción 19, todas son tóxicas a mamíferos.

El número de bandas observadas al fraccionar el veneno en un gel de poliacrilamida es de 13, lo cual indica que algunas de las bandas, sobre todo las de naturaleza alcalina, poseen más de un componente protéico; esto es, que varios de los péptidos que contiene el veneno tienen características fisicoquímicas similares y migran conjuntamente en el gel.

Comparando el patrón electroforético de este veneno con el de otros venenos del género Centruroides, como el del C.l.limpidus (10 componentes) o el del C. noxius (12 componentes) o el del C.elegans (10-12 componentes protéicos), es el veneno que más componentes presenta (Bent y cols., 1982; Guzmán, 1983; Ramirez y cols., 1979).

Los venenos no sólo presentan diferencias en el corrimiento electroforético también difieren en los patrones cromatográficos. El veneno del C.l.limpidus al ser pasado por Sephadex G-50 medio en acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, se separa en 4 componentes, mientras que el veneno del C. noxius y del C.l.tacomanus en las mismas condiciones de corrida se separa en tres componentes. Sin embargo, hay que señalar un punto relevante y es que en todas estas especies la

fracción II es la que posee todos los componentes tóxicos y que en todas ellas corresponde entre un 60-70 % del veneno total. La dosis letal media determinada para la fracción II fue de 0.45 mg/kg y para el veneno total fue de 0.65 mg/kg. La toxicidad de este veneno es muy similar a la del veneno del C.l.limpidus, cuya dosis letal media es de 0.61 mg/kg. En comparación con el C. noxius es menos tóxico, ya que la DL50 de este es de 0.26 mg/kg, pero es más tóxico que el T. serrulatus cuya dosis letal media es de 1.25 mg/kg (Possani y cols., 1977 y 1980; Guzmán, 1984).

En este trabajo, tomando en cuenta los resultados reportados por Possani y cols. (1980) (ver resumen, pag 17) de la caracterización del veneno del C.l.tecomanus, se decidió trabajar con el veneno obtenido por estimulación eléctrica de los telsons, ya que además de rendir mejores resultados en la purificación se evita la contaminación con proteínas de alto peso molecular, problema inherente cuando se trabaja con el homogenado de los telsons. También se determinó la estrategia general de purificación: un paso cromatográfico por filtración en gel, seguido por uno, dos y hasta tres pasos cromatográficos de intercambio iónico en CM-32.

La obtención de un mayor número de componentes al fraccionar el pico tóxico (F-II) no puede atribuirse sólo al incremento de volumen del gradiente (de 200 a 250 ml por vaso), ni tampoco a la cantidad de veneno aplicada (2 veces más) que en un momento dado permite ver los componentes que se encuentren en muy baja concentración.



Ambas condiciones, al igual que el tamaño de la columna, las condiciones de corrida y la preparación de las resinas, favorecen, pero no determinan la resolución de la columna.

Con respecto a la purificación de los componentes tóxicos, se lograron obtener en forma homogénea en el segundo paso cromatográfico de intercambio iónico las fracciones II.19.5, II.21.4 y II.22.5 (ver resultados), mientras que para obtener la fracción II.20.3.4 en forma pura fue necesario un tercer paso cromatográfico en CNC (ver tablas 6 y 7, pags. 49 y 56-58 para datos de recuperación y toxicidad).

En el segundo paso cromatográfico de intercambio iónico se podría esperar un componente tóxico principal y, quizá, otro componente tóxico de menor importancia. Sin embargo, los cromatogramas de las fracciones II.21, II.22 y II.23 muestran que los componentes tóxicos encontrados son en número de cuatro; esto no quiere decir que realmente existan cuatro toxinas diferentes, lo que creemos que está sucediendo es que no hay una buena resolución de las fracciones y que el componente principal está contaminando los picos no tóxicos. Por ejemplo, en el caso de la fracción II.21, si se analizan conjuntamente los datos de toxicidad (cuadro # 4, pag. 52) con el cromatograma (Fig. 9, pag. 62) se puede pensar que el componente que tiene la actividad biológica es el primer pico (F-II.21.2, 21.3 y 21.4) y que el segundo pico (F-II.22.5) es tóxico por contaminación del primero. Esto se ve apoyado por los resultados de experimentos posteriores en los cuales se probaron concentraciones más altas de las fracciones II-21.8 y II-21.9

para determinar claramente su toxicidad y se encontró que la primera es letal y la segunda no tiene actividad biológica en mamíferos.

El análisis de aminoácidos, primer paso de la caracterización química de una toxina, dejó entrever que casi todo estos péptidos son de cadena larga (61-70 aminoácidos). Aunque a las fracciones II-19.5 y II-22.5 se les determinaron 34-37 y 36-38 residuos/mol, respectivamente, lo que las clasificaría dentro del grupo de péptidos de cadena corta, todavía faltan las determinaciones de ácido cistéico y triptofano así como las hidrólisis a 48 y 72 hrs, lo que completaría el análisis e incrementará el número de aminoácidos.

De los análisis de aminoácidos se desprende que estos polipéptidos poseen alto contenido en tirosina, lisina y cisteína (5-10) y un bajo contenido en fenilalanina e histidina (1-2), lo cual está en concordancia con los datos de la literatura.

Un dato curioso es la cantidad de ácido cistéico determinado para la fracción II-21.6 (12 residuos/mol). Con la concentración encontrada se pueden formar seis puentes de disulfuro, dos más de los generalmente reportados para las toxinas de alacrán (Kopeyan y cols., 1974; Fontacilla-Camps y cols., 1980; Possani y cols., 1982); presenta, además, una metionina que como ya se mencionó en la introducción es un aminoácido raro en estos péptidos.

Si se compara el análisis de aminoácidos de la fracción II-9.3 reportada por Possani (1980) con el de la fracción II.20.3.4 (ver tabla # 12, pag. 75) se puede observar que no son estrictamente i-

guales, pero que la diferencia es mínima. Además, si se correlaciona los aminoácidos esperados con los encontrados de la fracción II.20.3.4 se aprecia que el análisis no reporta prolina ni arginina, lo cual da margen a la posibilidad de que la fracción II.9.3 reportada anteriormente sea la misma que la fracción II.20.3.4, aunque sus análisis de aminoácidos no sean idénticos.

Con base a la relación estructura-función se espera que estas toxinas a mamíferos, por ser péptidos de cadena larga, tengan actividad sobre canales de sodio como es el caso de las fracciones II-10, II.9.2.2 y II.14 del C. noxius.

Las toxinas sometidas a degradación automática de Edman fueron la II.20.3.4, la II.21.4 y la II.22.5. La secuencia de aminoácidos es el criterio definitivo de pureza y es en este paso donde se detectan los contaminantes, los cuales, pueden no ser visibles en gel por su baja concentración en la muestra o por tener características fisicoquímicas similares al componente principal. Este parece ser el caso de la fracción II.21.4, la cual mostró una sola banda en geles cilíndricos de poliacrilamida, pero que presentó dos secuencias de aminoácidos.

La caracterización de las toxinas aparece como una herramienta útil para estudios de filogenia y taxonomía. Se ha intentado obtener un máximo de homologías entre las secuencias N-terminal de las toxinas de diferentes especies de arañas, alineando los aminoácidos con el mínimo de cambios por interconversión, suponiendo que han perma-

recido inalterados durante la evolución. El alto grado de homología sugiere que la conservación de estos aminoácidos juega un papel importante en las funciones biológicas, dado que pueden constituir el sitio activo, ser esenciales para mantener la conformación activa o servir para el doblamiento de la cadena péptidica (Zlotkin y col., 1971).

La secuencia de aminoácidos de las toxinas II.20.3.4 y II.22.5 son muy similares entre sí y muestran cierta homología con toxinas a mamíferos aisladas de otras especies del Centruroides. Si se analiza la Fig. 15 (pag. 79), en la cual se comparan las secuencias de estas fracciones tratando de encontrar homología, se observa que existen cinco regiones conservadas en el N-terminal de la molécula; las posiciones de estas regiones son 1-4, 6-7, 10-14, 16, 18-29. La semejanza entre ambas es tal que es más fácil analizarlas basándose en los residuos que varían que en las secuencias conservadas.

A pesar de la doble secuencia de la fracción II.21.4 se puede observar que las secuencias conservadas son similares a las de estas dos toxinas.

En la tabla 8 13 se encuentran algunas secuencias de aminoácidos de toxinas de alacranes norteamericanos, sudamericanos y norteafricanos. Esto se hizo con el fin de detectar la homología que guarda la toxina II.20.3.4 con otras toxinas. Las secuencias fueron seleccionadas siguiendo el criterio de que fueran tóxicas a mamíferos y que su N-terminal iniciara con lisina. De este análisis se encontró que la mayor homología (86.8 %) es con la toxina II del C. suffusus

## T A B L A # 1 3

## SECUCENCIA DE AMINOACIDOS DE ALGUNAS TOXINAS DE ALACRAN.

Toxina	Secuencia completa o N-terminal
Clt II.20.3.4	KEGYLVNHSHTGCKYECFKLGDNDYCLRECRQQYIGKAGGGYCYAFGCWCETHLYEQAVVWPLT
Css II	KEGYLVSKSTGCKYECLEKLGDNBYCLRECKQQYKSSGGYCYAFACWCETHLYEQAVVWPLP#
Cn II.9.2.2	KEGYLVDRNTGCKYECLEKLGDNBYCLRECKQQYKAGGGYCYAFACWC
Clt II.22.5	KEGYIVNHYHTGCKYTCALGDNBYCLRECK
Cn II.10	KEGYLVNLYTGCKYECFKLGDN-YCL
Cn II.14	KDOYLVDAK-GCKKNCYKLGKNDYCNRECRMKERGGSYCYGFGCYCEGLSDSTPTWPLTSEKTC
CsE I	KDGYLVEK-TGCKKTCYKLGENDFCNRECKWKHIGGSSYCYGFGCYCEGLPDSTQTPWLPKCT
Ts III.10	KEGYLMDHE-GCKLSCPFRPSG-YCGRECCIK--KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC
Ts IV.5	KKDGYVPEYD-NCAICWNY-DWATCKLCKDKKADS--GYCYWV
AaH II*	VKDGIVDDV-NCTYFCGRNA---YCNRECTKLGES--GYCQWA-CYCYKLPDRVHRTGPGRCH
AaH I*	KRDGYIVYPNE-CVYECVPPCDG4LCKKNCGSS---GSS--CFIVPCWCKDLPDNVPIKDTSRKCT
Lq4*	LQDGYIVDDKH-CTFFCGRNA---YCNDECKKGGES--GYCQWA-CWCYKLPDRVSIKEGRCH

Las secuencias de aminoácidos se alinearon respecto a la posición de los residuos de cisteína y se asignaron arbitrariamente deleciones (-).

\* Para poder alinear las cisteínas se amularon 6,4 y 6 aminoácidos (SPYQVA, SGLA y SPYQVA) antes de la cisteína de la posición # 41.

T A B L A # 1 3

SECUCENCIA DE AMINOACIDOS DE ALGUNAS TOXINAS DE ALACRAN.

Toxina	Secuencia completa o N-terminal
Clt II.20.3.4	KEGYLVHHSTOCKYECFKLGDNDYCLRECRQQYQKGAAGGYCYAFQCWCTHLYEQAVVWPLT
Cas II	KEGYLVKSTOCKYECCLKLGDNDYCLRECKQQYKGSOGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPH
Cn II.9.2.2	KEGYLVDKNTOCKYECCLKLGDNDYCLRECKQQYKGAAGGYCYAFACWC
Clt II.22.5	KEGYLVNYHTOCKYTCAKLGDNDYCLRECK
Cn II.10	KEGYLVNLYTCKYECFKLGDN-YCL
Cn II.14	KDQYLVDAK-GCKNHCYKLOKNDYCNRECRMKHRGGSYCYGQFCYCEGLSDBTPTWPLTKTC
CaE I	KDGYLVEK-TGCKKTCYKLOENDFCNRECKWKHIGGSYGYCYGFCYCEGLPDBTQTWPLPKCT
Ts III.10	KEGYLMDHE-GCKLSCFIRFSG-YCGRECGIK--KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKC
Ts IV.5	KKDGYPVEYD-NCAYICWNY-DBAYCDKCLKDKKADS--GYCYWV
AaH II*	VKDGYIVDDV-NCTYFCGRNA---YCHRECTKLGES--GYCQVA-CYCYKLPDHVRTKGPGRCH
AaH I*	KRDGYIVPFW--CYHCVPPDGLCKKNCOSS---OSS--CFIVPCWCKDLPDNVPIKDTSRKCT
LqQ*	LQDGYIVDDK--CTFFCGRNA---YCNDECKKOGES--GYCQVA-CWYKLPDRVSIKEGRCH

Las secuencias de aminoácidos se alinearon respecto a la posición de los residuos de cisteína y se asignaron arbitrariamente deleciones (-).

\* Para poder alinear las cisteínas se anularon 6,4 y 6 aminoácidos (SPYNA, SGA y SPYNA) antes de la cisteína de la posición # 41.

suffusus (53/61 residuos); la F-II.9.2 del C. noxius poseé un 83.3 % de homología (40/48), la F-II.10 del mismo tiene un 92 % (23/25) y la fracción II.22.5 tiene un 80 % (24/30). La fracción II.14 del C. noxius poseé una homología del 57.37 % y la toxina I del C. sculpturatus Bwing tiene una homología de 55.73 % (34/61).

Con las toxinas III.10 y IV.5 del T. serrulatus la homología es de 49.18 % (30/61) y 39.02 % (16/41), respectivamente. Con la toxina II del A. australis la homología es del 39.3 % (24/61) y con la toxina V del L.s. quinquestriatus es del 39.3 % (24/61).

Como puede verse la mayor homología se encuentra con las toxinas de alacranes norteamericanos y la menor es con las toxinas de alacranes del viejo mundo.

Es muy probable que la presencia de cuatro puentes de disulfuro en proteínas tan pequeñas sea responsable de la gran estabilidad de estas toxinas. La localización de los puentes de disulfuro es, por lo tanto, muy importante por el papel que juegan entre la relación estructura-función (Bent, 1982). La presencia de las cisteínas en las mismas posiciones, determinadas para la variante 3 del C. sculpturatus permite suponer que los puentes de disulfuro de nuestra toxina están formados, también, por las cisteínas 12-65, 16-41, 25-46 y 29-48.

## CONCLUSIONES.

Tomando en cuenta los reportes previos y los resultados de este trabajo, se puede concluir que:

- La producción de veneno por cada alacrán es de  $574 \mu\text{g} \pm 184$  (  $\pm$  D.S. ) y que esto es proporcional al tamaño del alacrán ( Dent, 1980; Possani, 1978 y 1980; Guzmán, 1984 ).

- El veneno total presenta 13 componentes protéicos al analizarlo en geles cilíndricos de poliacrilamida en el sistema de Reisfeld.

- El veneno soluble se separa en tres componentes principales ( I, II, y III ) cuando se corre en una columna de Sephadex G-50 medio equilibrada con buffer de ácido de amonio 20 mM, pH 4.7 patrón característico del veneno de algunos Gentruroides corridos en estas condiciones.

- El veneno total tiene una dosis letal media de 0.65 mg/kg y la fracción II (el componente con toda la actividad tóxica) de 0.45 mg/kg de peso, el incremento en la potencia del veneno resulta lógico.

- La fracción I posee actividad de hialuronidasa, la fracción II posee toda la actividad tóxica y la fracción III es una mezcla compuesta de por lo menos 15 componentes positivos a ninhidrina.

- La fracción II se separa en 22 componentes con el gradiente salino y dos más se despegan al lavar con alta fuerza iónica.

- El componente II.19 es tóxico a mamíferos y los componentes II.20, 21, 22 y 23 son letales a los mismos.



- Los análisis de aminoácidos indican que las fracciones II.20.3.4, II.21.4 y II.22.5 pertenecen a la familia de toxinas de peso molecular aproximado a 7000 ( 61 a 70 aminoácidos ) y que la fracción II-19.5 posiblemente pertenezca a la familia de toxinas de peso molecular aproximado a 4000 ( 36 - 39 aminoácidos ), aunque ambos puntos estan sujetos a comprobación. El análisis de aminoácidos de la fracción II.9 reportada por Possani, es muy similar al de la fracción II.20.3.4, por esto y por la similitud en los N-terminal se puede pensar que sea la misma toxina.

- Se determinó la secuencia N-terminal de tres de los componentes letales y en base a la relación estructura-función se espera que estos péptidos, por su tamaño, tengan actividad sobre canales de sodio.

- Los N-terminal de las fracciones II.20.3.4 y II.22.5 muestran un alto grado de homología entre sí. Del análisis comparativo de la secuencia de la F.II.20.3.4 con otras secuencias de toxinas de alacranes de diferentes partes del mundo, se encontró, que la mayor homología es con la toxina II del C. suffusus suffusus y la menor, con la toxina V del L.g. quinquestratus. Esto es que, la mayor homología se encuentra con las toxinas de alacranes norteamericanos y la menor, es con las toxinas de alacranes del viejo mundo, como es de esperarse.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Entre las perspectivas futuras que se abren con la terminación de este proyecto, muchas de las cuales ya se encuentran en marcha, tenemos:

- a) Intentar purificar los componentes tóxicos faltantes para discernir si realmente existen cinco componentes tóxicos en el veneno y caracterizarlos químicamente.
- b) Purificar nuevamente los componentes ya reportados para terminar la caracterización química de ellos, es decir completar la secuencia de las fracciones II.20.3.4, II.21.4 y II.22.5.
- c) Hacer análisis comparativo del grado de homología en la secuencia de las toxinas aisladas de este veneno entre sí y en relación a toxinas de otros venenos, con su correspondiente asignación a los grupos estructurales de toxinas conocidas y la posibilidad de encontrar nuevos tipos ( Possani y col.,1977; Rochat y col.,1970, 1979 ).
- d) La síntesis química de fragmentos de secuencias de los péptidos ya conocidos para estudios de tipo inmunológico, determinación de epítopes y estudios de relación estructura-función.
- e) El estudio fisiológico de los componentes homogéneos y caracterizados químicamente, en sistemas de membranas mantenidas bajo voltaje sostenido.
- f) Aislamiento y caracterización bioquímica de las moléculas receptoras ( canales ) ( Catterall y col.,1982; Barhanin y col.,1982 ).

g) Caracterización de secuencias de aminoácidos que funcionen como determinantes antigénicos y la posible preparación de una vacuna sintética en contra del veneno del alacrán.

## BIBLIOGRAFIA

- Adam, K.R., Weiss, C. (1959) Action of scorpion venom on skeletal muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 14: 334-339.
- Angulano, L.G. y Cordova, C.C.A. (1946) Terapéutica experimental de la intoxicación alacránica. *Bol. Est. Méd. Biol. (Méx.)* 4: 95-100.
- Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M., Mlejnek, R.V. (1974) Amino acid sequence of neurotoxic protein variants from the venom of Centruroides sculpturatus Ewing. *Arch. Bioch. Bioph.* 164: 694-706.
- Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M., Mlejnek, R.V. (1975) Amino acid sequence of neurotoxin I from Centruroides sculpturatus Ewing. *Arch. Bioch. Bioph.* 166: 125-134.
- Balozet, L. (1971) Scorpionism in the old world. In: *Venomous animals and their venoms*, Bücherl, W., Buckley, E.E. (Eds.) Vol. III, p. 349, New York - London: Academic Press.
- Barhanin, J., Giglio, J.R., Leopold, P., Schmid, A., Sampaio, S.V., and Lazdunski, M. (1982) Tityus serrulatus venom contains two class of toxins. *J. Biol. Chem.* 257: 12553-12558.
- Braun, K., Stern, S., Warkson, S. (1969) Sympathomimetic effects of scorpion venom of the cardiovascular system. *Israel J. Med. Sci.* 5: 853-854.

Cahalan, M.D. (1975) Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by Centruroides sculpturatus scorpion venom. J. Physiol. ( Lond. ) 244: 511-534.

Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., Maelicke, A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K channels by a novel scorpion toxin. Nature 296: 90-91.

Carbone, E., Prestipino, G., Franciolini, F., Dent, M.A.R., and Possani, L.D. (1984) Selective modification of the squid axon  $Na^+$  currents by Centruroides noxius toxin II-10. J. Physiol. Paris: 179-184.

Catterall, W.A. (1976) Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential  $Na^+$  ionophore. J. Biol. Chem. 251: 5528-5536.

Catterall, W.A. (1980) Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 15-43.

Catterall, W.A., Hartshorne, R.P. y Beneski, D.A. (1982) Molecular properties of neurotoxin receptor sites associated with sodium channels from mammalian brain. Toxicon 20(1): 27-40.

Couraud, F., Jover, E., Dubois, J.M., and Rochat, H. (1982) Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation the other to the inactivation of the action potencial sodium channel. *Toxicon* 20: 9-16.

Cheymol, J., Bourillet, P., Rochat-Arveiller, H., Heckle, J. (1974) Action cardiovasculaire de trois venins de scorpions nord-africains (*B. australis*, *Leiurus quinquestratus*, *Buthus occitanus*) et de deux toxines extraites de l'un d'entre eux. *Toxicon* 12: 241-248.

Chhatwal, G.S., and Habermann, E. (1981) Neurotoxins, protease inhibitors and histamine releasers in the venom of the Indian red scorpion (*Buthus tamulus*): Isolation and partial characterization. *Toxicon* 19: 807-823.

Barbon, H., Rochat, H., Kopeyan, C., and Rietschoten, J.V. (1982) Covalent structure of the insect toxin of *Androctonus australis* Hector. *Toxicon* 20: 64.

De la garza y cols. (1978) Proyecto de investigación sobre alacranismo en Tecomán, Colima. Esc. Salud Pùb.

Bel Pozo, E.C., Anguiano, L.G., Gonzalez, G.J. (1944) Acciones del veneno de alacrán sobre el sistema vaso-motor. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop.* 5: 227-240.

Del Pozo, E.C., González, G.J., y Méndez, T.H. (1945) Acciones del veneno de alacrán sobre el aparato respiratorio. Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. (Méx.) 6: 77-91.

Del Pozo, E.C., Anguiano, L.G. (1946) Physiological action of scorpion venom. Fed. Proc. 5: 1.

Del Pozo, E.C., Anguiano, L.G. (1947) The effects of scorpion venom on striated muscle. Abstr. Commun. 17th. Inter. Physiol. Congress. 1-2.

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

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

Del Pozo, E.C. (1949) Relaciones entre la actividad anticolinesterásica, las propiedades de activación muscular y la toxicidad de los venenos de diversos alacranes de México. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 10: 203-213.

Del Pozo, E.C. (1956) Mechanism and pharmacological actions of scorpion venoms. In: Venoms. Buckley, E.B., Porges, N. (Eds.) Amer. Ass. Advanc. Sci. pp 123.

Del Pozo, E.C. (1962) Estudios experimentales sobre las acciones del veneno del alacrán. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 10: 203-213.

Del Pozo, E.C. (1968) Farmacología de los venenos de los Centruroides Mexicanos. Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. ( Méx. ) 28: 52-65.

Bent, N.A.R. (1982) Aislamiento y caracterización química de diversas toxinas del veneno del alacrán Centruroides noxius Hoffmann. Tesis para Maestría en Ciencias presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México. Fac. de Ciencias Química, Bioquímica. México.

Bent, N.A.R., Possani, L.D., Ramirez, G.A., Fletcher, Jr. P.L. (1980) Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Toxicon 18: 343-350.

Diniz, C.R., Piminta, A.P., Netto, J.C., Pompola, S., Gómez, N.V., and Bohm, G.H. (1974) Effect of scorpion venom from Tityus serrulatus (Tityus toxin) on the acetylcholine release and fine structure of the nerve terminals. Experientia 30: 1304-1305.

Diniz, C.R. (1978) Chemical and pharmacological aspects on Tityinae venoms. In. handbook of experimental Physiology, Vol. 48, Arthropod venoms, S. Bettini ( Eds. ). Springer-Verlang, Berlin: 379-394.



Efrati, P. (1978) Epidemiology, symptomatology and treatment of Buthinæ stings, Vol. 48, Arthropod venoms, S. Bellini (Eds. ). Springer-Verlag, Heidelberg, 312-317.

El-Asmar, M.F., Farag, R.H., Shoukry, S., and El-Shimi, I.R. (1979) Effect of scorpion (Leiurus quinquestratus H and E) venom on lipid metabolism. *Toxicon* 17: 279-283.

El-Asmar, M.F. (1984) Metabolic effects of scorpion venom. In Handbook of natural toxins (edit by Anthony T. Tu ), pp 552-575, Marcel Dekker, Inc., New York.

Freire-Maia, L., Ribeiro, R.H., Beraldo, W.T. (1970) Effects of purified scorpion toxin on respiratory movements in the rat. *Toxicon* 8: 307-310.

Freire-Maia, L., Azevedo, A.D., and Costa Val, V.P. (1973) Respiratory arrhythmias produced by purified scorpion toxin. *Toxicon* 11: 255-257.

Freire-Maia, L., Pinto, G.I., Franco, I. (1974) Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188: 207-213.

Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Suddath, F.L. and Bugg, C.E. (1982) The three dimensional structure of scorpion Centruroides sculpturatus neurotoxins, *Toxicon* 20: 1-8.

Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D., and Bugg, C.E. (1980) Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom. A new structural class neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6496-6500.

Frank, G.B. (1958) Effect of veratrine on muscle fibre membrane and on negative after potential. *J. Neurophysiol.* 21: 263-278.

Garcia, G.P. (1976) "Etude des neurotoxines du venin du scorpion mexican Centruroides suffusus suffusus. Francia. Tesis ( Doctorado ) Universidad de Nice, Francia.

Gómez, M.V., Dai, M.E.M., and Biniz, C.R. (1973) Effect of scorpion venom, Tityustoxin, on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. *J. Neurochem.* 20: 1051-1061.

Gómez, M.V., Biniz, C.R. (1966) Separation of toxic component from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus venom. *Mem. Inst. Butantan Simp. Intern.* 33 ( 3): 899-902.

Grishin, E.V., Soldatova, L.N., Soldatov, N.N., Kosteski, P.V., and Ovchinnikov, Y.A. (1980) Amino acid sequence of insectotoxin 1-2 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus. *Sov. J. Bioorg. Chem. ( Engl. Transl. Bioorg. Khim. )* 5 (9): 949-956.

Grupp, G., Grupp, I.L., Gueron, M., Adolph, F. and Fowler, M.D. (1980) Direct myocardial effects of the yellow scorpion ( Leiurus quinquestratus ) venom on contractile force of isolated guinea pig atria and papillary muscles. IRCS Med. Sci. 8: 666-667.

Gueron, M, Stern, J. and Cohen, W. (1967) Severe myocardial damage and heart failure in scorpion sting. Am. J. Cardiol. 19: 719-725.

Gueron, M. and Yarom, R. (1970) Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting: Clinico-pathological correlations. Chest. 57: 156-162.

Guzmán, H. (1984) Purificación y caracterización bioquímica de toxinas del veneno del alacrán Centruroides limpidus limpidus ( Alacrán de Guerrero ). Tesis para licenciatura presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias, Biología, México.

Habersatzer-Rochat, C., Sampieri, F., Pepe, G., Frey, M. and Astier, J.P. (1981) Preliminary X-ray diffraction studies on two crystalline forms of a scorpion neurotoxin: Toxin II of Androctonus australis Hector. 4th Eur. Symp. Animal, plant and Microbial toxins, Marseilles, France.

Hagag, M., Tu, A.T., and El-Asmar, F. (1983) Isolation of minax toxins from the venom of the scorpion Buthus minax and their metabolic effects. Arch. Biochem. Biophys. 220: 459-466.

Halstead, B.U. (1978) Poisonous and venomous Marine Animals of the world. Darwin Press. Princeton, N.J. 283: 3.

Henriques, M.C., Gazzinelli, G., Diniz, C.R. and Gómez, M.V. (1968) Effect of the venom of the scorpion Tityus serrulatus on adrenal gland catecholamines. *Toxicon* 5: 175-179.

Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of loligo. *J. Physiol. (Lond.)* 116: 473-496.

Ismail, M., Osman, O.H., Ibrahim, S.A. and El-Asmar, M.F. (1972) Cardiovascular and respiratory responses to the venom from the scorpion Leiurus quinquestriatus. *E. Afr. Med. J.* 49: 273-281.

Ismail, M. and Osman, O.H. (1973) Effect of the venom from the scorpion Leiurus quinquestriatus ( H and E ) on histamine formation and inactivation in the rat. *Toxicon* 11: 225-229.

Ismail, M., Osman, O.H. and El-Asmar, M.F. (1973) Pharmacological studies of the venom from the scorpion Buthus minax ( L. Koch ). *Toxicon* 11: 15-20.

Ismail, M., El-Asmar, M.F. and Osman, O.H. (1975) Pharmacological studies with scorpion ( Palamneus gravimanus ) venom: Evidence for the presence of histamine. *Toxicon* 13: 49-56.

Ismail, M., Gumaa, K.A, Osman, O.H. and El-Asmar, H.F. (1978) Effect of *Buthus minax* ( L. KJoch ) scorpion venom on plasma and urinary electrolyte levels. *Toxicon* 16: 385-392.

Jaimovich, E., Ildefonse, M., Barhanin, J., Rougier, O. and Lazdunski, M. (1982) Centruroides toxin, a selective blocker of surface Na<sup>+</sup> channels in skeletal muscle; Voltage-clamp analysis and biochemical characterization of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3896-3900.

Jover, E., Couraud, F. and Rochat, H. (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 1607-1614.

Kopeyan, C., Martínez, G., Lissitzky, S., Miranda, F. and Rochat, H. (1974) Disulfide bonds of toxin II of the scorpion Androctonus australis Hector. *Eur. J. Biochem.* 47: 483-489.

Kopeyan, C., Martínez, G. y Rochat, H. (1982) Primary structure of toxin IV of Leiurus quinquestratus quinquestratus and characterization of a new group of scorpion neurotoxin. *Toxicon* 20: 71.

Lazarovici, P. and Zlotkin, E. (1982) A mammal toxin derived from the venom of a Chactoid scorpion. *Comp. Biochem. Physiol.* 71: 177-181.

Lazarovici, P., Yanai, P., Pelhate, M. and Zlotkin, E. (1982a) Insect toxin components from the venom of a chactoid scorpion, Scorpion maurus palmatus (Scorpionidae) . J. Biol. Chem. 257: 8397-8404.

Lazdunski, T. (1974) *Physiol. Rev.* 54: 813-839.

Linden, C.D. and Raftery, M.A. (1976) Isolation of a scorpion toxin for use as a probe of the electrically excitable sodium channel. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 72: 646-653.

Lissitzky, S., Miranda, F., Etzensperger, P., Mercier, J. (1956) Sur la toxicité du venin de deux especes de scorpion nord-africans. *C.R. Soc. Biol. ( Paris )* 150: 741-743.

Litchfield, J.L.Jr. y Wilcoxon, F. (1949) A simplified method of evaluating Dose-Effect experiments. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 96-99.

Master, R.W.S., Rao, S. and Soman, P.D. (1963) Electrophoretic separation of biologically active constituents of scorpion venom. *Biochem. Biophys. Acta* 71: 422-428.

Mazzotti, L., Bravo-Becherelle, M.A. (1963) Scorpionism in the Mexican Republic, *Int. Venomous and Poisonous animals and noxious plant of the pacific area: Keegan and Mac Farlane ( Eds. ) London, New York, Sydney. Pergamon, pp 119-131.*

Mc Instosh, M., Watt, D. (1973) Purification of toxins from the North American scorpion Centruroides sculpturatus. In: Toxins of Animal and Plant Origin ( Eds. ) A. Devries and Kochva. Vol. 2, Gordon and Breach, New York pp 529-544.

Neglitsch, P.A. (1972) The Chelicerates. In: Invertebrate Zoology. New York, Oxford university Press London Toronto. PP 468-515.

Miranda, F., Lissitzky, S. (1958) Purification de la toxine du venin de scorpion. Biochim. Biophys. Acta 30: 217-218.

Miranda, F., Rochat, H., Lissitzky, S. (1961) Sur la neurotoxine du venin de scorpion. I.- purification a partir du venin de deux especes de scorpions Nordafricains. Bull. Soc. Chim. Biol. ( Paris ) 42: 379-391.

Miranda, F., Rochat, H., Lissitzky, S. (1961) Sur la neurotoxine du venin des scorpions. II.- utilisation de l'electrophorese sur papier pour l'orientation et le controle de la purification. Biochimie. 43: 945-952.

Miranda, F., Rochat, H., Rochat, C. and Lissitzky, S. (1966) Essais de purification des neurotoxines du venin d'un scorpion d'Amerique de Sud ( Tityus serrulatus L. e H. ) par des methodes chromatographiques. Toxicon 4: 145-152.

Miranda, F., Kopyan, C., Rochat, C., Lissitzky, S. (1970) Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpions Androctonus australis Hector, Buthus occitanus lunetanus and Leiurus quinquestratus. Eur. J. Biochem. 16: 514-523.

Mohamed, A.H. (1942) Preparation of antiscorpion serum. Use of atropine and ergotina. Lancet 2: 364-365.

Mohammed, A.H. (1950) Blood sugar response to Egyptian scorpions. Nature (Lond.) 166: 734-735.

Mohammed, A.H., Rohayem, H., Zaky, O. (1954) The action of scorpion toxin on blood sodium and potassium. J. Trop. Med. Hyg. 57: 85-87.

Moore, S. (1963) On the determination of cysteine acid. J. Biol. Chem. 238: 235.

Most, J., Kazic, T., Henry, P. and Kopin, I.P. (1973) Scorpion venom induced discharge of catecholamines accompanied by hypertension. Brain Res. 54: 381-385.

Narahashi, T. (1974) Physiol. Rev. 54: 813-839.



Hickerson, M. (1971) Antihypertensive agents and drug therapy of hypertension. In: The pharmacological basis of therapeutics. Goodman, L.S., Gilman, A. ( Eds. ) London-Toronto: MacMillan, pp 728.

Patterson, R.A. (1960) Physiological action of scorpion venom. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 9: 410-414.

Patterson, R.A. (1964) Effects of venom from the scorpion Centruroides sculpturatus on the rat. Toxicon 2: 167-170.

Patterson, R.A., Wooley, D. (1970) Effect of scorpion venom ( Centruroides sculpturatus ) on the carotid body and superior cervical ganglion of the cat. Toxicon 8: 145.

Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, P.L., Jr., Erickson, B.U. (1977) Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Arch. Biochem. Biophys. 180: 394-403.

Possani, L.D., Ramírez, G.A., Fletcher, P.L. Jr., Gurrola, M.A.H. (1978) Isolation of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides elegans ( Thorell ). FEBS Letters 91 (2): 261-264.

Possani, L.D., Fletcher, P.L. Jr., Alagón, A.B.C., Alagón, A.C., Julia, J.Z. (1980) Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. *Toxicon* 18: 175-183.

Possani, L.D., Dent, M.A.R., Martin, B.M., Kaelicke, A. and Svendsen I. (1981 a) The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 46: 207-214.

Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J. and Svendsen, I. (1981 c) Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. *Carlsberg Res. Commun.* 46: 195-205.

Possani, L.D., Steinmetz, U.E., Dent, M.A.R., Alagón, A.C. and Withrich, K. (1981 d) Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. *Biochim. Biophys. Acta* 669: 183-192.

Possani, L.D., Martin, B.M. and Svendsen, I. (1982) The primary structure of noxiustoxin: A K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 47: 285-289.

Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., Rode, G.S. and Erickson, B.U. (1985) Toxins from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello: Primary structure and sequence comparison by metric analysis. *Biochem. J.* 229: 739-750.

Possani, L.D. (1984) Structure of Scorpion toxins. In Handbook of natural toxins ( Edited by Anthony T.Tu ). pp 513-550, Marcel Dekker, Inc. New York.

Reisfeld, R.A., Lewis, U.S. and Williams, D.E. (1981) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, London 195: 281-283.

Ritchie, J.M. y R.B. Rogart (1977) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 79: 1-51.

Rochat, C., Rochat, H., Miranda, F. and Lissitzky, S. (1967) Purification and some properties of neurotoxins of Androctonus australis Hector. *Biochemistry* 6: 578-585.

Rochat, H., Rochat, C., Kopeyan, C., Miranda, F., Lissitzky, S., Edman, P. (1970a) Scorpion neurotoxins: a family of homologous proteins. *FEBS Lett.* 10: 359-361.

Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S., Edman, P. (1970b)  
The amino acid sequence of neurotoxin I of Androctonus australis  
Hector. Eur. J. Bioch. 17: 262-266.

Rochat, H., Rochat, C., Sampieri, F., Miranda, F., Lissitzky, S. (1972)  
The amino acid sequence of neurotoxin II of Androctonus australis  
Hector. Europ. J. Biochem. 28: 381-388.

Rochat, H., Kopeyan, C., Garcia, L.G., Martinez, G., Rosso, J.P.,  
Pakaris, A., Martin, M.F., Garcia, A., Martin-Moutot, N., Gregoire, J.,  
Miranda, F. (1976) Recent results on the structure of scorpion and  
snake toxins. In: Animal, Plants and Microbial toxins Vol. 2. (Eds.)  
A. Ohsaka, K. Hayashi and Y. Sawai, Plenum Press, New York.

Rochat, H., Bernard, P. and Couraud, F. (1979) Scorpion toxins:  
Chemistry and mode of action. In Advances in cytopharmacology, vol.  
3, B. Ceccarelli and F. Clementi; (Eds.) Raven Press, New York, pp  
325-334.

Roda, G. (1984) Aislamiento y caracterización de los componentes tóxicos  
del veneno del alacrán Sudamericano Tityus serrulatus. Tesis para  
Maestría en Ciencias presentada en la Universidad Nacional Autónoma de  
México. Fac. de Ciencias Químicas, Bioquímica. México.

Stahnke, H.L. (1966) The treatment of venous bites and stings.  
Arizona State University.

Taylor, D.L. and Seliger, H.H. ( Eds. ) (1979) Toxic dinoflagellate blooms. Elsevier/north-Holland Biomedical Press, New York, pp 505.

Toledo, D. and Neves, A.G.A. (1976) Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion Tityus serrulatus. Comp. Biochem. Physiol. 55B: 249-253.

Wang, G.U. and Strichartz, G. (1982) Simultaneous modifications of sodium channel gating by two scorpion toxins. Biophys. J. 40: 175-179.

Watt, B.D. and Simard, J.N. (1978) Chemical and biological characterization of toxins isolated from scorpion venom. Toxicon 2: 140.

Wheeler, K.P., Barhanin, J. and Lazdunski, M. (1982) Specific binding of toxin II from Centruroides suffusus suffusus to the sodium channel in electroplaque membranes. Biochemistry 21: 5628-5634.

Yarom, R. and Guerom, M. (1971) Scorpion venom cardiomyopathy. Pathol. Microbiol. 35: 114-116.

Zhdanova, L.N., Adamovich, T.B., Nazimov, I.V., Grishin, E.V. and Ovchinnikov, Y.A. (1978) Amino acid sequence of insecto toxin I-1 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus. Sov. J. Bioorg. Chem. ( Engl. Transl. Bioorg. Khim. ) 3(4): 366-372.

Zlotkin, E., Miranda, F. and Rochat, H. (1978) Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In Handbook of experimental Pharmacology, vol. 48, Arthropod Venoms, S. Bettini ( Ed. ), Springer-Verlag, Berlin, pp 317-369.

Zlotkin, E., Rochat, H., Kopeyan, C., Miranda, F., Lissitzky, S. (1971) purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion Androctonus australis Hector. Biochimie 53: 1073-1078.