

00562

Tej

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION QUIMICA DE DIVERSAS TOXINAS
DEL VENENO DEL ALACRAN Centruroides noxius HOFFMANN

Tesis para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

MYRNA ALEXANDRA ROBERTA DENT

00562
s/año

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
1. Generalidades	1
2. Origen, Taxonomía y Distribución Geográfica	4
3. Composición química de los venenos	8
4. Fisiología y Acción del veneno	17
a) Efectos musculares	18
b) Efectos cardiovasculares	20
c) Efectos sobre las membranas axonales	23
d) Otros efectos	27
5. Sintomatología y Dosis Letal	28
6. El Alacrán de Nayarit	32
II. MATERIAL, METODOS Y RESULTADOS	34
1. Artículo: Dent, M.A.R. y col., (1980)	34
2. Artículo: Possani, L.D. y col., (1981a)	43
3. Artículo: Possani, L.D. y col., (1981b)	53
III. RESULTADOS NO PUBLICADOS Y DISCUSION GENERAL	61
VI. DISCUSION ESPECIFICA Y PERSPECTIVAS FUTURAS	76
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	81
VI. BIBLIOGRAFIA	82

1. INTRODUCCION

1. Generalidades

Como el miedo a la muerte, como el miedo a lo desconocido, los animales ponzoñosos han sido fuente de inspiración para el desarrollo de una asombrosa imaginación en diferentes civilizaciones.

El terror que pequeños organismos como los alacranes han producido al hombre a lo largo del tiempo, ha permitido la creación de numerosos mitos y leyendas escritos al respecto como signo de maldad, de divinidad o de muerte. Aparecen mencionados en diferentes religiones como en la Biblia o el Talmud o en diferentes Mitologías como la Maya, la Egipcia o la Griega. Se representan también sobre varios monumentos, pinturas o relieves o sobre túnicas o escudos como símbolos siniestros (Balozet, 1971).

Para los egipcios por ejemplo, "Selket", la hija de Ra, es la diosa escorpión, representada con un alacrán sobre su cabeza y juega un importante papel dentro de la ceremonia de embalsamamiento, protege a la muerte extendiendo sus brazos alados sobre las paredes internas de los sarcófagos.

Para los huicholes, "Párikuté", el Dueño de los Animales, tuvo temor de que el alacrán hiciera daño a la gente y le pidió al zopilote que acarrearra un canasto de los que usan los chamanes. Debía colocarlo en una repisa alta; no le dijo que contenía el más peligroso de los alacranes y le ordenó que no mirara, pues lo que estaba aprisionado podía escapar. Pero El zopilote era curioso y abrió el canasto, el alacrán salió y se escondió.

El zopilote no pudo hallarlo y es por eso que ahora nos importunan los --
alacrames" (Furst y Nahmad, 1972).

Sin embargo, no es causal esta relación, finalmente toda leyen
da refleja en mayor o en menor grado su medio ambiente circundante. En --
Egipto se localizan algunas de las especies de alacranes más dañinas para
el hombre que pertenecen a los géneros Androctonus, Leiurus y Buthus. En
México, los huicholes ocupan la porción de la Sierra Madre Occidental dentro
del Estado de Nayarit donde se localiza la especie de alacrán más veneno
so de México, Centruroides noxius.

El primer estudio sistemático sobre las variaciones de toxicidad
de los alacranes aparece hasta 1668 realizado por Francesco Redi, el
cual hace referencia a la toxicidad y a la distribución geográfica de los
alacrames. A este trabajo le siguieron escasos estudios posteriores, pero
tendrían que pasar casi dos siglos para que el estudio de los venenos de --
los alacranes cobrara mayor auge científico. Dado el problema de salud --
pública que representan ciertas especies de alacranes por su nocividad sobre
el hombre, los primeros trabajos se relacionan únicamente con el tratami
ento y la sintomatología del piquete del alacrán.

Es realmente en los últimos años en que el avance científico --
y tecnológico ha hecho posible que los bioquímicos, fisiólogos, inmunólogo
s y farmacólogos enriquecieran el conocimiento a nivel molecular sobre --
la estructura y función de los venenos. Se calcula que cada año se publica
n alrededor de 10 000 artículos en este campo (Zlotkin, 1973).

El tema sobre venenos cobra gran interés si se aprecia el amplio espectro de organismos venenosos que existen, tanto terrestres como marinos desde organismos unicelulares como los dinoflagelados hasta vertebrados como los reptiles o mamíferos, que producen componentes tóxicos tan diversos desde compuestos alifáticos simples o heterocíclicos como en peces o en moluscos hasta proteínas de bajo peso molecular como en elápidos o en alacranes o de alto peso molecular, como en la araña Viuda Negra. Se encuentran contenidas además, en una gran heterogeneidad de estructuras anatómicas especializadas para su liberación, desde formas simples como los tejidos corporales de los peces ponzoñosos hasta formas más especializadas como el telson del alacrán; producen también efectos clínicos muy diversos desde una simple irritación corporal hasta necrosis o la parálisis respiratoria (Zlotkin, 1973).

Toda esta importante convergencia evolutiva que por tan diversos caminos se ha producido a través del tiempo sobre la utilización de veneno como un mecanismo de defensa y de obtención de alimentos, puede considerarse, desde el punto de vista ecológico, de amplio valor adaptativo -- como resultado de un menor gasto de energía.

Así, en la medida en que los trabajos sobre el veneno de estos organismos se incrementen para dilucidar la dinámica entre su estructura y su función mediante el aislamiento y la caracterización de sus venenos y los efectos fisiológicos de los mismos, podrán ser útiles herramientas en neurología sobre la caracterización química de las moléculas involucradas en la conductancia iónica, en diferentes procesos fisiológicos de fenómenos excitatorios neuronales o inducción de la transmisión química, como fuen--

tes potenciales para nuevos agentes terapéuticos, así como para el estudio taxonómico y zoogeográfico de estos organismos.

En particular, este trabajo versa sobre el estudio del veneno del alacrán, por lo que se hará hincapié sobre ellos.

2. Origen, Taxonomía y Distribución Geográfica

Los alacranes se cuentan entre los organismos actuales más antiguos que se conocen, sus restos fósiles aparecen desde el Silúrico y se supone que evolucionaron de los Euriptéridos, que fueron organismos de -- aguas dulces o salobres que aparecieron en el Cámbrico y en el Silúrico; -- por esa razón se les ha atribuido a los antiguos alacranes una existencia acuática, que podría explicar la ausencia de estigma en dichos fósiles. -- O bien, podrían haber sido formas de vida terrestre que habitaban las cos -- tas durante las bajas mareas, los cuales fueron atrapados y confundidos -- con otros organismos acuáticos y deberse la carencia de estigmas a su mal estado de conservación, si ésto fuera así los alacranes junto con los -- cienpies serían los primeros animales terrestres que se conocen (Moody, 1962; Camacho, 1974).

Como resultado del proceso evolutivo, se encuentran pequeñas diferencias entre las formas fósiles y las actuales de los alacranes ya -- que han permanecido casi inalterados morfológicamente a través del tiempo, gracias a su gran adaptabilidad ecológica, por eso en ocasiones se les -- describe como "fósiles vivientes". Los alacranes tienen además la característica de no ser estructuras intermedias en la evolución animal, sino

el resultado de una línea totalmente independiente dentro de los artrópodos que ha sido capaz de resistir los cambios geológicos durante millones de años sin dar lugar a nuevas formas (Vachon, 1953).

Los alacranes se localizan en ambos hemisferios en las zonas templadas correspondientes a los climas tropicales y subtropicales. Son arácnidos que pertenecen al Orden Scorpionida, las especies peligrosas para el hombre corresponden en su totalidad a la familia Buthidae que es la familia más grande de alacranes, con más de 500 especies distribuidas por todo el mundo, de las cuales alrededor de 25 especies se consideran dañinas (Shulov y Levy, 1978).

El patrón de distribución de las especies altamente tóxicas se confinan en el Viejo Mundo al Norte de Africa, Medio Oriente e India, y pertenecen a los géneros Androctonus, Leiurus, Buthus, Buthotus y Heterometrus; en el Nuevo Mundo se localizan en América del Norte en México y una parte del sur de E.U. y pertenecen al género Centruroides, en América del Sur se localizan en Brasil y Trinidad Tobago y pertenecen al género Tityus (Balozet, 1971; Bücherl, 1971).

En México, los alacranes venenosos presentan una amplia distribución a través de toda la vertiente del Pacífico en la zona Tropical y Subtropical de México, interrumpida en tramos por la Sierra Madre Occidental y cortada en dos por la Sierra Volcánica Transversal.

Los estudios taxonómicos y biogeográficos de los alacranes mexicanos se encuentran realizados casi en su totalidad por Hoffmann entre la década de 1930-1940. Sin embargo, se requiere un estudio taxonómico más -

profundo dado que en 1932 Hoffmann elaboró una clave en donde separa las especies en rayadas y no rayadas, ésto podría crear especies artificiales, dado que a pesar de que han sido utilizados con frecuencia patrones de coloración, manchas y rayas en la sistemática de los alacranes, un estudio reciente sobre dos especies de alacranes basado sobre su distribución geográfica, comparación de patrones electroforéticos del veneno y reproducción en cautiverio demostró que estas dos especies clasificadas, originalmente son diferentes fases de coloración de una misma (Stankhe, 1971).

Se requiere también un estudio más completo sobre la distribución geográfica de las diferentes especies de alacranes mexicanos, dado que los estudios realizados son ensayos provisionales y los límites exactos de cada especie no están bien delineados. Sin embargo, en virtud de que no existe ningún estudio posterior al respecto, basándonos en estos trabajos; puede decirse que existen en México 6 especies de alacranes peligrosos por el hombre conocidos hasta el momento pertenecientes al género Centruroides (Hoffmann, 1938). Así se tiene: el C. sculpturatus al Sur de Arizona y Norte de Sinaloa, el C. suffusus presenta al menos dos subespecies C.s. chiaravigli al Norte de la Mesa Central y el C.s. suffusus al Sur de Durango, Noroeste de Zacatecas y Este de Sinaloa. El C. noxius habita en Nayarit y Sureste de Sinaloa, el C. limpidus con dos subespecies, el C.l. limpidus que habita en Morelos, Sureste del Edo. de México, Sureste de Michoacán y Suroeste de Puebla, esencialmente la Cuenca del Río Balsas y el C.l. tecomanus que se localiza en Colima. El C. elegans que presenta al menos dos subespecies el C.e. insularis en las Islas Marías y el C.e. elegans que habita dos regiones geográficas separadas, una al Norte, la forma típica, en el Edo. de Jalisco y áreas costeras de Nayarit y Sina-

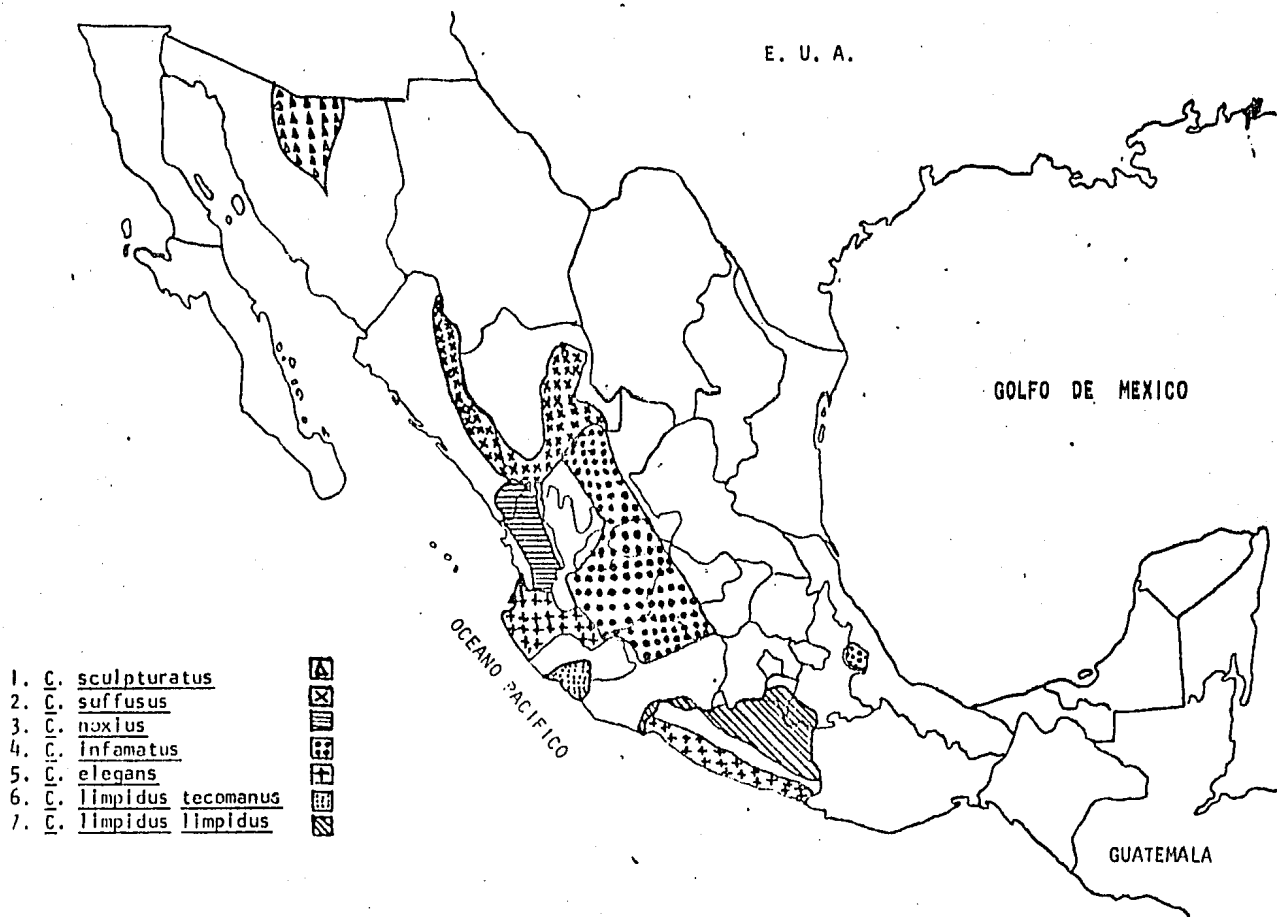


Fig. 1. Distribución geográfica de las especies más peligrosas del género Centruroides en la República Mexicana. (Hoffmann, 1938)

loa y la otra al Sur que bien podría ser otra subespecies, en la región -- costera de Guerrero y un poco de Oaxaca y el C. infamatus que cubre el centro del país desde el Sur de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Michoacán y Jalisco, así como un pequeño foco cerca de Jalapa en el Edo. de Veracruz, que al parecer se encuentra aislado y se conocen dos subespecies. --

C.i. infamatus y C.i. ornatus (Hoffmann, 1938; Díaz Nájera, 1970). (Ver Mapa, Fig. 1).

3. Composición Química de los Venenos

Siguiendo el criterio de que "el más venenoso es el más interesante" y como la toxicidad de los venenos de los alacranes varía de acuerdo con su lugar de origen, no es de extrañar que los primeros estudios de purificación de los venenos de los alacranes se realizara con los del Norte de Africa por el grupo de Miranda y colaboradores en Francia.

Los primeros intentos sobre la purificación de dichos componentes realizados por Wilson (1904), Mohamed (1942) y Adam y Weiss (1959) -- fueron totalmente infructuosos, posteriormente se realizaron algunos trabajos que aportaron un amplio progreso sobre el análisis bioquímico de los venenos, como el que se encuentran constituidos por proteínas, migran hacia el cátodo, son solubles en agua y precipitan en acetona (Lissitzky y col., 1956; Miranda y col. 1960; 1961). Sin embargo, es hasta el surgimiento de las nuevas técnicas cromatográficas por filtración en gel y por intercambio iónico que se consiguió desarrollar el campo sobre la purificación y caracterización de las proteínas neurotóxicas de los venenos. El -

grupo de Miranda logró purificar del veneno de Androctonus australis Hector, después de cerca de 10 años de trabajo, las primeras dos toxinas contra mamíferos en 1967 y estimar sus pesos moleculares mínimos por la composición de aminoácidos (Rochat, 1967).

En general el veneno de los alacranes es de apariencia lechosa, opalescente y con un pH alrededor de 7.0. El veneno obtenido por estimulación eléctrica del telson del alacrán disuelto en agua contiene un material insoluble que puede separarse por centrifugación y carece de toxicidad, al parecer son mucoproteínas y desechos celulares como membranas, aunque la composición exacta no ha sido estudiada. La parte soluble contiene todos los componentes tóxicos y consiste en su mayor parte de una mezcla de proteínas y péptidos de diferentes pesos moleculares y en menor cantidad de lípidos, nucleótidos, sales inorgánicas y aminoácidos libres.

Aunque se encuentran presentes algunas enzimas, la acción letal del veneno se atribuye principalmente a una serie de polipéptidos neurotóxicos que difieren en el grado de toxicidad y composición de aminoácidos al ser probados sobre vertebrados e invertebrados.

Tratándose de alacranes y de elápidos el término neurotoxina se refiere a aquellas proteínas o polipéptidos de los venenos que bloquean la transmisión sináptica al combinarse con las membranas del sistema nervioso periférico (Babin y col. 1974; Watt y col. 1974). Sin embargo, en el Congreso Internacional de Toxicología efectuado en 1976, se sugirió utilizar el término toxina en vez de neurotoxina, hasta satisfacer los criterios requeridos para aseverar su acción neurotóxica sobre el sistema nervioso.

Las toxinas de alacrán son proteínas muy estables, como se ha observado por experimentos de termodesnaturalización, seguidos por dispersión óptica rotatoria, los cuales han mostrado que las toxinas de los alacranes mexicanos y brasileños son moléculas altamente empacadas y establizadas por 4 puentes de disulfuros (Possani y col. 1981).

También utilizando dispersión óptica rotatoria y espectrofotografía diferencial de ultravioleta con la toxina de Androctonus australis -- Hector II, se encontró una forma predominante entre pH 4 y 9, de las 4 posibles, además de ser altamente estable contra la desnaturalización por -- calor o tratamiento con urea 9.5M (Chicheportiche y Lazdunski, 1970).

Con el veneno del Centruroides sculpturatus se observó que al calentarse a 92°C por 40 min. pierde potencialidad, dado que la dosis letal media (DL_{50}) sube de 1.46 a 4.29 mg/kg, pero sigue siendo tóxica. Con otras toxinas de Centruroides al hervirse por 5 min. las proteínas vuelven a replegarse tridimensionalmente conservando su toxicidad (Watt y col. -- 1964; Possani y col. 1981).

A pesar de la dificultad que representa la purificación de estas proteínas por tener pesos moleculares semejantes y propiedades fisicoquímicas parecidas, se ha logrado aislar a homogeneidad 54 toxinas de diferentes venenos de alacranes, de ellas se conocen 38 regiones N-terminal y sólo de 21 se conoce su estructura completa. (Ver Tabla II, pag. 71 y 72).

El grupo de Francia es el que más ha aportado al conocimiento de la estructura primaria de los venenos de alacranes, de las especies nor

teafrikanas: AaH, Amm, Bop, Bot y Lqq. Han seguido un patrón general de purificación que consiste en la extracción del veneno por estimulación -- eléctrica y obtención del material soluble, seguido por separación del -- veneno soluble por filtración en gel de Sephadex G-50 con reciclamiento a pH 8.6 y cromatografías de intercambio iónico en Amberlita IRC 50, pH 6.3 y 6.7 y DEAE-Sephadex A50 a pH 8.5 todo con amortiguador de acetato de -- amonio. Hasta el momento han conseguido aislar y caracterizar estos venenos por su toxicidad y composición de aminoácidos 31 toxinas que tienen -- efecto tóxico sobre animales superiores o "toxinas para mamíferos" (Rochat y col., 1979).

Todas estas toxinas son proteínas de bajo P.M. (alrededor de 7,000), presentan un alto contenido de aminoácidos aromáticos y bajo contenido de Histidina y Fenilalanina, ausencia de Metionina y Presencia de 4 puentes de disulfuro. Además se aprecia un efecto sinérgico hasta de un 60%, al mezclar las fracciones tóxicas (Miranda y col., 1970).

El estudio comparado de los venenos del alacrán AaH pertenecientes a diferentes regiones geográficas del Norte de Africa mostraron -- diferencias en la composición de sus toxinas para mamíferos.

Se encontró que los alacranes colectados en Tozeur (Túnez) con tienen las toxinas I, II y I', en tanto los de Chellala (Algeria) presen-

Nota: Abreviaciones: AaH = Androctonus austalis Hector, Amm = Androctonus mauritanus mauritanus; Bop = Buthus occitanus paris; Bot = Buthus occitanus tunetanus; Lqq = Leiurus quinquestriatus quinquestriatus.

tan las toxinas I, II y III. Las toxinas I' y III se consideran isotoxinas de la toxina I, dado que la toxina I' difiere en la substitución de una Valina por una Isoleucina en la posición 17 (Rochat y col. 1970) y la toxina III por un mayor número de residuos de aminoácidos (Miranda y col. 1970). Esto es un ejemplo claro de la utilidad de las implicaciones taxonómicas derivadas de la información química, dado que esta diferencia genética sugiere una heterogeneidad taxonómica, que ha repercutido sobre la reconside-
ración de la taxonomía de estos alacranes.

También se ha obtenido en forma homogénea una toxina que ejerce su acción tóxica específicamente sobre insectos o "toxina para insectos", - Provenientes del veneno del AaH. Difieren tanto en composición de aminoáci-
dos, actividad, como en respuestas fisiológicas con las de mamíferos. Am-
bas son proteínas básicas, la primera tiene un PM de 7498, 4 puentes de ---
disulfuro, no contiene Metionina, se ha secuenciado en su totalidad y se en-
cuentra en menor proporción en el veneno total que las de mamíferos --
(Zlotkin y col. 1971). La segunda tiene 70 residuos de aminoácidos, no pre-
senta Metionina, Histidina ni Fenilalanina y al parecer contiene 5 puentes
de disulfuro (Zlotkin y col. 1976).

Los venenos de los alacranes americanos correspondientes al gé-
nero Centruroides también han sido estudiados. En C. sculpturatus que habi-
ta en Arizona y en el norte de México estudiado por el grupo de Watt en --
U.S.A., han aislado 4 toxinas activas en pollos, designadas I, II, III y IV
(McInstosh y Watt, 1973), de las cuales sólo de la toxina I se conoce toda
su estructura primaria (Babin y col. 1975) además se han purificado 3 varian-
tes que son tóxicas sobre insectos y en grandes cantidades sobre vertebra--

dos, las cuales han sido secuenciadas en su totalidad y muestran grandes homologías entre sí (Babin, y col. 1974).

García (1976), trabajando en el laboratorio de Miranda y RoCHAT aisló y secuenció dos toxinas para mamíferos del veneno del C. suffusus - suffusus.

Por otro lado, el grupo de Possani en México ha caracterizado los venenos de otros alacranes del género Centruroides y ha logrado purificar hasta el momento 15 toxinas de las especies C. noxius (Dent y col. 1980; Possani y col. 1981) C. elegans (Possani y col. 1978) y C. limpidus tecomanus (Possani y col. 1980) y han obtenido la secuencia N-terminal de 7 de ellas.

El veneno del alacrán sudamericano Tityus serrulatus fue inicialmente estudiado por el grupo de Diniz en Brasil. Purificaron dos toxinas para mamíferos denominadas Tityustoxina (TsTx) I y II, la segunda con una DL₅₀ más alta (Gómez y Diniz, 1966; Toledo y Neves 1976).

En forma independiente Possani en México ha trabajado con el veneno del Tityus serrulatus, inicialmente aisló y caracterizó 5 toxinas, de ellas, la más tóxica denominada Y, contiene 62 aminoácidos y una Metionina, y representó la primera toxina aislada que contenía Metionina, también se le determinó su secuencia N-terminal (Alagón y col. 1976; Possani y col. 1977). Posteriormente aislaron y obtuvieron la secuencia N-terminal de 4 toxinas denominadas II-11, III-10, III-8 y IV-5. Por análisis de aminoácidos y secuencia N-terminal la II-11 y la III-10 son iguales entre sí e iguales a la toxina Y caracterizada anteriormente, hasta los aminoácidos secuenciados (Possani y col. 1981c). Toledo y Neves (1976) determina-

ron de las toxinas TsTx I y II la composición de aminoácidos, la primera - presenta 1 Metionina y 4 puentes de disulfuro, en tanto que la II tiene -- dos Metioninas y 6 puentes de disulfuro. Las características más sobresalientes son la presencia de Metioninas en las toxinas y la presencia de 6 puentes de disulfuro, que es una excepción al igual que la toxina II del C. sculpturatus y la toxina para crustáceos del AaH.

Por otro lado la TsTx I y la toxina II-11 (III-10, Y) presen-- tan un patrón cromatográfico muy semejante, así como su composición de ami-- noácidos, posiblemente todas se refieran a una misma toxina, pero la res-- puesta final deberá aguardar hasta que se conozcan las secuencias totales de cada una de ellas.

El aislamiento de toxinas de alacranes menos venenosos ha sido poco investigado; sin embargo recientemente se han aislado varios componen-- tes del alacrán Scorpio maurus palmatus, perteneciente a la familia -- Chactidae, que poseen muy baja toxicidad sobre mamíferos, pero una sintoma-- tología muy distinta sobre insectos de la presentada por los venenos de los Buthidae. La fracción neurotóxica de este veneno produce una parálisis de acción rápida pero reversible y una de acción lenta pero letal y presentan cooperativismo entre ambas. De esta última fracción se aislaron y caracte-- rizaron química y farmacológicamente dos toxinas denominadas IT_1 , IT_2 de - 3232 y 3363 de peso molecular respectivamente (Lazarovici y col. 1982).

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 di-

ferentes especies de alacranes, alineando los aminoácidos con el mínimo de cambios por interconversión, suponiendo que han permanecido inalterados -- durante la evolución. Las secuencias presentan un 50% de homologías aproximadamente entre ellas y se han agrupado hasta el momento en 9 grupos estructurales con base en los aminoácidos faltantes. (Ver Tabla II, p. 71,72).

Esto podría indicar que los 9 grupos representan líneas evolutivas divergentes de un ancestro común (Rochat y col. 1970); Possani y col. 1977). El alto grado de homologías 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 peptídica (Zlotkin, y col. 1971). Recientemente, se ha sugerido que las toxinas de serpientes, alacranes y abejas evolucionaron de un polipéptido ancestral común, de la mitad del largo que las toxinas actuales, a través de duplicación génica interna y doblamiento génico (Erickson, 1978).

Es muy probable que la presencia de 4 puentes de disulfuro en proteínas tan pequeñas sean responsables 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.

De la toxina II de AaH se han determinado las posiciones de los puentes de disulfuro, utilizando enzimas proteolíticas: tripsina, quimo-- tripsina, papaina y termolisina, encontrando éstos entre los residuos 12-63, 16-36, 22-46 y 26-48 (Kopeyan y col. 1974). Con la variante 3 del -- C. sculpturatus se determinaron los puentes de disulfuro por cristalografía a resolución de 3 Å, hallando las uniones entre los residuos 12-65, --

16-41, 25-46 y 29-48 que son homólogos en las posiciones del AaH (Ver Tabla II). Esto ha sugerido la posibilidad de que los residuos de cisteína se aparezcan en posiciones homólogas en todas las toxinas para mamíferos -- (Fontecilla-Camps y col., 1980).

Con el objeto de obtener información sobre el sitio de acción, se han llevado a cabo varias modificaciones químicas sobre las toxinas del AaH I y II, encontrando que con la reducción de un puente de disulfuro, - modificaciones de carboxilados y acetilación de grupos aminos nulifican - la actividad de las toxinas, en tanto que el único residuo de triptofano no ejerce acción sobre el sitio activo. También la reacción con ácido - iodoacético inactiva ambas toxinas, en el caso de la toxina I se debe a - una modificación covalente con el residuo de Lisina en la posición 56, -- que sugiere su importancia sobre la toxicidad de estas proteínas (Sampieri y Habersetzer-Rochat, 1975; Chicheportiche y Lazdunski, 1970).

Los estudios sobre estructura secundaria y terciaria son escasos, se sabe, por técnicas de dicroísmo circular y resonancia magnética - nuclear que la toxina del alacrán C. noxius II.9.2.2 tiene cerca de 11% - de estructura α hélice y 22% de estructura plegada de tipo beta (Watters y col. 1981). Por otro lado, con la variante 3 del C. sculpturatus se ha -- determinado su estructura cristalina tridimensional a resolución de 3 Å, - presentando dos y media vueltas de α hélice y tres vueltas amplias de estructura antiparalela de β hélice que corre en forma paralela a la α hélice. La molécula tiene apariencia de un puño de la mano derecha, la α hélice corre a lo largo de los nudillos del puño y la β hélice sobre la unión entre el segundo y tercer dedo formando una porción densa con 3 puentes de

disulfuro, la muñeca corresponde a la porción C-terminal de la proteína -- (Fontecilla-Camps y col., 1980).

Además los venenos de alacranes presentan actividades enzimáticas que a diferencia del de las serpientes se encuentran en un porcentaje muy bajo y han sido descritas únicamente a nivel cualitativo sin haber sido aisladas y caracterizadas hasta el momento, a excepción de la hialuronidasa de C. limpidus limpidus (Alagón y Possani, 1981). En L. quinquestratus se detectó actividad de fosfolipasa A y B y de proteasa (Mohamed y col., 1969a, b), en Heterometrus fulvipes se encontró actividad de succinato-deshidrogenasa (Selvarajan y col. 1975), en Buthus talamus se separaron electroforéticamente las actividades proteolítica y fosfodiesterásica (Master y col., 1963). En los venenos de T. serrulatus (Possani y col., 1977), Scorpio maurus (Zlotkin y col., 1972), B. occitanus (Jaques, 1956) y C. noxius (Dent y col., 1980) se detectó actividad de hialurodinasa que al parecer es la única enzima constante en todas las especies de alacranes peligrosos y se supone que actúan como factor de difusión y penetración -- del veneno sobre su víctima.

También se ha encontrado la presencia de 5-hidroxitriptamina - en el veneno de L. quinquestratus (Adam y Weiss 1958, 1959a), que a pesar de encontrarse en mayores cantidades que en otros venenos de animales no juega ningún papel sobre el efecto tóxico del mismo.

4. Fisiología y Acción del Veneno

La sintomatología común presentada por el veneno de alacrán -- sugiere la participación del sistema nervioso autónomo, tanto del parasim-

pático (lagrimeo, salivación, hipotensión, etc.) como del simpático (midriasis, hipertensión, taquicardia, etc.) y su acción semeja tanto a sustancias parasimpaticomiméticas como la muscarina, como compuestos simpaticomiméticos como la adrenalina. Esto ha generado el estudio de los efectos cardiovasculares, respiratorio y neuromuscular que estos venenos producen en diferentes sistemas.

a) Efectos musculares

Los trabajos realizados por Adam y Weiss (1959) sobre músculo esquelético mostraron que la aplicación del veneno L. quinquestratus producía fuertes contracciones, originadas por una despolarización de la membrana, las cuales eran antagonizadas por altas concentraciones de calcio y potenciadas por bajas concentraciones de este ion, proponiendo que el veneno desplazaba el calcio del músculo. Sin embargo, la adición de tubocurarina que bloquea la respuesta a la acetilcolina no mostraba ningún efecto sobre la acción del veneno.

Trabajos más recientes sobre las uniones neuromusculares con veneno de T. serrulatus, C. suffusus, L. quinquestriatus y A. australis han demostrado que la despolarización es dependiente de calcio pero que los efectos producidos por el veneno son abolidos totalmente con d-tubocurarina, tetrodotoxina (TTx), bungarotoxina, magnesio y procaina y se propone la liberación de acetilcolina por acción del veneno sobre las uniones nerviosas, semejante al mecanismo que se produce en el impulso nervioso (Brazil y col. 1973; Lin y col. 1975). Esta acción excitatoria presináptica causada por la liberación de acetilcolina ha sido demostrada tanto en preparaciones en vertebrados (La Grange y Russell, 1971) como en artrópodos (Parnas y -

col. 1970).

Por otro lado se ha demostrado por varios estudios que el veneno es impermeable a la membrana excitable, esto sugiere que el veneno actúa sobre el área expuesta en las terminaciones del axón (Del Pozo y Anguiano, 1947; Katz y Edwards, 1972; Zlotkin y col. 1971). También se ha visto que el veneno del C. noxius no actúa sobre la inhibición de la colinesterasa -- (Del Pozo, 1948).

En preparaciones de músculo liso ha sido bloqueada con tetrodotoxina y atropina la activiación espasmódica autorrítmica producida por -- los venenos, sobre íleo de cobayo, de A. australis (Tazieff-Depierre, 1972; Tintpulver, 1975) y de C. sculpturatus (Patterson, 1962) y en íleo de rata con veneno de T. serrulatus (Cunha-Melo y col., 1973). Existen algunas -- diferencias observadas entre los venenos del A. australis y la Tityustoxina (TsTx) dado que en esta última la atropina produce un bloqueo parcial de la actividad espasmódica; sobre estas bases y algunas pruebas indirectas, se -- ha sugerido que la contracción originada por el veneno del T. serrulatus -- se debe a la liberación de más de un mediador, uno de ellos la acetilcolina y posiblemente la substancia P sea otro (Freire-Maia y col., 1976; Cunha-Melo y col. 1973); además se ha observado una respuesta relajatoria transitoria bloqueada por agentes simpaticolíticos que indican un origen adrenérgico. Estas diferencias no solo pueden indicar una diferencia en el modo de acción de las toxinas sino en las respuestas entre el íleo de rata y el de cobayo (Zlotkin y col., 1978).

Utilizando la toxina para mamífero, para crustáceo e insecto del veneno de A. australis se observó que sobre preparaciones de músculo liso -

de cobayo la toxina para crustáceo produce una contracción prolongada a -- diferencia del comportamiento espasmódico rítmico producido por el veneno total o las toxinas para mamífero, y que la toxina para insecto fue inactiva sobre la preparación demostrando su alta especificidad sobre el sistema neuronal de los insectos (Tintpulver y col., 1976).

b) Efectos cardiovasculares

Los efectos cardiovasculares parecen estar también mediados - por el sistema nervioso autónomo en particular por el simpático debido a un incremento en el nivel circulante de catecolaminas como la adrenalina, o la norepinefrina. Histológicamente se ha observado miocarditis, apreciándose ciertos cambios degenerativos de las fibras nerviosas, necrosis y edema intersticial (Gueron y Yarom, 1970). 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).

Una característica de todos los venenos de los alacranes de la familia Buthidae es producir un incremento en la presión sanguínea, al parecer se debe a una liberación de catecolaminas originada por una estimulación preganglionar, ganglionar o postganglionar del simpático, así como a una estimulación de la glándula adrenal, como se ha señalado con el género Centruroides (Del Pozo, 1956), con el veneno del Tityus (Corrado, 1974; -- Freire-Maia y col., 1970, 1974; Celeste Henríquez 1968) y con los géneros Leiurus, Androctonus y Buthus (Cheymol 1974). A esta hipertensión le sigue una hipotensión, atribuida en parte a un bloqueo senoauricular y aurículo-

ventricular.

Sobre vasos deferentes de cobayos se observó que una toxina del Lqg induce la liberación de norepinefrina, la cual es disminuída por hexametonio. Se propone un mecanismo exocitótico, dado que la enzima dopamina- β -hidroxilasa se libera junto con la norepinefrina en proporciones similares y sugiere que la toxina induce la liberación de catecolaminas por una acción directa sobre las neuronas adrenérgicas (Moss y col. 1974).

Los efectos bradicárdicos han sido también estudiados y son el resultado de la activación de fibras parasimpáticas. Freire-Maia y col, (1974) encontró que los efectos bradicárdicos con veneno de Tityus se incrementan con fisostigmina, decrecen con hexametonio y se eliminan con atropina, y que la taquicardia se antagoniza con propranolol, al parecer la bradicardia se debe a la liberación de acetilcolina y catecolaminas por la activación del ganglio vagal y de las terminaciones postganglionares del corazón. En concordancia con lo anterior Corrado y col. (1968) observó con el mismo veneno que la acción de éste se expresa mediante una pequeña y transitoria bradicardia, le sigue una respuesta fuerte y cronotrópica que se puede abolir con propranolol y se encuentra ausente en el corazón de los animales tratados con reserpina, sugiriendo que el veneno activa ambos componentes del sistema nervioso autónomo a nivel posganglionar, como producto de la liberación de neurotransmisores. Con los venenos de Lqg, AaH y Bot (Cheymol y col., 1974; Ismail y col., 1972, 1973), la acción cardíaca inicial es estimuladora mientras con el veneno de Tityus es inhibitoria y el propranolol antagoniza el efecto estimulador mientras la atropina antagoniza los efectos depresores.

Una diferencia importante son los datos obtenidos por Fayet -- (1974), el cual utilizando células de cultivo cardíaco de embrión de pollo y veneno de AaH encontró que la acción tóxica del veneno no se abate en -- las células tratadas con reserpina ni con DL-propranolol, es decir, se observa un efecto cronotrópico positivo y arritmia seguido por fibrilación y tetanización respectivamente. Aunque estos datos contradicen los datos an -- teriores sobre la acción de los venenos de alacrán sobre el corazón, la -- diferencia puede deberse a distintas respuestas al veneno de alacrán entre las células embrionarias del corazón y las preparaciones aisladas de éste (Zlotkin y col, 1978), como se ha observado con la TTX en diferentes eta -- pas del desarrollo embrionario del corazón de pollo (Shigenobu y Sperelakis, 1971).

Se ha investigado también en células de cultivo de corazón de embrión de pollo los efectos de 15 toxinas de diferentes venenos de alacra -- nes africanos y un mexicano (Couraud y col., 1980), observando que la afi -- nidad de las toxinas en las células depende del potencial de membrana, que son dependientes de la concentración de potasio externo y que estimula el desplazamiento del calcio por acción de las toxinas. La veratridina despo -- lariza completamente la membrana e impide que la toxina de alacrán inter -- actúe sobre ésta, además se aprecia que el veneno de C. suffusus suffusus (C.s.s.) es completamente inactivo sobre el movimiento del calcio y no des -- plaza la toxina II de AaH en las células de corazón, esto puede deberse a que actúan sobre diferentes receptores o que su afinidad es muy baja. El efecto sobre el sodio de la toxina probablemente se deba a una modifica -- ción del potencial de membrana inducido por la adición de la toxina. Un

efecto similar ha sido mostrado en sinaptosomas de cerebro (Jover y col., 1980) y en células de neuroblastoma (Catterall y col., 1976). Un estudio comparativo llevado a cabo en sinaptosomas entre la toxina II de AaH y la toxina II del C.s.s. sobre la unión a los sitios receptores, demostró que estas toxinas no competían entre sí y que la toxina del Centruroides es independiente del voltaje y presenta de 6 a 10 veces menos sitios receptores (Jover y col. 1980b).

Un estudio sobre rebanadas de corteza de cerebro de rata utilizando la TsTx, mostró que la toxina incrementa la liberación de acetilcolina (Gómez y col., 1973). El mismo efecto se ha observado en el hipotálamo, -hipocampo, corteza y estriado dado que se bloquea en presencia de TTX y es dependiente de sodio y calcio. Se presenta un mayor efecto sobre el hipocampo y la corteza y un menor efecto sobre el tálamo y en zonas del hipocampo donde hay menor liberación de acetilcolina (Macedo y Gómez, 1982). En sinaptosomas se ha observado que la TsTx causa la liberación de acetilcolina por un mecanismo de transporte de calcio al interior de las terminaciones sinápticas (Celeste-Henríquez, 1975).

c) Efectos sobre las membranas axonales

En los últimos años el intento de caracterizar los canales iónicos de las membranas excitables por diferentes técnicas, ya sea electrofisiológicas como la de voltaje-sostenido ("voltage-clamp") o microelectrodos, o bien por técnicas biofísicas como fluorescencia o biofringencia o por técnicas bioquímicas con ligandos específicos, ha cobrado un gran auge.

La utilización de las toxinas como herramientas útiles sobre estudios neurofisiológicos surgió a principios de los años 1960 cuando se supo que la TTX bloquea específicamente el canal de sodio (Narahashi y col. 1960, 1964) y que no tiene efecto directo sobre la liberación del transmisor en las terminaciones nerviosas (Katz y Miledi, 1967). Esto estimuló enormemente el estudio de una variedad de neurotoxinas de diversos animales, entre ellas las de los alacranes, para el empleo de la acción de éstas sobre los canales iónicos con el fin de poder elucidar las características funcionales de éstos sobre las membranas nerviosas.

Los efectos de los venenos de alacranes sobre los tejidos excitables probablemente resultan de la modificación de las propiedades de diferentes canales sensibles al voltaje. Se ha observado que la aplicación del veneno produce una despolarización sobre las membranas de las terminaciones nerviosas ocasionado por un incremento de la permeabilidad al sodio y una prolongación de la duración del potencial de acción.

Los primeros estudios con el veneno de Lqg mostraron que la inactivación sobre la dependencia del voltaje se cambia a un potencial de membrana más negativo, el retardo de la corriente de potasio hacia afuera se reduce a una tercera parte de su valor normal y el potencial de acción se prolonga marcadamente (Adam y col., 1966; Koppenhöfer y Schmidt, 1968).

Los trabajos posteriores sobre axones gigantes de calamar utilizando venenos de alacranes norteafricanos y toxinas puras de estos venenos, han confirmado estas observaciones y se ha visto que la unión de estas toxinas con el receptor son dependientes del voltaje (Narahashi y col., 1972; Romey col., 1975). Además, con la neurotoxina I del AaH se ha visto

que afecta el cierre del canal de sodio y la apertura del canal de potasio en los axones gigantes de calamar (Romey y col., 1975) y en células de neuroblastoma (Bernard y col., 1977).

Las toxinas de alacranes africanos incrementan la activación de los canales de sodio por ciertos agonistas como la veratridina, aconitina y grayanotoxina y modifican las curvas de concentración-efecto para la acción de las toxinas casi 20 veces a la concentración más baja (Catterall, 1975, 1977). Se ha propuesto un modelo alostérico que dice que las toxinas de alacranes reducen la energía requerida para la activación de los canales de sodio (Catterall, 1977).

En contraste, el veneno del C. sculpturatus sobre nódulos de Ranvier es completamente diferente; no tiene efecto sobre la inactivación, pero cambia la dependencia del voltaje de activación de 40 a 50 mV, a un potencial de membrana más negativo. Después de que la despolarización termina se desarrolla una corriente hacia adentro de sodio, que alcanza un máximo y decrece lentamente (Cahalan, 1975).

Utilizando las toxinas puras I, III, IV y V así como las variantes 1, 2 y 3 del mismo veneno se investigó sus efectos sobre el mismo sistema, encontrando diferencias entre ellas. Después del tratamiento con las toxinas III, IV y I, al producirse un pulso despolarizante, se produce un cambio transitorio de la curva de activación del sodio a potenciales más negativos. La toxina I actúa igual que la IV pero es 10 veces menos potente. Con la toxina V y las 3 variantes este cambio transitorio no se aprecia, pero causa una lenta e incompleta inactivación al sodio. La toxina IV no inhibe el efecto de la toxina V, lo que sugiere que las dos toxi-

nas actúan sobre diferentes receptores (Meves y col., 1982).

Estudios recientes con el veneno del C. noxius, utilizando axones gigantes de calamar, demostraron la existencia de dos toxinas denominadas II-10 y II-11, que en contraste con el veneno de los alacranes africanos, actúan específicamente sobre el canal de sodio y de potasio, respectivamente. La II-10 decrece la permeabilidad del sodio y la II-11 bloquea -- totalmente el canal de potasio, ambas actúan independientemente del voltaje y son totalmente reversibles (Carbone y col., 1982).

Se ha dicho que la acción del veneno del alacrán depende del incremento o decremento de la concentración de calcio. Altas concentraciones antagonizan los efectos excitatorios (Katz y Edward, 1972), en tanto la ---sensibilidad al veneno se incrementa a bajos niveles de calcio. Posiblemente el veneno del alacrán desplace los iones de calcio sobre las membranas - excitables y/o incremente su permeabilidad sobre los canales iónicos -- (Zlotkin, 1978). De la misma forma que las toxinas del alacrán, el efecto depresor de la TTX depende para su fijación del calcio de la membrana, necesario para incrementar la permeabilidad del sodio. Sin embargo, recientes investigaciones sobre células de cultivo de neuroblastoma han indicado que la TTX y el veneno de alacrán no compiten sobre los mismos receptores (Catterall, 1980).

Se ha visto que las neurotoxinas que alteran las propiedades -- del canal de sodio sobre las células de neuroblastoma son de 3 tipos diferentes (Catterall, 1979, 1980). En primer lugar la TTX y la saxitoxina son compuestos heterocíclicos y son inhibidores específicos del canal de sodio. En segundo lugar los compuestos policíclicos alcaloides solubles en lípidos

como la grayanotoxina, batracotoxina, veratridina y aconitina, despolarizan las células excitables incrementando la permeabilidad del sodio. En tercer lugar el veneno del alacrán Lqg y la toxina II de la anémona de mar Anemonia sulcata y la Antopleurina A de la anémona Anthopleura xanthogramnica (Catterall y Beneski, 1980; Catterall y Beress, 1978), causan potenciales de acción repetitivos en las células excitatorias e inhiben o bloquean la inactivación de los canales de sodio sensibles al voltaje y actúan cooperativamente con las toxinas alcaloides causando una activación persistente sobre los canales de sodio, sugiriendo que interaccionan específicamente con el mismo sitio receptor, el cual debe de ser un componente regulador del potencial de acción del canal de sodio. Recientemente se ha propuesto que el sitio receptor de estas toxinas sea un componente proteínico de 25 000 de peso molecular. Esto demuestra porqué tanto con células de neuroblastoma (Catterall y Beress, 1978; Courad y col., 1978) como en preparaciones de sinaptosomas (Jover y col., 1978), las toxinas de alacrán Lqg y AaH respectivamente son desplazadas por la toxina II de la anémona de mar A. sulcata. Por otro lado la acción del veneno del alacrán se bloquea no-competitivamente por TTX, indicando que estas toxinas actúan sobre sitios separados (Catterall, 1979), además de demostrarse que la TTX no es susceptible en las células embrionarias de músculo de corazón, en tanto son altamente afectadas por la toxina de alacrán (Courad y col., 1978).

d) Otros efectos

Se han estudiado los efectos de las toxinas para insectos y para crustáceos del AaH sobre larvas de moscas y crustáceos, las cuales causan una contracción corporal acompañada de una completa parálisis

(Zlotkin y col., 1972). Esta acción se ha atribuido a un efecto sobre los sistemas neurosecretores debido a una liberación de hormonas como la puparium (Fraenkel y Zlotkin, 1970). En todas las preparaciones estudiadas sobre la acción de estas toxinas, se observó un efecto estimulador muscular originado por una excitación presináptica sobre las terminaciones nerviosas, dando lugar a la liberación de neurotransmisores (Zlotkin y col., 1978).

5. Sintomatología y Dosis Letal

A pesar de que la toxicidad del veneno de los alacranes difiere ampliamente de una especie a otra, existe una gran semejanza entre la sintomatología de envenenamiento producido por la picadura de estos organismos.

El efecto tóxico del veneno sobre la víctima depende de varios factores: de la especie del alacrán, de la dosis de veneno inyectada, del volumen y del estado fisiológico de las glándulas, del peso, edad y estado de salud de la víctima, así como de su sensibilidad específica al veneno y del lugar del piquete (Hoffmann, 1938).

En general la sintomatología que se presenta es la siguiente: hiperestesia y dolor local intenso e inmediato, aunque no se produce ningún efecto visible sobre el sitio de inyección, entumecimiento de lengua y la garganta que produce dificultades para tragar, hiperexcitabilidad que con el tiempo puede conducir a una sensación de angustia, salivación y diaforesis excesiva, lagrimeo, midriasis y en casos severos es frecuente que se produzca exoftalmia y fotofobia y distensión gástrica. El pulso se in-

crementa y se vuelve arrítmico, la presión arterial se incrementa al principio y decrece por debajo de lo normal después. Se producen convulsiones y contracciones musculares, parálisis flácida con tetanización en los casos graves de los miembros inferiores, dificultades para respirar y la muerte se origina por una parálisis respiratoria que puede ocurrir de unos cuantos minutos a varias horas después de la picadura (Flores, 1963; Balozet, 1971; Zlotkin, 1978).

Debido a que el veneno del alacrán tiene un valor antigénico muy bajo y la inmunización en caballos requiere al menos de 8 meses para llevarse a cabo, no se puede obtener un suero de alto poder neutralizante. Sin embargo, su aplicación ha repercutido ampliamente en la disminución de la mortalidad por picadura de alacrán (Del Pozo, 1962). En México a pesar de que la picadura de alacrán ha representado una de las causas principales de mortalidad, los datos estadísticos al respecto son muy escasos. Un estudio realizado por Bravo-Becherelle y Mazzoti (1961) sobre las tasas medias medias anuales de defunciones por cada 100 000 habitantes entre los años de 1940-1949 y de 1957-1958, mostraron que los estados con un mayor índice son Colima, Nayarit, Guerrero y Morelos con una tasa de 83.7, 41.6, 41.5 y 13.3 respectivamente, e indican que más de 20,000 personas murieron por picadura de alacrán, 2,000 por mordedura de serpiente y 274 por arañas y el análisis de los datos sobre defunciones por edad, muestra que éstas ocurren entre edades de 0 a 1 año principalmente, de 1 a 4 años en segundo lugar y de 5 a 9 años en tercer lugar, obteniendo un total de 93.5% de morbilidad total (Mazzoti y Bravo-Becherelle, 1961).

Las diferencias atribuidas a los venenos de los alacranes radica en las dosis letales medias (DL₅₀) atribuidas a cada una de las especies,

éstas varían dependiendo de la especie estudiada y de su distribución geográfica. Sin embargo, existen diferencias de DL_{50} por la cepa de ratones estudiados, la ruta de inyección y la manipulación estadística de los datos.

Zlotkin y col. (1971) llevaron a cabo DL_{50} de 16 especies de alacranes en un solo experimento, sobre ratones y larvas de mosca utilizando el mismo método en todas y mostrando una tabla comparativa, a la cual se le pueden adicionar las especies de los alacranes americanos citados -- por otros investigadores (Ver Tabla I). En particular para el Tityus serrulatus existe una marcada diferencia entre la DL_{50} citada por Possani -- (1977) y por Zlotkin (1971) el primero obtiene una DL_{50} de 1.25 mg/kg y el segundo de 0.43 mg/kg, esto demuestra las posibles diferencias entre los criterios utilizados para determinar la DL_{50} . Sin embargo, puede decirse que la potencia letal de estos venenos radica entre .25 y 1.25 mg/kg y que las especies más potentes citadas hasta el momento, son el alacrán africano Leiurus quinquestriatus y el mexicano Centruroides noxius.

TABLA I. DOSIS LETALES MEDIAS (DL₅₀) SOBRE RATONES
Y SOBRE LARVAS DE MOSCAS DE DIFERENTES
ESPECIES DE ALACRANES

Espece de alacrán	DL ₅₀ mg/kg en ratón	DL ₅₀ mg/kg en larva
<u>L. quinquestriatus</u>	0.25	2.2
<u>C. noxius</u>	0.26 [†]	-
<u>A. aeneas aeneas</u>	0.31	0.5
<u>A. mauretanicus maur.</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 Dent y col. (1980)

* Tomado de Stahnke (1963)

6. El Alacrán de Nayarit

A pesar de la amplia distribución de los alacranes mexicanos, -- el estudio de sus venenos han empezado a ser estudiados en la última década. Sin embargo, desde 1938 Hoffmann menciona la utilidad de dichos estudios para la valoración específica de las diferencias morfológicas econ-- tradas y para el estudio zoogeográfico de los mismos.

Uno de los alacranes más interesantes, por ser el más ponzoñoso citado hasta el momento es la especie Centruroides noxius, la descripción de la especie se debe a Hoffmann (1932). Este alacrán habita en las lome-- rías y cerros del estado de Nayarit y sur de Sinaloa, es un animal de co-- lor moreno rojizo y mide entre 5 y 8 cms. de longitud.

Al C. noxius se le considera una especie endémica, desligada -- del resto de los Centruroides mexicanos, caracterizándose por una virulen-- cia especial de su veneno, más rápido y más intenso en su acción (Hoffmann y Vargas, 1935; Hoffmann, 1938).

Bioquímicamente su veneno ha sido muy poco estudiado. En esta tesis se presentan 3 trabajos realizados con el veneno de este alacrán, -- los cuales se llevaron a cabo con el objetivo de aislar y caracterizar los polipéptidos tóxicos que contiene, así como determinar la estructura prima ria de cada uno de ellos, para tratar de hacer estudios comparativos sobre las homologías que presentan con las secuencias de aminoácidos de otras -- tóxicas estudiadas, que sirvan como base para estudios taxonómicos, bioge-- gráficos y evolutivos de los alacranes. Una vez obtenidas las secuencias

de aminoácidos de estas toxinas se podrá determinar la localización del -- sitio activo de cada una de ellas.

Por otro lado, el aislamiento de estos polipéptidos permitirá - hacer estudios fisiológicos sobre el mecanismo de acción de estas toxinas en diversos sistemas, de tal manera que puedan llegar a ser útiles herramientas para estudios neurofisiológicos y bioquímicos.

A continuación se encuentran las copias de los artículos en referencia en donde se describen las metodologías y materiales empleados, -- los resultados obtenidos y una discusión limitada de los hallazgos. A seguir, en esta tesis se presentan algunos datos no publicados sobre la purificación de algunas toxinas y una discusión general en la cual se da un enfoque a los aspectos de la caracterización química de las diferentes -- toxinas.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TWO MAMMALIAN TOXINS FROM THE VENOM OF THE MEXICAN SCORPION *CENTRUROIDES NOXIUS* HOFFMANN*

MYRNA A. R. DENT,* LOURIVAL D. POSSANI,* † GUILLERMO A. RAMÍREZ,* and
PAUL L. FLETCHER, JR. †

*Departamento de Neurociencias, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, UNAM, Apartado
Postal 70-600, México 20, D. F., México

†Section of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, 06510, U.S.A.

(Accepted for publication 4 September 1979)

THE VENOM from the scorpions belonging to the genera *Buthus*, *Leiurus*, *Androctonus*, *Tityus* and *Centruroides* have been studied by several groups of investigators (ROCHAT *et al.*, 1970a, 1970b, 1972, 1976; BABIN *et al.*, 1974, 1975; ZLOTKIN, 1971; POSSANI *et al.*, 1977 and see review by TU, 1977). All these venoms contain more than one toxic polypeptide containing 60-66 residues crosslinked by four disulfide bridges (ROCHAT *et al.*, 1976). The genus *Centruroides* is widely distributed in Mexico and at least six species are very poisonous to mammals (HOFFMANN, 1938). Only the toxins from two species have been studied in detail; *Centruroides sculpturatus* Ewing (BABIN *et al.*, 1975) and *Centruroides suffusus suffusus* (ROCHAT *et al.*, 1976). We have recently described two toxins from *Centruroides elegans* Thorell (POSSANI *et al.*, 1978) and one from *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann (POSSANI *et al.*, 1980). *Centruroides noxius* Hoffmann apparently is the most toxic scorpion to man (HOFFMANN, 1938) but its toxins are little known. In the present communication we report a procedure for the purification of two toxins, from at least four toxic fractions, found in the venom of *Centruroides noxius* Hoffmann. Also included is preliminary information regarding the chemical composition of these toxins.

MATERIALS AND METHODS

Scorpions collected in the State of Nayarit (México) were anaesthetized with carbon dioxide and the venom was obtained by electrical stimulation of the telsons. The venom was recovered in double distilled water, centrifuged for 10 min at 18,000 g, and the supernatant was immediately processed. The lethality of the venom was tested in mice as previously described (POSSANI *et al.*, 1977). When small amounts of material required a toxicity test, two or three mice were injected i.p. with 2-3 µg of protein (by absorbancy at 280 nm) per g of mouse. The fractions injected into the mice were considered to be lethal when the mice died at this dose. This value is not an actual measurement of the potency of the toxins since the LD₅₀ value could be much lower than 2-3 µg/g mouse. Hyaluronidase and phospholipase activity were also determined as already published (POSSANI *et al.*, 1977). Protease activity was tested using Hide powder azure (Calbiochem, San Diego, Ca., U.S.A.) as reported by GLENN *et al.* (1973). The soluble venom was adjusted to 20 mM ammonium acetate buffer (pH 4.7) and applied to a Bio-Gel P-10 column (Bio-Rad Lab. Richmond, Ca.,

*Part of this paper was presented as an abstract during the XII Meeting of the Sociedad Mexicana de Bioquímica, in October 1978, Sans Luis Potosi, México. Part of this work was also presented at the Facultad de Ciencias-UNAM as partial requirement for the B.S. degree of Myrna Dent. This investigation was supported in part by an NIH Grant from NIGMS GM-21714 to Yale University Medical School.

†To whom reprint requests should be addressed.

U.S.A.) pre-equilibrated and eluted with the same buffer. Rechromatography of the toxic fractions was performed in a CM-Sephacrose CL 6B column (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). The most toxic fractions from this column were dialyzed against 20 mM ammonium acetate buffer at pH 4.7, and reappplied to an ion exchange column (CM-Cellulose-CM 32 from Whatman Inc., Clifton, NJ, U.S.A.). The dialysis was conducted using Spectrapor Type 3 tubing (mol. wt. \approx 3500 cut-off; Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, U.S.A.). The protein content, unless otherwise stated, was calculated assuming 1 absorbancy unit at 280 nm equal to 1 mg/ml, when measured in a quartz cell with 1 cm optical pathway. The homogeneity of the fractions was ascertained by polyacrylamide gel electrophoresis as described by REISFELD *et al.* (1962), with a minor modification. The β -alanine-acetate buffer was diluted two-fold. After dialysis of the pure toxins against water, they were lyophilized and processed for amino acid analysis as previously described (POSSANI *et al.*, 1980). Only analytical grade reagents and solvents were used for this work.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the soluble venom

The amount of venom obtained per scorpion was approximately 200 μ g (1409 scorpions gave 281 mg of soluble venom). The LD₅₀ value for albino mice (local Mexican strain) was 0.26 μ g/g weight (recorded 20 hr after i.p. injection). Polyacrylamide gel electrophoresis of the soluble venom revealed the presence of at least 12 protein bands, five of which were in substantial amounts (Fig. 1). Of the three enzyme activities tested, hyaluronidase was positive (with 10 μ g protein); phospholipase and protease were negative with sample concentrations up to 2 mg and 50 μ g of protein, respectively. These data indicate that the amount of venom obtained from *C. noxius* is less than that from the venom of *C. l. tecto-*

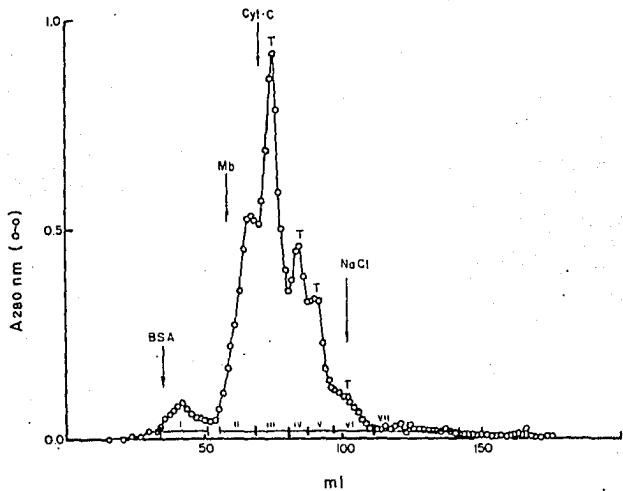


FIG. 2. GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY OF THE SOLUBLE VENOM. A solution of 1 ml containing 20.6 mg (by absorbance at 280 nm) of venom was applied in to a Bio-Gel P-10 column (1.25 \times 92.0 cm), equilibrated and eluted with 20 mM ammonium acetate buffer at pH 4.7. Fractions of 1 ml were collected at a flow rate of 10.8 ml/hr and pooled as fractions I-VII based on absorbance at 280 nm. The total column protein recovery was 98%. Fractions III-VI were lethal to mice (indicated by T in the Fig.) and correspond respectively to 27.6, 12.4, 12.4 and 6.5% of the protein recovered. Bovine serum albumin (BSA, mol. wt 66,200), myoglobin (Mb, mol. wt 17,800), cytochrome C (Cyt C, mol. wt 13,370) and sodium chloride (NaCl), were used as mol. wt markers.

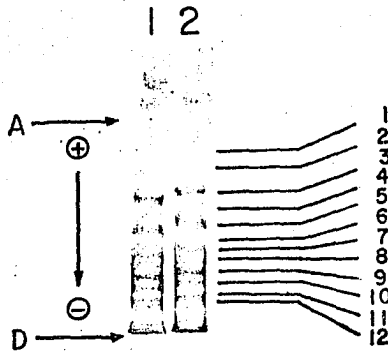


FIG. 1. ELECTROPHORESIS OF THE SOLUBLE VENOM.
Venom (1 = 100 µg protein; 2 = 80 µg protein) was run on polyacrylamide cylindrical gels (5.5 cm, 4 mA) containing 10 M urea in β-alanine-acetate buffer and stained with coomassie brilliant blue G-250. The proteins ran toward the cathode. Initially, 12 discrete bands were visible: five strong (3, 5, 9, 10, 11), three moderate (4, 7, 8) and four weak (1, 2, 6, 12). A is application point, D is tracking dye.

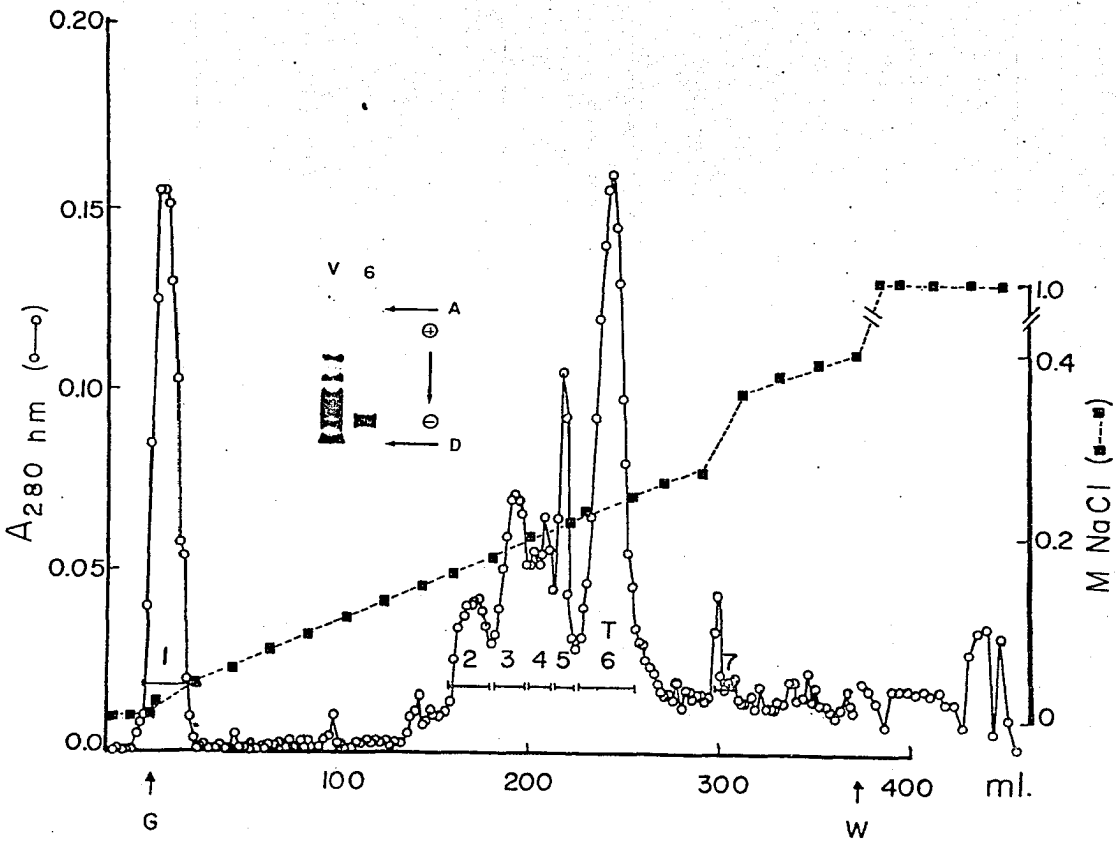


Fig. 3. Purification of toxin III - 4.6. Fraction III - 4 from the CM-Sepharese CL 6B column (7.5 mg of protein), was dialyzed and applied to a column (0.65 × 42 cm) of CM-cellulose. The column was eluted with a linear gradient containing 200 ml each of 30 mM ammonium acetate at pH 4.7, and 0.4 M sodium chloride in the same acetate buffer. The flow rate was 30 ml/hr and 2 ml fractions were collected. Horizontal bars indicate fractions pooled for characterization. T denotes toxic fraction (fatal to mice), G starting gradient and W washing with 1 M sodium chloride. Inset: discontinuous cylindrical polysacrylamide gels. V = soluble venom (100 µg protein) 6 = toxin III - 4.6 (100 µg protein), A = application point and D = tracking dye.

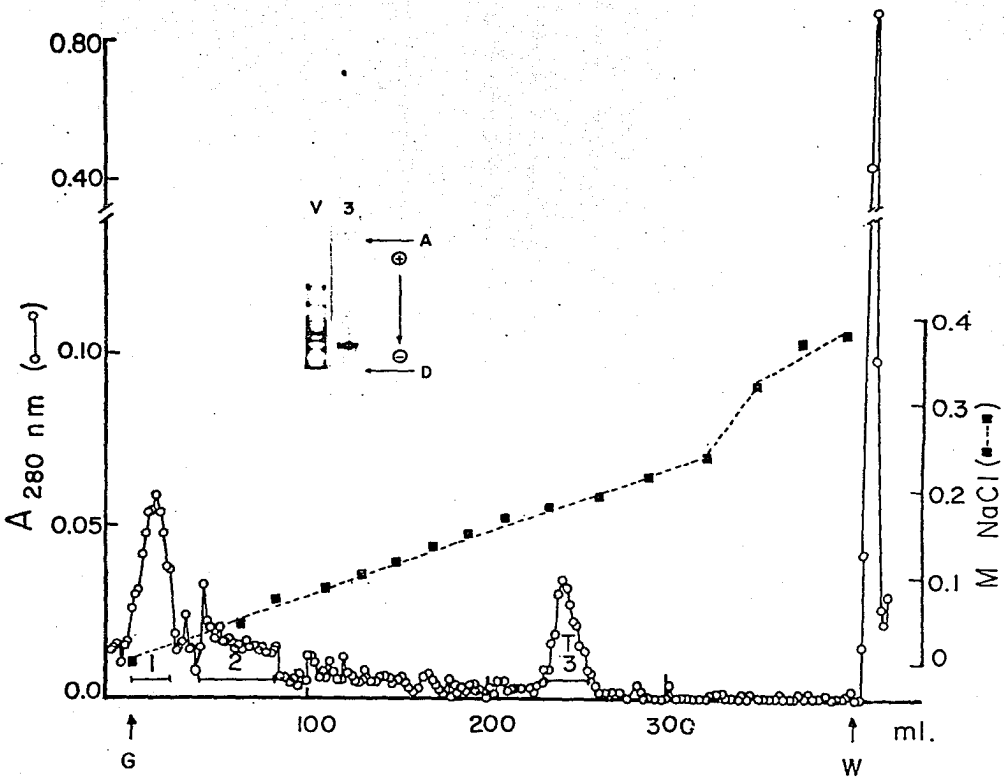


Fig. 4. Purification of toxin IV-2.3.

Fraction IV-2 from the CM-Sephrose CL 6B column (1.5 mg protein) was dialyzed and applied to a CM-celulose column under the same conditions as in Fig. 3. Inset: discontinuous cylindrical polyacrylamide gels; V = soluble venom (80 μg protein), 3 = toxin IV-2.3 (20 μg protein), A = application point and D = tracking dye.

manus (580 µg/scorpion) and *C. elegans* (740 µg/scorpion), but its toxicity is higher than that of *C. l. teomanus* (0.65 µg/g mouse) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello (LD₅₀ = 1.25 µg/g mouse), in comparable experimental conditions (POSSANI *et al.*, 1977, 1978, 1980).

Fractionation of the venom

The Bio-Gel P-10 column resolved the crude soluble venom into seven fractions. Duplicate samples were applied independently into the column giving the same pattern shown in Fig. 2. Fractions III-VI were lethal to mice and were further rechromatographed. The pooled fractions III from Fig. 2 (15.5 mg) were applied to a CM-Sepharose CL 6B column (0.5 × 24 cm) equilibrated with 20 mM ammonium acetate buffer at pH 4.7 and eluted with a linear gradient of sodium chloride from 0 to 0.5 M (75 ml each) in the same buffer. Tubes containing 1.2 ml of solution were collected at the flow rate of 9.3 ml/hr. Five fractions (data not shown) were resolved, from which fraction III-4 was lethal to mice and constitutes approximately 50% of the protein recovered (total column recovery = 93%). Fraction IV from Fig. 2 (6.7 mg) was similarly rechromatographed in the same CM-Sepharose CL 6B (data not shown). At least three sub-fractions were resolved. Fraction IV-2 was also lethal to mice and corresponded to 30% of the protein recovered (total column recovery = 92%).

Polyacrylamide gel electrophoresis of these fractions have shown more than one protein band. Further separation of fractions III-4 and IV-2 in a CM-Cellulose column gave seven and three sub-fractions respectively. The toxin III-4.6 (Fig. 3) was lethal to mice and homogeneous by gel electrophoresis. Similarly, toxin IV-2.3 was lethal to mice and homogeneous (Fig. 4). The last two chromatograms gave quantitative recoveries. Fractions V and VI from Fig. 2 were also further rechromatographed by ion exchange chromatography, but lack of material did not allow a complete characterization of these lethal components.

TABLE I. COMPARATIVE AMINO ACID COMPOSITION OF TOXIC PROTEINS ISOLATED FROM THE VENOM OF SCORPIONS

Amino Acid	Scorpion species*						
	C.n. III	C.n. IV	C.l.t. II	C.e. III	C.e. IV	C.s. I	C.s.s. II
Asp	4.44 = 5	2.44 = 4	5	5	5	6	5
Thr	1.78 = 2	1.33 = 2	3	3	2	5	3
Ser	4.09 = 5	6.03 = 9	2	2	5	2	4
Glu	6.80 = 8	5.38 = 8	7	8	5	5	7
Pro	1.27 = 1	0.67 = 1	2	2	1	3	2
Gly	7.23 = 8	7.37 = 11	8	8	6	9	6
Ala	3.57 = 4	2.65 = 4	3	3	4	0	3
Half-Cys	4.33 = 5-6	ND†	8	ND	4-5	8	8
Val	1.98 = 2	1.26 = 2	3	3	2	1	3
Met	0.05 = 0	0.10 = 0	0	0	0	0	0
Ile	0.92 = 1	0.65 = 1	1	0	1	1	0
Leu	3.67 = 4	1.20 = 2	4	4-5	3	4	6
Tyr	4.12 = 5	1.31 = 2	6	6	5	6	7
Phe	1.00 = 1	0.75 = 1	2	2	1	2	1
His	0.87 = 1	0.68 = 1	2	2	2	1	1
Lys	4.44 = 5	1.36 = 2	6	6	4	8	7
Trp	1.17 = 1	0.51 = 1	1	ND	1	2	2
Arg	1.37 = 2	0.26 = 1	2	2	2	1	1
Total	60-61	ND	65	ND	53-54	64	66
Calculated mol. wt	6623-6725		7335		6378-6480	7285	7545

*C.n. III = Toxin III - 4.6, and C.n. IV = Toxin IV - 2.3 from this work. The figures on the left are actual values (nmole of amino acid) used for obtaining the nearest integer value (figure on the right). C.l.t. II = Toxin II - 9.3 (POSSANI *et al.*, 1980). C.e. III and C.e. IV = Toxin III - 3 and III - 4 (POSSANI *et al.*, 1978); C.s. I = neurotoxin I (BARN *et al.*, 1975); C.s.s. II = Toxin II (ROCHAT *et al.*, 1976).

†Not determined.

Characterization of the pure toxins

Toxins were lethal at doses of 2.5–5 µg/20 g mouse. Although the LD₅₀ values were not determined the lethality of the pure toxins injected into mice (four mice for each toxin) have indicated that the toxins are at least as toxic or twice as toxic as the soluble venom. Mice treated with 1 µg toxin/20 g survived the injections. Toxins III–4.6 and IV–2.3 are basic proteins and apparently correspond to proteins 10 and 11 respectively, on the gel electrophoresis pattern of Fig. 1. The amino acid composition of both toxins is shown in Table 1. The calculated mol. wt for these toxins is similar to other toxins isolated from the genus *Centruroides* which are also shown in Table 1 for comparative purposes. Like all the other toxins from the *Centruroides* genus, toxins III–4.6 and IV–2.3 have no methionine (Table 1). Toxin III–4.6 has a total of 60–61 amino acid residues with five to six half-cystines instead of eight half-cystines found in most of the scorpions toxins. The amino acid composition of toxin III–4.6 is closely related to toxin II–9.3 from *C. l. tecomanus* and toxin III–3 from *C. elegans*. Toxin IV–2.3 has a much lower content of basic residues but a higher content of glycine and serine than the other toxins. Lack of material did not allow us to obtain the half-cystine content of toxin IV–2.3, but the present data leave little doubt that toxin III–4.6 and Toxin IV–2.3 are different proteins.

Acknowledgements—The authors are indebted to Dr. A. C. ALAGÓN for helpful discussions. The technical assistance of Mr. FREDY CORONAS and Mr. GARY DAVIS is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- BABIN, D. R., WATT, D. D., GOOS, S. M. and MLEJNEK, R. V. (1974) Amino acid sequence of neurotoxic protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Archs Biochem. Biophys.* **164**, 694.
- BABIN, D. R., WATT, D. D., GOOS, S. M. and MLEJNEK, R. V. (1975) Amino acid sequence of neurotoxin I from *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Archs Biochem. Biophys.* **166**, 125.
- GLENN, A., BOTH, G., MCINNIS, J., MAY, B. and ELLIOT, W. (1973) Dynamic state of the messenger RNA pool specific for extracellular protease in *Bacillus amyloliquefaciens*: its relevance to the mechanism of enzyme secretion. *J. mol. Biol.* **73**, 221.
- HOFFMANN, C. (1938) Nuevas consideraciones acerca de los alacranes de México. *An. Inst. Biol.* **9**, 317.
- POSSANI, L. D., ALAGÓN, A. C., FLETCHER, JR., P. L. and ERICKSON, B. W. (1977) Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Archs Biochem. Biophys.* **180**, 394.
- POSSANI, L. D., RAMIREZ, G. A., FLETCHER, JR., P. L. and GURROLA, M. A. H. (1978) Isolation of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides elegans* (Thorell). *FEBS Lett.* **91**, 261.
- POSSANI, L. D., FLETCHER, JR., P. L., ALAGÓN, A. B. C., ALAGÓN, A. C. and JULIA, J. Z. (1980) Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon*, **18**, 175.
- REISFELD, R. A., LEWIS, U. J. and WILLIAMS, D. E. (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature, Lond.* **195**, 281.
- ROCHAT, C., ROCHAT, H., MIRANDA, F. and LISSITZKY, S. (1967) Purification and some properties of the neurotoxins of *Androctonus australis* Hector. *Biochemistry* **6**, 578.
- ROCHAT, H., ROCHAT, C., KUPEYAN, C., MIRANDA, F., LISSITZKY, S. and EDMAN, P. (1970a) Scorpion neurotoxins: a family of homologous proteins. *FEBS Lett.* **10**, 349.
- ROCHAT, H., ROCHAT, C., MIRANDA, F., LISSITZKY, S. and EDMAN, P. (1970b) The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* **17**, 262.
- ROCHAT, H., ROCHAT, C., SAMPIERI, F. and MIRANDA, F. (1972) The amino acid sequence of neurotoxin II of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* **28**, 381.
- ROCHAT, H., KOPEYAN, C., GARCIA, L. G., MARTINEZ, G., ROSSO, J. P., PAKARIS, A., MARTIN, M. F., GARCIA, A., MARTIN-MOUTOT, N., GREGOIRE, J. and MIRANDA, F. (1976) Recent results on the structure of scorpion and snake toxins. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins*, Vol. 2, p. 79 (OSAKA, A., HAYASHI, K. and SAWAI, Y., Eds.). New York: Plenum.
- SWANK, R. T. and KUNKRES, K. D. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **39**, 462.
- TU, A. T. (1977) Scorpion Venoms. In: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, p. 459 (TU, A. T., Ed.). New York: John Wiley.
- ZLOTKIN, F., MIRANDA, F., KUPFYAN, C. and LISSITZKY, S. (1971) A new toxic protein in the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Toxicon* **9**, 9.

Material Anexo al Artículo de Dent y col., 1980

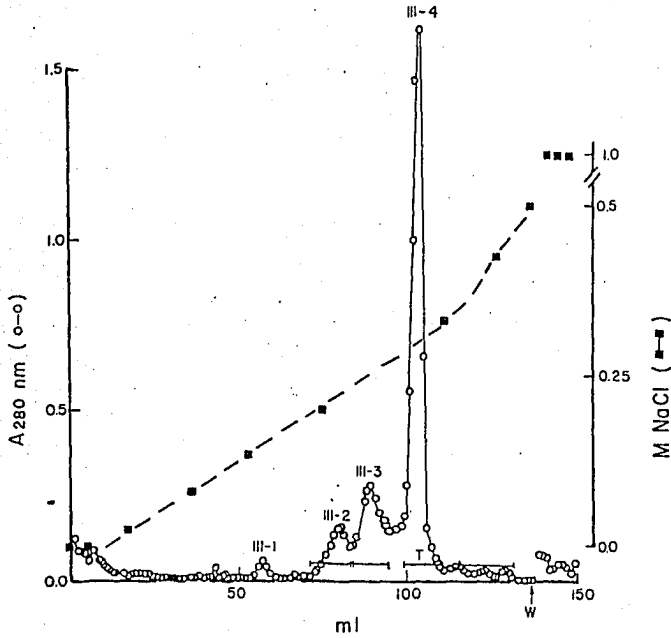


Figura 5. Cromatografía de intercambio iónico de los componentes tóxicos. La fracción II de la Fig. 2 (15.5 mg) se aplicó a una columna de CM-Sepharosa Cl 6B (0.5 x 24 cm) equilibrada en amortiguador de acetato de amonio 0.02M, pH 4.7 y eluida con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0.0 - 0.5 M (75 ml cada uno) en el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 1.2 ml a una velocidad de flujo de 9.3 ml/hr. Se obtuvo una recuperación del 93% de la proteína total aplicada y la fracción III-4 representa al 52% de la proteína recuperada.

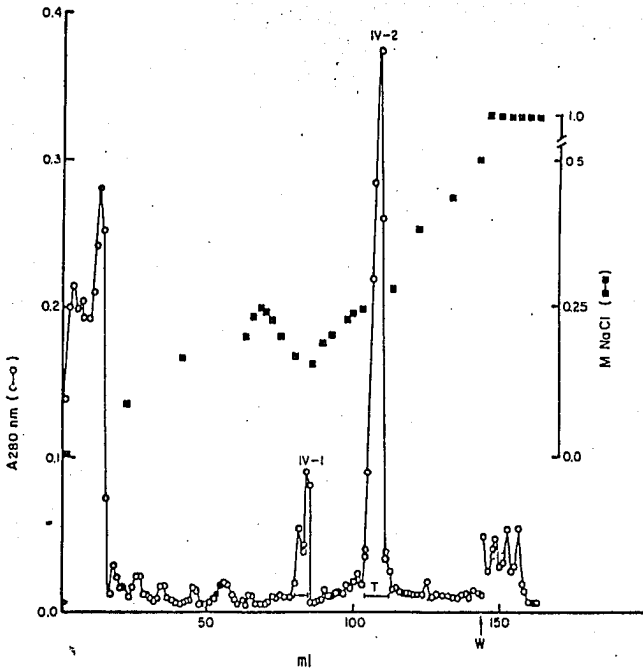


Figura 6. Cromatografía de intercambio iónico. La fracción IV de la Fig. 2 (6.7 mg) se aplicó en una columna de CM-Sepharosa CL 6B, bajo las mismas condiciones de la Fig. 5. Se obtuvo una recuperación del 92% de la proteína total aplicada.

BBA 38696

PRELIMINARY SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF SIX TOXINS FROM LATIN AMERICAN SCORPIONS

LOURIVAL POSSANI^a, WAYNE E. STEINMETZ^{b,*}, MYRNA A.R. DENT^a, ALEJANDRO C. ALAGÓN^a and KURT WÜTHRICH^b

^a *Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-247, México 20, D.F. (México)* and ^b *Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule, CH-8093 Zürich-Hönggerberg (Switzerland)*

(Received December 29th, 1980)

Key words: Toxin conformation; Circular dichroism; NMR; (Scorpion)

This paper reports on spectroscopic studies of six toxins from the Latin American scorpions *Centruroides noxius* Hoffmann, *Centruroides elegans* Thorell and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. The isolation and purification of five of these toxins was described previously. The preparation of toxin II.9.2.2 from the venom of *C. noxius* is first described here. Circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectra indicate similarities and differences between these scorpion toxins and previously characterized snake toxins. While there is evidence that the toxins from scorpions and snakes both contain extended β -sheet secondary structures, the spectral properties of the scorpion toxins are overall of a different type from those of snake toxins. Among the six scorpion toxins those from *T. serrulatus* have spectral properties markedly different from those of the *Centruroides* species. Furthermore, thermal denaturation and amide proton exchange measurements showed that the globular structures of the *Tityus* toxins were markedly less stable and less rigid than those of the *Centruroides* toxins.

Introduction

Several toxins have been isolated from the venom of scorpions belonging to the family Buthidae, genus: *Androctonus* [1–4], *Buthus* [5,6], *Centruroides* [7–12], *Leiurus* [5,6] and *Tityus* [13–15]. All these venoms contain several toxic polypeptides which differ in amino acid composition and in the degree of toxicity toward various vertebrate and invertebrate animals. The toxins contain from 57–78 amino acid residues and are usually crosslinked by four disulfide bridges [16]. For some scorpion toxins the amino acid composition and the sequence are known and attempts have been made to correlate the primary

structures with the biological activity [6,17–19]. A comparative analysis of the amino acid sequences of scorpion, snake and bee toxins has also been made [6,17–19]. However, little work has as yet been done on the three-dimensional structures of scorpion toxins and their correlations with the physiological activity.

In this communication we describe CD and NMR data obtained on toxins from *Centruroides noxius* Hoffmann and *Centruroides elegans* Thorell (from Mexico) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello (from Brazil). Furthermore, the purification and characterization of a new scorpion toxin extracted from the venom of *C. noxius* Hoffmann is described.

Materials and Methods

Preparation of the scorpion toxins

The scorpions from the species *C. noxius* and

* On leave from Seaver Chemistry Laboratory, Pomona College, Claremont, CA 91711, U.S.A.
Abbreviations: TSP, sodium 3-trimethylsilyl-[2,2,3,3-²H₄]-propionate; SDS, sodium dodecyl sulfate.

C. elegans were collected in the States of Nayarit and Jalisco (Mexico), respectively. The animals were anaesthetised with carbon dioxide and the venom was obtained by electrical stimulation of the telsons. The venom was recovered in doubly distilled water, centrifuged for 10 min at 18000 \times g and the supernatant was immediately lyophilized and stored at -20°C . The venom from the Brazilian scorpion *T. serrulatus* was a gift from the Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil.

Analytical grade reagents and solvents were used. Sephadex G-50 (medium) was from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). CM-cellulose type CM-32 was from Whatman Inc. (Clifton, NJ, U.S.A.). Bio-Rex-70 was from Bio-Rad Laboratories (Rockville Centre, NY, U.S.A.). Methanesulfonic acid was from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, U.S.A.).

The toxicity of samples isolated during purification was determined by intraperitoneal injection of variable amounts of each component (2–100 μg per 20 g body weight) to albino mice (Mexican strain) [11–12]. Hyaluronidase activity was determined by the method of Tolskdorf et al. [20]. Unless otherwise stated, the amount of protein was calculated assuming that 1 absorbancy unit at 280 nm is equal to 1 mg/ml.

The γ -toxin from *T. serrulatus* was obtained by a similar technique, as previously described [15], with two minor modifications. The first step, gel filtration on Sephadex G-50 column, was performed in a longer column (0.9 \times 200 cm). The second chromatography (CM-cellulose) involved elution with a sodium chloride gradient from 0 to 0.5 M NaCl. Both columns were run with 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7. The last step of purification was as previously reported [15]. The toxins from *C. noxius* were purified by a new method, which is described in the following section. The toxins from *C. elegans* were purified essentially by the same technique as that used for *C. noxius* toxins.

Purification of toxin II.9.2.2 from *C. noxius*

The lyophilized venom was resuspended in 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7, and applied to a Sephadex G-50 column. Three components were obtained (Fig. 1). Fraction I contains hyaluronidase activity (7100 units/mg protein) and constitutes 12.5% of the total soluble venom (Fig. 1). Fraction II is the major fraction (71.5%) and is the only toxic fraction. Fraction III corresponds to the lowest molecular weight components and adds up to 15.5% of the total. The final protein recovery from this column

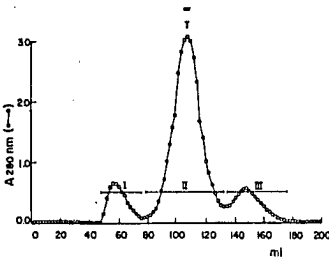


Fig. 1. Sephadex G-50 gel filtration of the soluble venom from *C. noxius*. A Sephadex G-50 (medium) column (0.9 \times 200 cm) was equilibrated and run in 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7. A total of 85 mg soluble venom in 1.5 ml was applied to the column and run at a flow rate of 18 ml/h. Fractions of 2 ml were collected. Fractions I–III were pooled according to the absorbancy at 280 nm and tested for toxicity. T denotes toxic fraction.

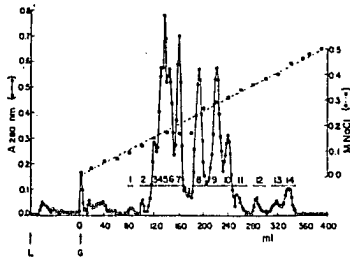


Fig. 2. Ion-exchange purification of the toxic components from the venom of *C. noxius*. Fraction II from Fig. 1 was chromatographed on a CM-cellulose (CM-32 Whatman) column (0.8 \times 30 cm). A total of 55 mg protein in 52 ml solution was applied to the column. A linear gradient (200 ml each) of NaCl from 0 to 0.5 M was run in the presence of 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7, at a flow rate of 30 ml/h. Fractions of 2 ml were collected and pooled as shown by the horizontal bars to give fractions I to 14, based on absorbancy at 280 nm. Components II-8 to II-11 and II-13 were lethal to mice and constitute 14.3, 16.8, 7.4, 1.7 and 1.5% of the final protein recovery, respectively. L indicates where the column started loading, G where the gradient started.

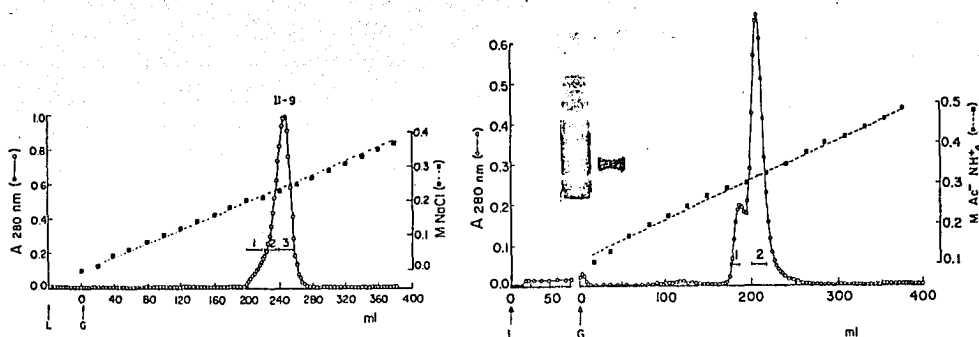


Fig. 3. Rechromatography of the toxic component II-9 from the venom of *C. noxius*. The toxic components II-9 from several columns similar to that presented in Fig. 2 were pooled, dialysed against 20 mM ammonium acetate pH 4.7 and rechromatographed on a CM-cellulose column (0.5 × 41 cm) under the same conditions as in Fig. 2. 75.5 ml solution containing a total of 27.8 mg protein was applied to the column. Arbitrary fractions II-9-1, II-9-2 and II-9-3 constitute 8.3%, 25.6% and 66.1% of the total protein recovered, respectively. The three fractions were toxic to mice. L and G have the same meaning as in Fig. 2.

Fig. 4. Final purification of the toxin II.9.2.2 from the venom of *C. noxius*. The last two toxic components from Fig. 3, II.9.2 and II.9.3, were pooled and rechromatographed under the designation of toxin II.9.2 on a Bio-Rex 60 column (0.9 × 9.3 cm) prepared according to Karlsson [21]. A total of 22.6 mg protein in 75 ml solution was applied to the column. A linear gradient (200 ml each) of ammonium acetate buffer, pH 6.5, from 0.09 M to 0.5 M, was run at a flow rate of 24 ml/h, collecting fractions of 2.2 ml. Two main toxic components were obtained, II.9.2.1 and II.9.2.2, which constitute 17 and 71%, respectively, of the total protein recovered. L and G have the same meaning as in Fig. 2. Inset: Polyacrylamide gel electrophoresis in the urea- β -alanine-acetate system described by Reisfeld [22]. Left lane, total venom (100 μ g); right lane, purified toxin II.9.2.2 (100 μ g) used for amino acid analysis and structural analysis by CD and NMR.

was 93%. When fraction II was rechromatographed on a CM-cellulose column (Fig. 2) approx. 14 different components were obtained, of which the fractions II-8 to II-11 and II-13 were toxic to mice. The toxic fraction II-9 constitutes 16.8% of the total protein. When it was further rechromatographed under the same conditions, the pattern shown in Fig. 3 was obtained. Since the components 2 and 3 were not resolved in this step (Fig. 3) they were pooled and rechromatographed on a Bio-Rex-70 column (Fig. 4) [21]. The last three columns have final recoveries of 93, 86 and 73%, respectively. The pooled fractions II.9.2 and II.9.3 (Fig. 3) constitute 92% of the material recovered, while toxin II.9.2.2 (Fig. 4) is 71% of the total protein recovered. Toxin II.9.2.1 obtained from the first six tubes (see horizontal bar labelled 1 in Fig. 4) and toxin II.9.2.2 obtained from the nine tubes on the second peak (see horizontal bar labelled 2 in Fig. 4) were homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis in the β -alanine-acetate-urea system described by Reisfeld et al. [22] (Fig. 4), and by

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using the glass capillary technique developed by Rüchel [23]. Toxin II.9.2.2 was hydrolyzed in duplicate at 110°C for 20, 48 and 72 h in 6 M hydrochloric acid [24] or in 4 M methanesulfonic acid containing 0.2% 3-(2-aminoethyl)indole [25] for 20 h and analyzed on a Beckman Instruments Model 120 B amino acid analyzer modified for high sensitivity. The amino acid analysis of the toxin (Table I) revealed the presence of 65 amino acids with a calculated molecular weight of 7371 ± 7 . The toxin has eight half-cystines and no methionine, which coincides with observations for other scorpion toxins.

A comparison of the NMR spectra of the II.9.2.2 and II.9.2 toxin preparations (Figs. 5 and 6) demonstrates the efficacy of the final purification procedures. The spectrum of the II.9.2 toxin exhibits weak peaks due to minor protein components at -0.43 , -0.03 , 0.42 , 6.21 and 6.33 ppm, whereas these peaks are absent or their intensities greatly diminished in the spectrum of the II.9.2.2 toxin. The toxicity of

TABLE I

AMINO ACID COMPOSITION OF TOXIN II.9.2.2 FROM *C. NOXIUS*

Values are expressed in residues per mol. Corrected values were calculated by taking the number of residues per mol of aspartic acid, glutamic acid, alanine, leucine, phenylalanine and histidine to be 6, 7, 4, 6, 1 and 1, respectively.

Amino acid	6 M HCl hydrolysis				Corrected values	Nearest integer
	20 h	20 h	48 h	72 h		
Lysine	4.78	5.53	5.04	4.59	7.76	8
Histidine	0.64	0.63	0.59	0.70	1.00	1
Arginine	1.21	1.29	1.05	1.30	1.89	2
Tryptophan ^a	1.13	1.22	- ^a	- ^a	1.17	1
Aspartic acid	3.43	3.61	3.55	4.74	5.99	6
Threonine	1.15	1.25	1.08	1.26	1.85	2
Serine	0.67	0.74	0.56	0.57	0.99	1
Glutamic acid	4.32	4.79	4.45	4.97	7.22	7
Proline	1.17	1.10	1.07	1.25	1.79	2
Glycine	4.69	4.34	4.14	5.18	7.15	7
Alanine	2.76	2.84	2.44	2.76	4.21	4
Half cystine ^b	4.83	4.76	3.90	3.62	7.60	8
Valine	1.84	1.06	1.18	1.13	1.72	2
Methionine	trace	trace	trace	trace	0	0
Isoleucine	0.35	0.40	0.52	0.57	0.72	1
Leucine	3.56	3.71	3.43	3.77	5.64	6
Tyrosine	4.12	4.25	3.69	2.55	5.69	6
Phenylalanine	0.51	0.69	0.65	0.61	0.95	1
Total						65
Calculated molecular weight						7371

^a Tryptophan was obtained after 4 M methanesulfonic acid hydrolysis [25] for 20 h. The values of the basic amino acids obtained from the HCl hydrolyzates were taken as the reference.

^b Taking the value after 20 h hydrolysis.

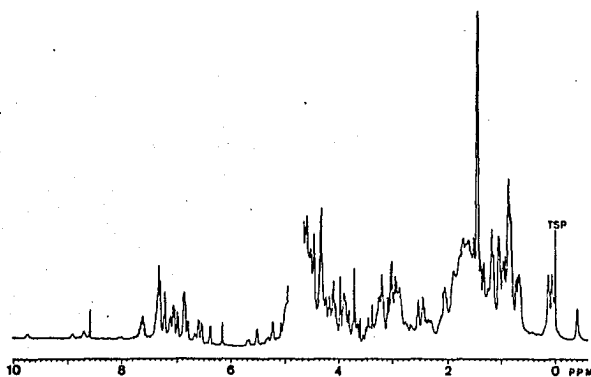


Fig. 5. 360 MHz ^1H NMR spectrum of an approx. 2 mM solution of the toxin II.9.2.2 from *C. noxius* in $^2\text{H}_2\text{O}$, p^2H 2.8, $T = 24^\circ\text{C}$. The spectrum was recorded after the amide protons had been partially exchanged with deuterium of the solvent. In particular, the amide proton observed at 10.33 ppm in the toxin preparation II.9.2. (Fig. 6,E) was also present in freshly prepared solutions of II.9.2.2 and was exchanged when the present spectrum was recorded. The large water peak at approx. 4.8 ppm has been deleted.

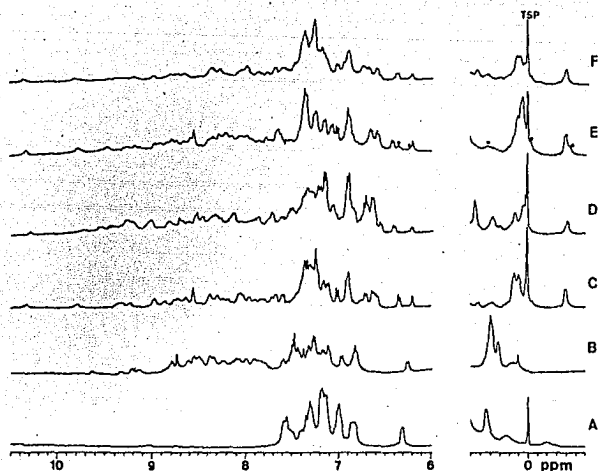


Fig. 6. 360 MHz ^1H NMR spectra of six scorpion toxins. The spectra are displayed in the amide, aromatic and extreme high-field regions where a comparison of the spectra is most informative. Unless otherwise noted, the temperature was 22°C . The accumulation of spectra was initiated immediately (within 20 min) after dissolution of the toxins in $^2\text{H}_2\text{O}$. A, *T. serrulatus* II.5.3, p^2H 7.0; B, *T. serrulatus* gamma, p^2H 2.5, 23°C . The sample contained no TSP as reference and the chemical shift scale is based on the spectrum of a p^2H 6.4 sample that did contain TSP. The spectrum at p^2H 6.4 showed no amide proton resonances; C, *C. elegans* II.6.1, p^2H 5.6; D, *C. elegans* II.7.1, p^2H 6.2; E, *C. noxius* II.9.2, p^2H 5.5. The peaks marked with * are due to impurities and are absent in the spectrum of the II.9.2.2 preparations (Fig. 5); F, *C. noxius* II.10.2, p^2H 6.4.

toxin II.9.2.2 was evaluated by intraperitoneal injection into several mice. At a dose as low as $0.2 \mu\text{g}/\text{g}$ mouse weight, the toxin was sufficient to kill the tested animal with all the symptoms of scorpion envenomation.

Toxin II.10.2 was obtained by rechromatography of toxin II.10 (Fig. 2) in a CM-cellulose column with results similar to those in Fig. 3 (data not shown).

NMR and CD spectroscopy

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker HXS-360 spectrometer. Selective nuclear Overhauser effects were measured as described previously [26]. The samples were prepared by dissolving approx. 5 mg toxin in 0.4 ml of 99.8% $^2\text{H}_2\text{O}$. If necessary, the p^2H was adjusted by addition of microliter amounts of $0.1 \text{ M } ^2\text{HCl}$. p^2H values were measured using a normal glass electrode without any isotope effect correction [27]. The samples initially prepared had a large water signal. Therefore, once the amide proton exchange measurements were completed, the samples

were lyophilized and the toxins were redissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$. Chemical shifts are reported with respect to internal TSP.

CD spectra were recorded on a Jasco J-500A spectropolarimeter using thermostat-controlled cells with 0.2 and 1.0 mm pathlengths. The toxin concentration was between 3 and 25 mg/ml. The denaturation temperature was determined by following the ellipticity as a function of temperature at a fixed wavelength. The wavelength was chosen in the backbone region at the extremum in the room temperature CD spectrum (see Fig. 7).

Results

^1H NMR and CD spectra of the following toxins were recorded: *T. serrulatus*, II.5.3 and gamma; *C. elegans*, II.6.1 and II.7.1 and *C. noxius*, II.9.2, II.9.2.2 and II.10.2. Fig. 5 shows the entire ^1H NMR spectrum of *C. noxius* II.9.2.2. In Fig. 6 the spectral region of high-field-shifted aliphatic protons from

-0.5 to 0.5 ppm and the region of the aromatic and amide protons from 6.0 to 10.5 ppm are shown for the other six proteins. Fig. 7 presents the CD spectra for six of the proteins.

In order to measure the relative stability of these toxins, the deuterium exchange of the amide protons was followed in the ^1H NMR spectra [29] at 22°C at $p^2\text{H}$ values between 5.5 and 6.5. Whereas the *Tityus* toxins exhibited complete exchange in a matter of minutes, the amide proton exchange of the *Centruroides* toxins was incomplete after incubation at 22°C for several days. Overnight incubation at 40°C was required to complete the exchange. The measurements on the *T. serrulatus* gamma toxin were repeated at a lower $p^2\text{H}$, 2.5. Based on studies of model peptides and various proteins, the exchange rate at the lower $p^2\text{H}$ is expected to be lower by two to three orders of magnitude [28-30]. The exchange was still complete within 1 day.

The amide proton-exchange measurements were supplemented by a determination of the denaturation temperature via CD measurements of two toxins: the gamma toxin of *T. serrulatus* and the II.9.2 toxin of *C. noxius*. The denaturation results for the purified II.9.2.2 toxin would be expected to be identical to

the II.9.2 results, as the NMR spectra show that the impurity in II.9.2 is a minor component (less than 10 mol%). The denaturation curve of ellipticity versus temperature for the *Tityus* toxin at $p^2\text{H}$ 3.9 is displayed in Fig. 8. If a two-state model (native and denatured protein) is assumed, a thermodynamic analysis of the denaturation curve yields a denaturation temperature (at which the native and denatured forms have equal mole fractions) of 51°C. The toxin is completely denatured at 75°C, as evidenced by the denaturation curve and a featureless CD spectrum. On the other hand, the *Centruroides* toxin at $p^2\text{H}$ 3.9 is only incompletely denatured at 90°C. Finally, the room temperature CD spectra before and after heating were identical, demonstrating that the thermal denaturation was reversible. The thermal denaturation of the *Tityus* toxin was also studied at $p^2\text{H}$ 2.5, where a denaturation temperature of 38°C was obtained. The decrease of the denaturation temperature with increasing acidity is probably due to the protonation of one or more charged groups which are involved in maintaining the tertiary structure. A similar effect was previously observed by Chicheportiche and Lazdunski [31] in a study of neurotoxin II from the North African scorpion *Androctonus austra-*

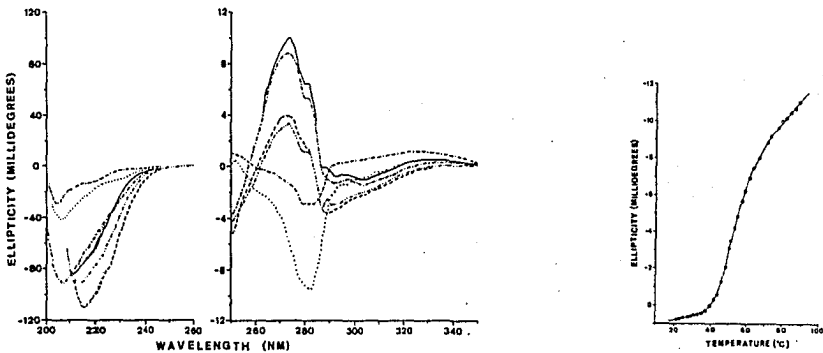


Fig. 7. Circular dichroism spectra of six scorpion toxins. Unless otherwise noted, the protein concentration was approx. 10 mg/ml, the solvent was $^2\text{H}_2\text{O}$ and the temperature was 20°C. The cell pathlength was 1.0 mm for the long wavelength portion displayed and 0.2 mm for the short wavelength portion., *T. serrulatus* II 5.3., $p^2\text{H}$ 6.8, 25 mg/ml;, *T. serrulatus* gamma, $p^2\text{H}$ 6.4, 5 mg/ml; ———, *C. elegans* II.6.1, $p^2\text{H}$ 4.0; - - - - -, *C. elegans* II.7.1, $p^2\text{H}$ 5.1; - - - - -, *C. noxius* II.9.2, $p^2\text{H}$ 4.7; - - - - -, *C. noxius* II.10.2, $p^2\text{H}$ 5.3.

Fig. 8. A temperature denaturation curve measured by circular dichroism of the gamma toxin of *T. serrulatus* at $p^2\text{H}$ 3.9. The concentration was approx. 5 mg/ml. A 0.2 mm pathlength cell was used and the ellipticity was measured at 228.5 nm.

lis Hector. They also observed that an isothermal shift in the pH resulted in very dramatic changes in the CD spectrum. These changes were attributed to the presence of a pH-sensitive equilibrium between different spatial structures of the toxin. In contrast, the CD spectra of the *Tityus* toxin at p²H 2.5 and 3.9 are qualitatively identical, which indicates that no major conformational rearrangements occur in the pH range studied.

In the CD spectra (Fig. 7) the backbone region from 200 to 250 nm is very similar for the four *Centruroides* toxins. They all show strong negative ellipticity with a peak at 208–215 nm. The two *Tityus* toxins are qualitatively different, with only small negative ellipticity peaking near 205 nm. For the *Centruroides* toxins the spectra above 250 nm are characterized by a positive ellipticity peaking around 270 nm and by a negative ellipticity peaking around 290 nm. These features are due in part to the aromatic amino acids and probably indicate ring-ring interactions [32]. Such an interpretation must be made with caution, as disulfide bonds also contribute

in this region. The negative ellipticity around 290 nm is unquestionably due to tryptophan. In this spectral region the CD spectra of the two *Tityus* toxins are obviously qualitatively different from those of the *Centruroides* toxins, indicating different environments of the aromatic rings in the spatial protein structures.

¹H NMR spectra such as that shown in Fig. 5 were recorded for all seven toxin samples. In addition to the above-mentioned studies of the exchange of labile protons, the spectra were used for a comparison of the spatial protein structures. This was based on a small number of well-separated lines at the extreme high-field end of the spectrum between 0.3 and -0.5 ppm, between 5.0 and 7.1 ppm, and to low field of 8.9 ppm (Table II). For these resonances the chemical shift and intensity as well as, in some cases, the multiple fine structure could be determined (Table II).

To the extent that they are indicated in the first column of Table II the assignments of the resonances were quite straightforward. The methyl, α -proton and aromatic proton lines were identified from the chemi-

TABLE II

CHEMICAL SHIFTS IN ppm (WITH RESPECT TO TSP) OF RESOLVED RESONANCES WHICH ARE COMMON TO SOME OR ALL OF THE SCORPION TOXINS EXAMINED

For experimental conditions refer to Fig. 6.

Nature of resonance	<i>T. serrulatus</i>		<i>C. elegans</i>		<i>C. noxius</i>	
	II.5.3	gamma	II.6.1	II.7.1	II.9.2.2	II.10.2
Methyl			-0.39	-0.40	-0.40	-0.40
Methyl			0.10	0.05	0.05	0.05
Methyl			0.16	0.16	0.12	0.10
1-Proton line of α CH	5.2	5.19	5.22	5.19	5.21	5.20
1-Proton line of α CH		5.28	5.30	5.32	5.31	5.34
2-Proton doublet	5.63	5.57	5.65	5.63	5.50	5.65
1-Proton line of α CH				5.73	5.67	5.72
Trp C2H			6.20	6.20	6.18	6.20
Aromatic, 2-proton doublet	6.30	6.24	6.34	6.40	6.40	6.36
Aromatic, 2-proton doublet			6.58	6.63	6.58	6.59
Aromatic, 2-proton doublet	6.81	6.79	6.70	6.69	6.65	{or 6.69 6.72
Aromatic			6.89	6.90	6.90	6.88
Aromatic, 2-proton doublet			7.02	7.07	7.02	7.01
Slowly exchanging NH			8.98	9.01	8.96	8.98
Slowly exchanging NH			9.78	9.70	9.77	9.80
Slowly exchanging NH			10.32	10.28	10.33	10.34

cal shifts and the intensities [33], the amide proton lines also from the observation that they are labile with respect to exchange with deuterium of the solvent. From its chemical shift, intensity and multiplicity the one-proton singlet near 6.2 ppm had to correspond either to an imidazole proton of histidine or C2H of tryptophan [33]. Since the p^2H dependence of the chemical shift was only 0.04 ppm between p^2H 1.9 and 8.9, it appeared unlikely that the line was due to histidine [33] and it was therefore assigned to the indole C2H of a tryptophan (Table II).

Since a chemical shift of 6.2 ppm is unusual for the C2 indole proton of tryptophan [33], we have used nuclear Overhauser experiments [26] to obtain a preliminary characterization of the environment of this tryptophan in the protein. The peaks in a truncated driven nuclear Overhauser difference spectrum manifest close proximity of the observed protons to the preirradiated proton [26]. When the singlet at 6.2 ppm was preirradiated for 0.4 s in the toxin II.6.1 of *C. elegans*, two peaks at 6.58 and 6.89 ppm in the aromatic region and one peak at 1.17 ppm in the aliphatic region were observed. In identical experiments with two solutions of the *C. noxius* toxin II.9.2.2 at p^2H 5.4 and 6.0, nuclear Overhauser peaks were observed at 1.17, 6.58 and 6.90 ppm. These data thus indicate that the indole C2 proton seen at 6.2 ppm is located close to another aromatic ring in the spatial protein structure and that the environment of this indole ring is very similar in the two proteins.

Discussion

The N-terminal sequence up to amino acid residue 29 for toxin gamma from *T. serrulatus* [15] and half of the sequence for the toxin II.7.2 from *C. elegans* are known (Fletcher, P.L., Ramirez, G.A. and Posani, L.D., unpublished results) but the complete amino acid sequence is not known for any of the six toxins studied in this paper. Therefore, an analysis of spectroscopic data is necessarily of a somewhat preliminary nature. In one case the 1H NMR spectra yielded information on the amino acid composition. This concerns toxin II.5.3 from *T. serrulatus*, where the chemical amino acid analysis yielded a histidine content of 0.37 (unpublished results) and the presence of histidine can now be ruled out by the absence

of the imidazole peaks in the low field region of the 1H NMR spectrum [33]. The most valuable information, however, bears on the spatial structures of the proteins.

Since for all the toxins numerous resonances of labile protons were seen at the low-field end of the spectra between 8.0 and 10.5 ppm (Fig. 6) we conclude, in analogy to the basic pancreatic trypsin inhibitor [37] and various snake toxins [34,35,38, 39] which were previously studied in much detail, that these proteins contain extended regions of β -sheet secondary structure. This appears to be in agreement with the crystal structure of a toxin from *C. sculpturatus*, which contains extended β -sheet regions [36]. Besides the low-field-shifted amide proton lines, the appearance of α -proton resonances between 5.0 and 6.0 ppm (Table II) has also been found to be typical for β -sheets in globular proteins [37].

While the chemical shifts of the α - and amide protons indicate a similar type of polypeptide backbone folding in all the scorpion toxins studied, additional observations lead to a differentiation between two groups of structurally different proteins, i.e. those from the *Tityus* species and those from *Centruroides*. The differences between the two types of protein bear on the time-averaged spatial structure as well as on the flexibility of the proteins [33]. All the resonances listed in Table II have been shifted to their positions in the spectrum, which are largely different from those in random coil polypeptides [33], by conformation-dependent interactions with their immediate environment. Their presence or absence in the spectrum is therefore a direct manifestation of the average spatial protein structure. Inspection of Table II then implies that the conformations of the four *Centruroides* toxins are closely related in as far as they are manifested in the NMR spectra, whereas the two *Tityus* toxins are different. Furthermore, from the amide proton-exchange studies it follows that the *Centruroides* toxins have much more compact and rigid structures than the *Tityus* toxins. As with previous observations in protease inhibitors [40] and a variety of snake toxins, faster exchange of the interior amide protons is correlated with a reduced stability of the *Tityus* toxins with respect to thermal denaturation.

The appearance of a tryptophan C2H singlet at 6.2

ppm, i.e., shifted upfield by 1.2 ppm from the random coil position [33], shows that each of the *Centruroides* toxins contains a tryptophan in a particular environment in the interior of the proteins. The observation of identical nuclear Overhauser effects in two toxins demonstrates that the structural details of the tryptophan environment are conserved, with an aromatic ring system with protons at 6.58 ppm close to the tryptophan ring. The proximity of two aromatic rings would be consistent with the large negative ellipticity at 290 nm observed in the CD spectra of the *Centruroides* toxins (Fig. 7). In view of the preliminary nature of the available data it is at present only possible to conjecture about the structural environment of that tryptophan. Inspection of the amino acid sequences of other scorpion toxins indicates that a comparison with variant 2 toxin from *C. sculpturatus* Ewing [7] might help to further elucidate the exact nature of the tryptophan environment which gives rise to the high field shift of the C2H line. The single tryptophan in this species is in position 47 and is located between cysteine 46 and cysteine 48, which are bridged to cysteine 25 and cysteine 29, respectively [16]. It could well be that the structural constraints by the two disulfide bonds could contribute effectively to an unusual chemical shift. At present the fragment which would be homologous to Cys 46-Trp 47-Cys 48 in *C. sculpturatus* has not been sequenced in any of the toxins studied in this paper.

Acknowledgements

The technical assistance of Mr. Fredy V. Coronas is gratefully acknowledged. Financial support was received from the Swiss National Science Foundation (project No. 3.528.79). W.E. Steinmetz gratefully acknowledges a Wig Sabbatical Fellowship awarded by Pomona College.

References

- 1 Rochat, C., Rochat, H., Miranda, F. and Lissitzky, S. (1967) *Biochemistry* 6, 578-585
- 2 Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S. and Edman, P. (1970) *Eur. J. Biochem.* 17, 262-266
- 3 Rochat, H., Rochat, C., Sampieri, F., Miranda, F. and Lissitzky, S. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 381-388
- 4 Zlotkin, E., Rochat, H., Kopeyan, C., Miranda, F. and Lissitzky, S. (1971) *Biochimie*, 53, 1073-1078
- 5 Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H., Rochat, C. and Lissitzky, S. (1970) *Eur. J. Biochem.* 16, 514-523
- 6 Rochat, H., Kopeyan, C., Garcia, L.G., Martinez, G., Rosso, J.P., Pakaris, A., Martin, M.F., Garcia, A., Martin-Moutot, N., Gregoire, J. and Miranda, F. (1976) in *Animal, Plant and Microbial Toxins* (Osaka, A., Hayashi, K. and Sawai, Y., eds.), Vol. 2, pp. 79-87, Plenum Press, New York
- 7 Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M. and Mlejnek, R.V. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 694-706
- 8 Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M. and Mlejnek, R.V. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 125-134
- 9 Garcia, G.P. (1976) in *Etude des Neurotoxines du venin du scorpion mexicain Centruroides suffusus suffusus* pp. 1-73, Ph.D. Thesis, Université de Nice, France
- 10 Possani, L.D., Ramirez, G.A., Fletcher, P.L., Jr. and Gurrola, M.A.II. (1978) *FEBS Lett.* 91, 261-264
- 11 Possani, L.D., Fletcher, P.L., Jr., Alagón, A.B.C., Alagón, A.C. and Julia, J.Z. (1980) *Toxicon*, 18, 173-183
- 12 Dent, M.A.R., Possani, L.D., Ramirez, G.A. and Fletcher, P.L., Jr. (1980) *Toxicon* 18, 343-350
- 13 Gomez, M.V. and Diniz, C.R. (1966) *Mem. Inst. Butantan* 33, 899-902
- 14 Toledo, D. and Neves, A.G.A. (1976) *Comp. Biochem. Physiol.* 55B, 249-253
- 15 Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, P.L., Jr. and Erickson, B.W. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 394-403
- 16 Tu, A.T. (1977) *Scorpion Venoms in Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, pp. 459-483, John Wiley, New York
- 17 Habersetzer-Rochat, C. and Sampieri, F. (1976) *Biochemistry* 15, 2254-2261
- 18 Yang, C.C. (1978) *Toxicon* (Supplement No. 1) 261-292
- 19 Erickson, B.W. (1978) *Toxicon* (Supplement No. 1), 1071-1086
- 20 Tolksdorf, S., McCready, M.H., McCullagh, D.R. and Schwenk, E. (1949) *J. Lab. Clin. Med.* 34, 74-89
- 21 Karlsson, E., Arnberg, H. and Eaker, D. (1971) *Eur. J. Biochem.* 21, 1-16
- 22 Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E. (1962) *Nature* (London) 195, 281-283
- 23 Rüchel, R. (1976) *J. Histochem. Cytochem.* 24, 773-791
- 24 Moore, S. and Stein, W.H. (1963) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds.), Vol. 6, pp. 819-831, Academic Press, New York
- 25 Liu, T.Y., and Chang, Y.H. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2842-2848
- 26 Wagner, G. and Wüthrich, K. (1979) *J. Magn. Reson.* 33, 675-680
- 27 Bundi, A. and Wüthrich, K. (1979) *Biopolymers* 18, 285-298
- 28 Englander, S.W., Downer, N.W. and Teitelbaum, H. (1972) *Annu. Rev. Biochem.* 41, 903-924
- 29 Richarz, R., Sehr, P., Wagner, G. and Wüthrich, K. (1979) *J. Mol. Biol.* 130, 19-30
- 30 Iivdt, A. and Nielsen, S.O. (1966) *Adv. Protein Chem.* 21, 287-386

- 31 Chicheportiche, R. and Lazdunski, M. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 549-555
- 32 Strickland, E.H. (1972) *Biochemistry* 11, 3465-3482
- 33 Wüthrich, K. (1976) *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam
- 34 Tsernoglou, D. and Petsko, G.A. (1976) *FEBS Lett.* 68, 1-4
- 35 Low, B.W., Preston, H.S., Sato, A., Rosen, L.S., Searl, J.E., Rudko, A.D. and Richardson, J.S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2991-2994
- 36 Fontecilla, J.C., Almasy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D. and Bugg, C.E. (1979) paper presented at the EMBO workshop on Neurotoxins: Structure and Functions, Sophia Antipolis, France, July 24-26
- 37 Wüthrich, K. and Wagner, G. (1979) *J. Mol. Biol.* 130, 1-18
- 38 Lauterwein, J., Wüthrich, K., Schweitz, H., Vincent, J.P. and Lazdunski, M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 1071-1078
- 39 Lauterwein, J., Lazdunski, M. and Wüthrich, K. (1978) *Eur. J. Biochem.* 92, 361-371
- 40 Wagner, G. and Wüthrich, K. (1979) *J. Mol. Biol.* 130, 31-38

THE AMINO TERMINAL SEQUENCE OF SEVERAL TOXINS FROM THE VENOM OF THE MEXICAN SCORPION CENTRUROIDES NOXIUS HOFFMANN

by

LOURIVAL DOMINGOS POSSANI*, MYRNA A. R. DENT

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Apartado Postal 70-247 México 20 D. F., México, and
Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie,
Rheinlanddamm 201, D-4600 Dortmund*

and

BRIAN M. MARTIN, ALFRED MAELICKE

Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie
Rheinlanddamm 201, D-4600 Dortmund, West Germany

and

IB SVENDSEN

Department of Chemistry, Carlsberg Laboratory,
Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500 Copenhagen, Valby

Keywords: Scorpion toxins, *Centruroides noxius*, amino acid analysis, amino acid sequence, sequence homology

The soluble venom from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* HOFFMANN was fractionated by Sephadex G-50 chromatography followed by ion exchange separation on carboxymethylcellulose and Bio-Rex 70 columns. Six homogeneous toxins were obtained by this procedure. The amino acid composition and the amino-terminal amino acid sequence was determined for four of them. They are all basic polypeptides with a molecular weight in the order of 7,000, containing from 59 to 65 amino acid residues with four disulphide bridges.

Toxin II.9.2.2 has the N-terminal sequence: Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Asp-Lys-Asn-Thr-Gly-Cys-Lys-Tyr-Glu-Cys-Leu-Lys-Leu-Gly-Asp-Asn-Asp-Tyr-Cys-Leu-Arg-Glu-Cys-Lys-Gln-Gln-Gly-Tyr-Lys-Gly-Ala-Gly-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Ala-Phe-Ala-Cys-Trp-Cys.

The N-terminal sequence of toxin II-10 was shown to be: Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Asn.

For Toxin II-13 the amino acid N-terminal sequence is: Lys-Glu-Gly-Tyr-Ile-Val-Asp-Tyr-His-Asp-Gly-Cys-Lys-Tyr-X-Cys-Tyr-Lys-Leu-Gly-Asp-Asn-Asp-Tyr, and Toxin II-14 has the amino terminal sequence: Lys-Asp-Gly-Tyr-Leu-Val-Asp-Ala-Lys-Gly-Cys-Lys-Lys-Asn-Cys-Tyr-Lys-Leu-Gly-Lys-Asn-Asp-Tyr-Cys-Asn-Arg-Glu-Cys-Arg-Met-Lys-His-Arg-Gly. Some of the biological properties of these toxins are discussed in the communication.

*As visiting professor of the Alexander von Humboldt Foundation.

1. INTRODUCTION

The scorpions from the genus *Centruroides* are widely distributed in Mexico and at least six species are very poisonous to mammals (4). Only the toxins from two species have been studied in detail, *Centruroides sculpturatus* EWING (1) and *Centruroides suffusus suffusus* (13). We have recently described two toxins from *Centruroides elegans* THORELL (10), one toxin from *Centruroides limpidus* (ecomanus) HOFFMANN (8) and several toxins from the venom of *Centruroides noxius* HOFFMAN (2). No information on the primary structure of the toxins from *Centruroides noxius* is as yet available. In this communication we report the amino terminal sequence of four different toxins obtained from the venom of *Centruroides noxius*. Part of this work was presented as an abstract during the 4th European Symposium on Plant, Animal and Microbial Toxins (6).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Scorpions collected in the state of Nayarit (Mexico), were anaesthetized with carbon dioxide and the venom was obtained by electrical stimulation of the telsons. The venom was recovered in double distilled water, centrifuged for 10 minutes in a Sorvall centrifuge equipped with an SS-34 rotor and operated at 10,000 rpm. The supernatant was pooled, lyophilized and stored until used at -20°C .

Sephadex G-50, medium and fine, was obtained from Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden. CM-cellulose (CM-32) was a product of Whatman Inc., Clifton, N. J., USA. Iodo [2- ^{14}C] acetic acid (50 μCi) was obtained from Amersham Buchler, Braunschweig, West Germany and diluted to the appropriate specific activity with cold iodoacetic acid.

The chemicals used for sequence determination were described previously (9). All other chemicals were reagent grade.

2.2. Lethality tests

The lethality of the different toxic components obtained during the isolation procedure was evaluated always in 18–20 g albino mice (strain NMRI) by intraperitoneal injection as described in detail in the accompanying paper (9). The same designations 'Lethal', 'Toxic' and 'Non-toxic' were used (see footnote of Table I).

2.3. Purification of toxins

Three grams of lyophilized soluble venom was dissolved (80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) in 0.02 M-ammonium acetate buffer, pH 4.7 and fractionated based on molecular weight difference. Six independent applications of approximately 500 mg each of soluble venom were gel filtered on a Sephadex G-50 column. Figure 1 presents an example of the chromatogram obtained. Fraction II contained about 63% of the material applied to the column (by absorbancy at 280 nm) and was the only toxic fraction. Further separation of fraction II on CM-cellulose ion exchange columns gave essentially the same results as previously described (11). At least fourteen different components were developed by a linear NaCl gradient (0 to 0.5 M) in 0.02 M-ammonium acetate buffer, pH 4.7 (Fig. 2). Recoveries and lethality tests of the different components are shown in Table I. When necessary, further rechromatography was conducted using the same conditions, or using a Bio-Rex 70 Column as already published (11). The latter procedure was particularly important for the final purification of toxin II.9.2.2 (see section 3). Detailed data are presented in the footnotes of the figures and in the preceding publication (11).

Homogeneity of the different toxins was verified by polyacrylamide gel electrophoresis in the acetate-urea- β -alanine system of REISFELD et al. (12), and by amino acid sequencing.

2.4. Reduction and carboxymethylation

Reduction of the toxins was done as described previously (9). However, instead of 4-vinylpyri-

Abbreviations: BSA = bovine serum albumin; C = *Centruroides*; CM = carboxymethyl; HPLC = high performance liquid chromatography; N.n.s. = α -toxin from *Naja naja siamensis*; PTH = phenylthiohydantoin; RCM = reduced carboxymethylated; TLC = thin layer chromatography.

L. D. POSSANI et al.: *C. noxius* toxin sequences

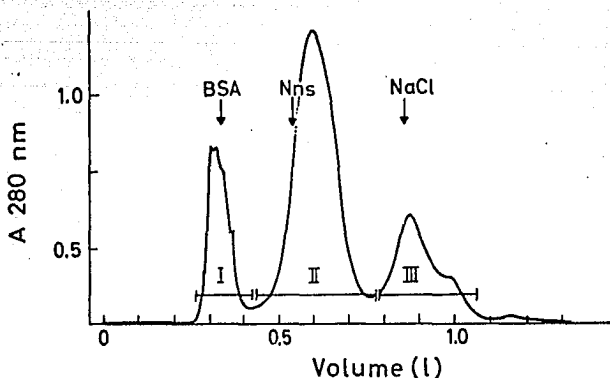


Figure 1. Fractionation of the soluble venom.

A 2.9×170 cm column of Sephadex G-50, medium, equilibrated with 0.02 M-ammonium acetate, pH 4.7 was loaded with 6.3 ml of soluble venom containing 500 absorbance units at 280 nm and eluted with the same buffer at a flow rate of $50 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Fractions of 10 ml were collected and pooled as indicated by the horizontal bars. Fractions I, II and III contain approximately 17%, 63% and 20% respectively of the material recovered. The only toxic fraction (n.II) was usually lyophilized and kept at -20°C prior to further chromatography. BSA (bovine serum albumin, molecular weight 66,200), N.n.s. (α -toxin from *Naja naja siamensis*, molecular weight 8,000), and NaCl were run separately as molecular weight markers.

dine, $\text{iodo}[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{acetic acid}$ was used for alkylation. The reduced carboxymethylated toxin was recovered free of excess reagents after chromatography (Figure 3) on Sephadex G-50 (2.5×120 cm). The radioactivity incorporated was approximately equal for all toxin species.

2.5. Sequence and amino acid analysis

Automated EDMAN degradation was done using the Beckman 890C Sequencer according to the method of EDMAN and BEGG (3). Methodology for the Sequencer has been described in detail in the preceding paper (9) and elsewhere

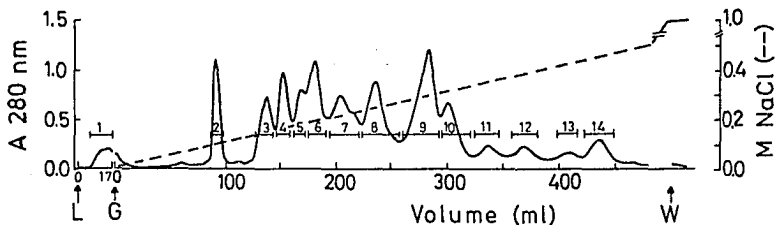


Figure 2. Ion exchange chromatography of fraction II from Sephadex G-50.

A CM-32 column (0.9×27 cm) equilibrated with 0.02 M-ammonium acetate, pH 4.7 was loaded with 95 mg (dry weight) or 116.6 absorbance units (at 280 nm) of fraction II (17 ml) indicated by the letter L. A linear gradient containing 240 ml each of equilibration buffer and this buffer containing 0.5 M-NaCl was started as indicated by G. At the end of the gradient the column was washed with the same buffer containing 1 M-NaCl shown by W. The flow rate was $30 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ and fractions of 2.4 ml each were collected and pooled as indicated by the horizontal bars. Recoveries and lethality tests are shown in Table I.

Table I

Recovery and lethality of components obtained from the CM-cellulose column (Fig. 2).

Protein component	Amount recovered ^{a)}	% Recovery	Lethality ^{b)}
Fraction II applied ($A_{280}^{1cm} = 116.6$ units)	116.0	99.9	lethal
Fractions obtained			
II- 1	1.0	0.9	not tested
II- 2	6.5	5.6	non toxic
II- 3	0.6	0.5	non toxic
II- 4	7.7	6.6	non toxic
II- 5	8.6	7.4	non toxic
II- 6	20.1	17.3	toxic
II- 7	12.6	10.9	non toxic
II- 8	14.1	12.1	lethal
II- 9	21.4	18.4	lethal
II- 10	8.5	7.3	lethal
II- 11	3.6	3.1	lethal
II- 12	3.8	3.3	toxic
II- 13	2.4	2.0	lethal
II- 14	5.1	4.4	toxic

^{a)} The values represent total absorbancy units at 280 nm.

^{b)} Protein was injected intraperitoneally into 20 g mice. When small amounts of toxin required a qualitative assay then 20-40 μ g of protein (by absorbancy at 280 nm assuming that $A_{280\text{ nm}}^{1\text{cm}} = 1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) was injected into one or two mice. The term 'lethal' means that the component at the dose injected was enough to kill the tested mouse within 20 h of injection; 'Toxic' means that the mouse shows any of the following symptoms: excitability, salivation, temporary paralysis of rear limbs, dyspnea, but recovered within 20 h after injection; 'Non-toxic' means normal behaviour similar to injection of 0.9% NaCl.

(14). Identification of the resulting PTH-amino acids was made by HPLC using a Hewlett-Packard chromatograph Model 1084B (14) and

in some cases by TLC (5). ^{14}C -cysteine was located by both HPLC and scintillation counting on a Packard 3003 Liquid Scintillation counter.

Amino acid analysis were performed on a Durrum D-500 after hydrolysis in 5.7 N-HCl at 110 °C in vacuo as described (9).

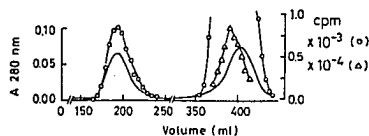


Figure 3. Sephadex G-50 gel filtration of RCM-toxin II-14.

One mg of the toxin reduced with iodine (^{14}C) acetate was loaded on Sephadex G-50, fine column (2.5 x 120 cm) equilibrated and eluted with 20% acetic acid. The flow rate was 30 ml·h⁻¹ and fractions of 5 ml were collected. The fractions eluting between 170 and 230 ml were pooled and lyophilized prior to analysis and sequencing. The recovery was quantitative. Absorbancy at 280 nm and radioactivity measurements are indicated.

3. RESULTS AND DISCUSSION

At least 40,000 scorpions were «milked» during the past three years in order to collect a few grams of dry venom. The mean lethal dose (LD₅₀) for the soluble venom is 0.26 μ g·g⁻¹ weight of albino mice (2). The water extracted venom (soluble venom) was chromatographed. The first separation in Sephadex G-50 column afforded three distinct fractions (Fig. 1), from which fraction I contained higher molecular weight components (hyaluronidase among them) and fraction III contained small molecular weight peptides and other free aminated derivatives (M.A.R. DENT and L. D. POSSANI, unpub-

lished observations). Fraction II corresponding to molecular weight components of approx. 3,000 to 15,000 contained the toxic polypeptides that were further purified by ion exchange chromatography as indicated in section 2.3. The total amount of fraction II varied from 63% (this communication) to 71% (11) depending on the chromatographic characteristics of the Sephadex column, but always constitutes the major portion of the soluble venom.

The general profile of the chromatograms after CM-cellulose was reproducible (Fig. 2 in this communication and in reference 11). This initial ion exchange step allowed in all cases, the separation of at least 14 different constituents. Sometimes, however, the position of the less basic components (II-1 to II-5, Fig. 2) can be different, depending on the characteristics of the column (size), volume of the gradient or amount of protein applied, even when the buffer and NaCl gradients are identical. The most constant part of the chromatogram is the region where the basic fractions II-8 to II-14 are found (Fig. 2 and reference 11). Ten independent chromatograms gave the same results. If the content of the toxic fractions from Table I are added up, they account for 77% of the total material chromatographed on the CM-cellulose column. From this figure, and the recovery obtained in the Sephadex G-50 column (63-71%) it can be concluded that in the order of 48% to 55% of the total soluble venom is represented by some kind of toxic protein. The toxicity of fraction II-6 (Fig. 2) to mammals (mouse) is very low, but this fraction is a potent reversible paralysing agent for crustaceans e.g. crab and crayfish. Fraction II-5 appears to be an even more potent toxin in the crustaceans studied (L. D. POSSANI and J. MOCHCA-MORALES, unpublished observations). Fraction II-8 is a lethal component to mice at the doses assayed, but unfortunately is still heterogeneous in the polyacrylamide gel electrophoresis system (12) tested. The next fraction, II-9, was further chromatographed, first in the same conditions as Fig. 2 and after using Bio-Rex-70 as already described (11), and gave rise to the homogeneous toxin II.9.2.2. This polypeptide is lethal to mice. Preliminary experiments have shown that a radiolabelled ^{125}I -toxin II.9.2.2 derivative is capable of binding to membranes obtained from synaptosomes of the central nervous system of

mouse (L. D. POSSANI and J. MOCHCA-MORALES, unpublished).

If only 2-4 tubes (peak fractions) from the remaining toxic components (II-10 to II-14) from figure 2 are analysed in acetate-urea- β -alanine polyacrylamide gel electrophoresis (12) they show sufficient homogeneity (only one band with 50-100 μg protein applied to the gel) to be used for chemical analysis and tested for biological properties.

The 2 peak tubes from fraction II-10 are extremely toxic to mammals and have been recently shown by CARBONE, WANKE, PRESTEPINO, MAELICKE and POSSANI (unpublished) to be a reversible blocker of the Na^+ channel in the squid giant axon, under voltage clamp dependent experiments. Fractions II-11 to II-14 all are toxic to mammals but physiological experiments have not been completed, yet. As it can be observed again in Fig. 2 and Table I, the major toxins obtained in pure form, so far, are toxin II.9.2.2, II-10 (peak tubes) to II-14 (peak tubes). Toxin II-11 to II-13 (peak-tubes) were obtained only in small amounts. Since the biological effects of these toxins seemed to be different, it was very tempting to see the variations in their amino acid compositions and sequences. The toxins were reduced and carboxymethylated with iodof ^{14}C acetic acid. Both amino acid analysis and automatic EDMAN degradation were made on the reduced carboxymethylated toxins (Figure 3). As it can be observed in Table II, the molecular weight estimated for the four toxins studied is in the range of 7,000, having 59 amino acid residues plus possible tryptophans for the smallest toxin II-14 to 65 residues including tryptophan, for the largest toxin II.9.2.2. The values of half cystines were found to be consistently low for toxins II-10, II-13 and II-14. The chromatograms from the amino acid analyzer have always shown trace amounts of unalkylated cystines. For this reason in Table II we have admitted possible variations of half-cystine between 6-8. However, based on homologies of other North American scorpion toxins (1, 13), with the venom of *Centruroides* species we assume that a value of 8 half-cystines is the more plausible one. Another interesting finding is the presence of methionine in the amino acid composition of toxin II-14. This amino acid residue is nonexistent in practically all the toxins

Table II

Amino acid compositions of toxins from *Centruroides noxius* HOFFMANN.

Amino acid	Toxin II-9.2.2 ^{a)}	Toxin II-10	Toxin II-13	Toxin II-14
Asp	6	6 (5.8) ^{b)}	6 (5.6) ^{b)}	7 (7.0) ^{b)}
Thr ^{c)}	2	4 (3.5)	2 (1.8)	3 (2.7)
Ser ^{d)}	1	3 (2.6)	2 (2.1)	4 (3.6)
Glu	7	6 (5.5)	4 (4.1)	2 (2.3)
Pro	2	2 (2.0)	2 (2.2)	2 (2.3)
Gly	7	7 (7.0)	8 (8.0)	8 (8.0)
Ala	4	3 (2.8)	4 (3.6)	1 (1.2)
Val ^{d)}	2	1 (1.4)	2 (1.9)	1 (0.8)
Met	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)
Ile ^{d)}	1	1 (0.9)	1 (1.1)	0 (0.0)
Leu	6	4 (4.0)	4 (4.3)	4 (3.7)
Tyr	6	5 (5.3)	6 (6.4)	6 (5.8)
Phe	1	2 (1.9)	1 (1.2)	1 (1.2)
His	1	1 (0.7)	1 (1.4)	1 (1.0)
Lys	8	7 (6.7)	7 (6.8)	7 (7.2)
Arg	2	2 (2.2)	2 (2.1)	3 (2.6)
CM-Cys ^{e)}	8	8 (5.4)	8 (6.1)	8 (5.8)
Trp	1	n. d.	n. d.	n. d.
Total	65	62 + Trp	60 + Trp	59 + Trp

^{a)} Values taken from reference 11.

^{b)} Values between parenthesis are residue/mole based on glycine = 7.8 and 8 respectively for toxin II-10, II-13 and II-14.

^{c)} Values obtained from extrapolation to 0 time of hydrolysis.

^{d)} Values obtained after 48 h

^{e)} Half-cystines determined as carboxymethyl-cysteine after reduction and alkylation (see section Results and Discussion).

^{f)} n. d. = not determined.

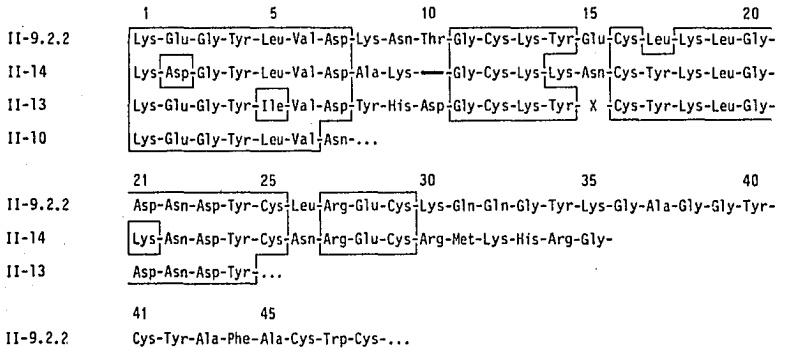


Figure 4. Comparison of the amino terminal amino acid sequences of toxins II-9.2.2, II-10, II-13 and II-14 from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*.

Half-cystines have been aligned in all four sequences and gaps are introduced to maximize homology. The numbering system for amino acid positions has been adapted accordingly. Residues which are invariant in the toxins are enclosed in boxes. x indicates an unidentified residue.

purified from *Centruroides* species (1, 2, 8, 13), so far. From the North African scorpion toxins it seems also to be a general rule, i.e., the lack of methionine (13). Exceptions to this rule are the toxins γ , III-10 and III-8 from *Tityus serrulatus* from Brazil (7, 9).

It is clear from Table II that these four toxins have different amino acid compositions and these differences are even more evident in the amino terminal sequence.

The RCM-toxin II-9.2.2 was sequenced, using 50 nmoles, allowing the identification of the first 48 amino acids. The repetitive yield for this run was 96%. The sequence of amino acids obtained is presented and compared with those from II-10, II-13 and II-14 in Figure 4. It is worthwhile observing that the sequence Cys₄₆Trp₄₇Cys₄₈ was already predicted by our preliminary spectroscopic characterization of toxin II-9.2.2 (11). Some problems were encountered when RCM-toxin II-10 (20 nmoles) was submitted to automatic EDMAN degradation. The repetitive yield was 96% up to residue 6, with a drastic decrease in yield with the Asn₇, possibly due to imide formation. Reduced alkylated toxin II-13, 24 nmoles, was sequenced 24 steps with 23 amino acids identified. The repetitive yield was approximately 96% up to step 20. RCM-toxin II-14, 22 nmoles, was sequenced for 34 cycles with positive identification of all residues. The repetitive yield for this analysis was 95%. The presence of Met₃₀ is unusual for scorpion toxins as discussed previously. At the same time, the position of this residue in the middle of the molecule makes the completion of the amino acid sequence a much more attractive project.

When we analyse Figure 4 for areas of homologous sequence it is clear that these four toxins have extensive areas with identical amino acid sequences. There are four stretches of sequence with high homology in the first half of the molecule. Residues 1 to 7 have practically the same sequence Lys₁Glu₂Gly₃Tyr₄Leu₅Val₆Asp₇ in all four toxins studied, except for two conservative replacements at Asp₇ and Ile₅ for toxin II-14 and II-13 respectively.

The second identical sequence appears at Gly₁₄Cys₁₂Lys₁₃ for three toxins and Tyr₁₄ for toxins II-9.2.2 and II-10. The amino acid residues Cys₁₆ to Cys₂₅ are located in the third highly conservative region in these sequences,

except for 2 places Leu₁₇ in toxin II-9.2.2 and Lys₂₁ in toxin II-14. The latter toxins have a fourth common area at Arg₂₇Glu₂₈ and Cys₂₉. The positions 8 to 10, 15, 26 and 30 to 35 are extremely variable regions in these sequences. If we compare the degree of homologies found in the scorpion toxins of *Centruroides noxius* with that of *Tityus serrulatus* (9) it is evident that the *Centruroides* toxins seem to be more homologous among themselves than the *Tityus* toxins when similarly compared.

However, further comparative studies or attempts to correlate these structural differences with the different biological functions or mechanisms of action of these toxins, have to await more sequence data, especially for toxin II-10 and to some extent for toxin II-13.

ACKNOWLEDGEMENTS

The excellent technical assistance of Mrs. LONE SØRENSEN and BODIL CORNELIUSSEN is gratefully acknowledged. The authors wish to express their appreciation to Professor M. ØRTESEN of Carlsberg for allowing us the use of the Sequencer facilities. The zoological classification of the scorpions used in this work was kindly done by Professor J. JULIÁ (Instituto Nacional de Higiene-México) to which the authors are indebted. The help of the students J. MOCHCA-MORALES, G. RAMÍREZ, F. CORONAS and M. VARELA during the «milking» of the scorpions are deeply acknowledged.

This work was partially supported by Grant PCCBNAL 811370 from the Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (México).

REFERENCES

1. BAHN, D. R., D. D. WATT, S. M. GOOS & R. V. MLEJNEK: Amino acid sequences of neurotoxic protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. Arch. Biochem. Biophys. 164, 694-706 (1974)
2. DENT, M. A. R., L. D. POSSANI, G. A. RAMÍREZ & P. L. FLETCHER, JR.: Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Toxicon 18, 343-350 (1980)
3. EDMAN, P. & G. BEGG: A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1, 80-91 (1967)

L. D. POSSANI et al.: C. noxius toxin sequences

4. HOFFMANN, C.: Nuevas consideraciones acerca de los alacranes de México. *An. Inst. Biol.*, 9, 317-337 (1938)
5. KULBE, K. D.: Micropolyamide thin-layer chromatography of phenylthiohydantoin amino acids (PTH) at the subnanomolar level. A rapid microtechnique for simultaneous multisample identification after automated Edman degradations. *Anal. Biochem.* 59, 564-573 (1974)
6. MARTIN, B., L. D. POSSANI, M. A. R. DENT & A. MAELICKE: N-terminal sequence of Toxin II.9.2.2 from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. Abstract to the 4th European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Marseille, France, 24-27 June, 1981
7. POSSANI, L. D., A. C. ALAGON, P. L. FLETCHER, Jr. & B. W. ERICKSON: Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 394-403 (1977)
8. POSSANI, L. D., P. L. FLETCHER, Jr., A. B. C. ALAGON, A. C. ALAGON & J. Z. JULIA: Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffman. *Toxicon* 18, 175-183 (1980)
9. POSSANI, L. D., B. M. MARTIN, J. MOCHCA-MORALES & I. SVENDSEN: 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 (1981)
10. POSSANI, L. D., G. A. RAMIREZ, P. L. FLETCHER, Jr. & M. A. H. GURROLA: Isolation of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides elegans* Thorell. *FEBS Lett.* 91, 261-264 (1978)
11. POSSANI, L. D., W. E. STEINMETZ, M. A. R. DENT, A. C. ALAGON & K. WÜTHRICH: Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. *Biochim. Biophys. Acta* 669, 183-192 (1981)
12. REISFELD, R. A., U. J. LEWIS & D. E. WILLIAMS: Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 281-283 (1962)
13. ROCHAT, H., P. BERNARD & F. COURAUD: Scorpion toxins: Chemistry and mode of action. *Adv. Cytopharm.* 3, 325-334 (1979)
14. SVENDSEN, I., B. MARTIN & I. JONASSEN: Characteristics of hipoly barley III. Amino acid sequences of two lysine-rich proteins. *Carlsberg Res. Commun.* 45, 79-85 (1980)

III. RESULTADOS NO PUBLICADOS Y DISCUSION GENERAL

En los tres artículos anexos se describen los materiales y métodos utilizados, así como los resultados más importantes obtenidos. A -- continuación se presentarán algunos datos nuevos y se intentará discutir -- en forma integrada todos los resultados obtenidos hasta el presente.

La purificación de las toxinas del veneno del alacrán C. noxius se ha probado en varios sistemas cromatográficos como puede apreciarse en los 3 artículos anteriores, con el objetivo principal de obtener en el menor número de pasos posibles el mayor número de componentes tóxicos puros, así como la mejor recuperación posible en cada uno de ellos.

Inicialmente el veneno soluble se cromatografió en Bio-Gel P -- 10, obteniendo siete fracciones, de las cuales de la III a la VI fueron -- tóxicas en mamíferos (Fig. 2 de Dent y col., 1980).

En los trabajos posteriores se cromatografió el veneno soluble en Sephadex G-50 medio, obteniendo 3 fracciones, de las cuales solo la frac -- ción II es tóxica en mamíferos (Fig. 1 de Possani y col. 1981a, b).

La fracción I que contiene la actividad de hialuronidasa se -- aprecia en ambos casos, en tanto la fracción III, que no es tóxica sobre -- mamíferos obtenida por Sephadex G-50 correspondiente a péptidos de bajos -- pesos moleculares y algunos derivados aminados libres, no se aprecia en el patrón cromatográfico con Bio-Gel P 10. Si bien por este último sistema -- se obtienen 4 fracciones tóxicas y en Sephadex G-50 solo uno.

Los componentes tóxicos sobre mamíferos del III-VI obtenidos en Bio Gel P 10 (Dent y col., 1980), se recromatografiaron en CM-Sepharosa CL 6B, obteniendo una sola fracción tóxica en cada caso. A su vez la fracción III-4 y IV-2 se recromatografiaron en CM-celulosa obteniendo dos -- fracciones tóxicas que por electroforesis en geles de poliacrilamida en el sistema de β -alanina-acetato-urea mostraron una sola banda y se consideraron puras. Se efectuó el análisis de aminoácidos correspondiente a cada una de ellas.

En los trabajos posteriores la fracción II obtenida por Sephadex G-50 se recromatografió en CM-celulosa obteniendo un perfil cromatográfico de 14 fracciones (Figs. 2 Possani y col. 1981a, b). La resolución de este paso depende mucho de las condiciones utilizadas como es el tamaño de la columna, el tratamiento de la resina, el volumen del gradiente y la cantidad de proteína empleada en cada caso. En general, puede decirse que a medida que la fuerza iónica aumenta la resolución es mejor y constante. -- Comparando las dos gráficas que se muestran en cada uno de estos trabajos puede apreciarse que el perfil de la fracción II-8 en adelante es el mismo, en tanto de la fracción II-1 a la II-7 varía considerablemente. (Ver Figs. 2 de Possani y col. 1981a, b). Puede observarse que las condiciones se -- han podido mejorar y se ha obtenido una mayor resolución de cada una de -- las fracciones en esta parte inicial. Las fracciones más tóxicas del cromatograma corresponden a las toxinas que actúan en mamíferos y son de la fracción II-8 a la II-14. Como de esta forma pueden obtenerse al menos 7 fracciones tóxicas en este segundo paso de recromatografía, éste ha sido el sistema de purificación que se ha continuado hasta el momento.

De todas las fracciones la II-9 es la más tóxica de éstas, por ello fue la que se llevó a homogeneidad inicialmente, recromatografiándola primero por una columna de CM-celulosa a pH 4.7 y después por una columna de Bio-Rex 60 a pH 6.5, obteniendo la fracción II.9.2.2, que por geles de poliacrilamida mostró una sola banda y se consideró pura. Si bien en este tiempo tan solo se efectuó el análisis de aminoácidos de esta toxina, no se llevó a cabo la secuencia N-terminal para demostrar completamente la pureza de ésta, sin embargo, los trabajos de resonancia magnética nuclear mostraron que la toxina II.9.2 presentaba ligeros picos debidos a componentes proteícos menores, en tanto estos picos estaban ausentes con la toxina II.9.2.2 obtenida en el último paso de purificación.

Posteriormente se ha logrado purificar en columnas de CM-celulosa las fracciones II-9, II-10, II-11, II-13 y II-14 cada una por separado utilizando amortiguador de fosfato de sodio 0.05M a pH 6.0, obteniendo en cada caso una sola banda por geles de poliacrilamida y considerándolas puras. Esto representa la posibilidad de obtener las toxinas homogéneas únicamente en tres pasos cromatográficos.

Bajo estas condiciones la fracción II.9 se recromatografió en CM-celulosa (Ver. Fig. 2), obteniendo una recuperación total de 85% de la proteína aplicada en la columna. Se aprecian dos picos principales que se juntaron por separado en 3 fracciones como se observa en la Fig. 2. Ambas fracciones son altamente tóxicas al ser inyectadas en ratones con 43 µg de proteína en ratones de 20 gr. de peso y corresponden al 43.2 y 28.1% de la proteína total. Por análisis de aminoácidos la fracción II.9.1 corresponde a la toxina II.9.2.2 descrita anteriormente (Possani y col., 1981a), en

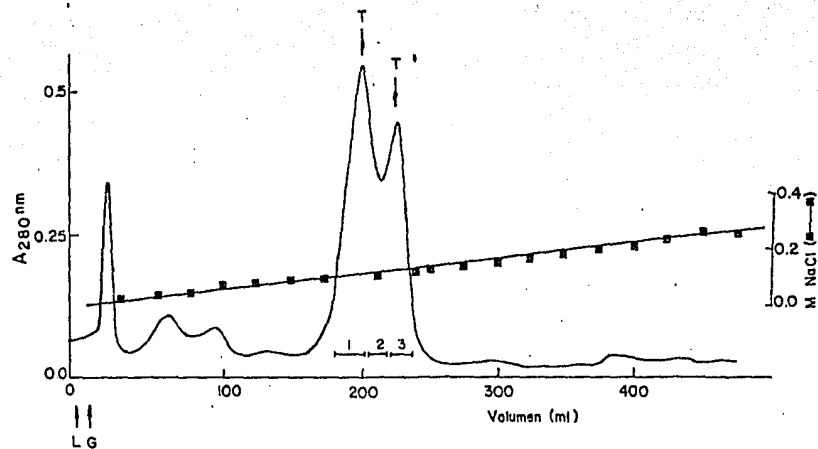


Figura 2. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción II-9 del veneno del *C. noxius*

Columna de intercambio iónico de CM-celulosa (0.9 x 32 cm) equilibrada en amortiguador de fosfatos de sodio 0.05 M pH 6.0 a la cual se aplicó 31.35 mg de la fracción II-9 (3 ml). La columna fue eluida en un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0.0 - 0.38 M (250 ml en cada uno) con el mismo amortiguador a un flujo de 30 ml/hr colectando fracciones de 2.5 ml por tubo. Las fracciones II.9.1 y II.9.2 son tóxicas.

tanto la fracción II.9.3 corresponde al parecer a la fracción III.4 inicialmente descrita por el otro sistema de purificación en Bio-Gel P 10 (Dent y col. 1980).

La fracción II-10 fue recromatografiada en las mismas condiciones (Ver Fig. 3), obteniéndose una recuperación total de 92% de la proteína aplicada a la columna y 5 fracciones principales que corresponden al 9.2, 11.7, 51.5, 3.1 y 3.5% respectivamente de la proteína total aplicada. Por geles de poliacrilamida se aprecia una sola banda en todas ellas a excepción de la fracción II.10.2 donde se observa un pequeño contaminante. Las fracciones II.10.3 y II.10.4 son tóxicas con 40 µg de proteína en ratones de 20g de peso. Por análisis de aminoácidos la fracción II.10.3 corresponde a la toxina II.10 descrita anteriormente, en tanto la II.10.4 no corresponde a ninguna anterior, lo que sugiere la posibilidad de que sea nueva toxina que contenga el veneno del C. noxius.

La fracción II-11 se recromatografió (Ver Fig. 4) en las mismas condiciones obteniéndose una recuperación del 100% y la presencia de 3 fracciones principales que corresponden al 26.5, 5.2 y 7.8% respectivamente de la proteína total y mostraron una sola banda en geles de poliacrilamida. Por análisis de aminoácidos la fracción II.11.1 corresponde a la toxina II-10, la II.11.2 corresponde a la fracción II.10.4 y la fracción II.11.3 corresponde a la toxina II.11 determinada anteriormente (Possani y col. datos no publicados), que actúa específicamente sobre el canal de potasio (Carbone y col. 1982).

Se recromatografió también la fracción II-13 (Ver Fig. 5) obteniéndose una recuperación del 100% y dos picos principales II.13.1 y --

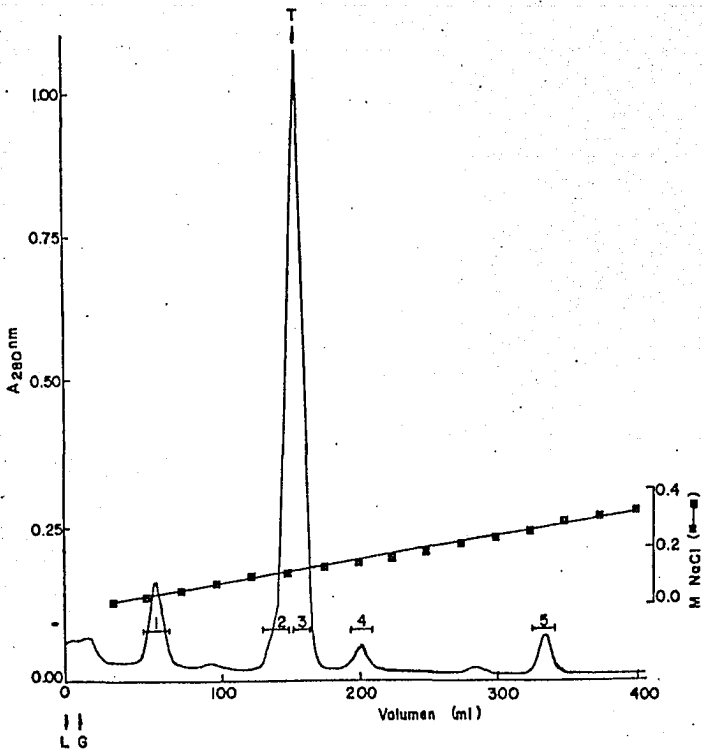


Figura 3. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción II-10 del veneno del C. noxius.

Se aplicó 20.25 mg de la fracción II-10 (27 ml) y se siguieron las mismas condiciones de la Fig. 2. para la elución de la - columna. Las fracciones II.10.3 y II.10.4 fueron tóxicas.

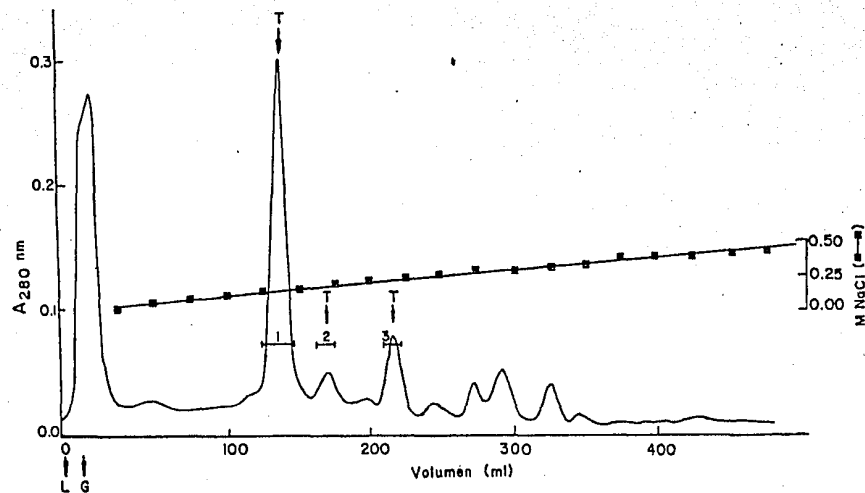


Figura 4. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción II-11 del veneno del C. noxius.

Se aplicó 14.2 mg de la fracción II-11 (20 ml) y se siguieron las mismas condiciones de la Figura 2, con excepción de utilizar un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0.0-0.5M. Las fracciones II.11.1, II.11.2 y -- II.11.3 son tóxicas.

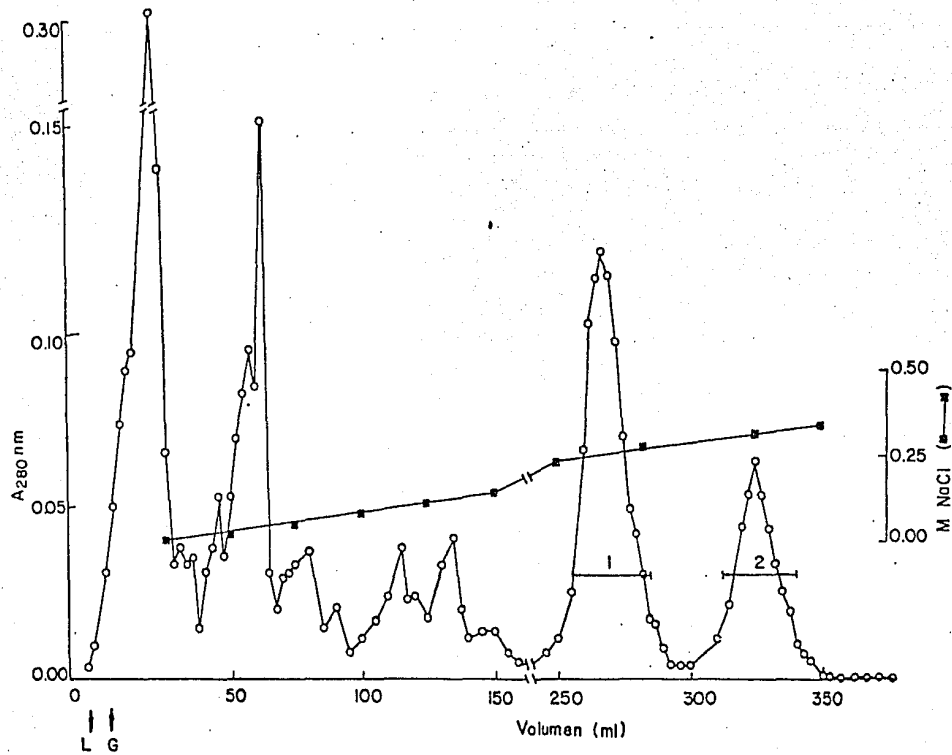


Figura 5. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción II-13 del veneno del *C. noxius*.

Se aplicó 6.03 mg de la fracción II-13 (6 ml) y se siguieron las mismas condiciones de la Fig. 4. La fracción II.13.1 es tóxica.

II.13.2 que corresponden al 35.6 y 17% respectivamente de la proteína total aplicada; en geles de poliacrilamida mostraron una sola banda y sólo la -- II.13.1 fue tóxica en ratones. Por análisis de aminoácidos la fracción -- II.13.1 corresponde a la toxina II-13 anteriormente descrita (Possani y -- col., 1981b).

La fracción II-14 se recromatografió al igual que las anteriores (Ver Fig. 6) obteniéndose una recuperación del 100% de la proteína total y dos picos principales que se juntaron en 4 fracciones. La fracción II.14.2 y II.14.4 corresponden al 36.7 y 12.4% respectivamente del total de proteína aplicada y en geles de poliacrilamida se observa una sola banda, por lo que se consideran puras. La fracción II.14.2 por análisis de aminoácidos corresponde a la toxina II.14 anteriormente descrita y al ser inyectada (50 µg) en ratones de 18-20g, se aprecian los síntomas de envenenamiento sin que llegue a ser letal.

Si bien, el proceso ha podido reducirse a tres pasos para obtener las toxinas puras, una limitante importante es la cantidad tan pequeña recuperada de éstas en forma homogénea, especialmente de las toxinas II-11 y II-13 que representan el .24 y .72% respectivamente del veneno soluble total.

Como se aprecia en la Tabla III, las toxinas aisladas hasta el momento de C. noxius presentan ciertas características en común en su composición de aminoácidos. Son proteínas básicas con un peso molecular alrededor de 7,000 contienen entre 59 y 65 residuos de aminoácidos y presentan 8 cisteínas como la mayoría de las toxinas descritas hasta el momento a -- excepción de la toxina IV.2 que al parecer contiene 6 cisteínas. Como las

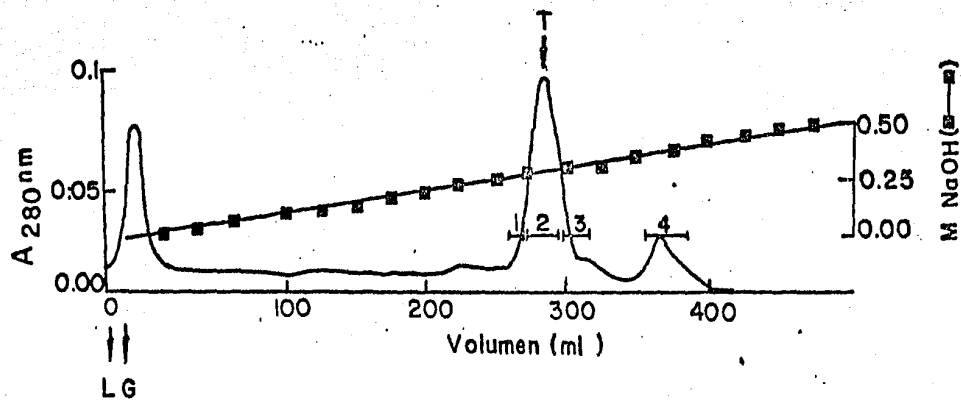


Figura 6. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción II-14 del veneno del C. noxius.

Se aplicó 5.81 mg de la fracción II-14 (10 ml) y se siguieron las mismas condiciones de la Fig. 4. La fracción II.14.2 es tóxica sin llegar a ser letal.

TABLA II. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LAS TOXINAS DE LOS ALACRANES

Grupo

1.	C.n.	II.9.2.2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKGGGYCYAF-----ACWC...
	C.n.	II.14	KDGYLVDAK-GCKKN CYKLGNDYCNRECRMKHRG...
	C.n.	II.13	KEGYIVDYHDGCKYXCYKLGDN DY...
	C.n.	II.10	KEGYLVNXY...
	Css	II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKSSGGYCYAF-----ACWC-THLY-EQAVVWPLPNK-TCN
	Css	III	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYKSSGGYCYAF-----ACWC-EALP-DHTOVW-VPNK--CT
	Css	I	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCL...
	CsE	I	KDGYLVEK-TGCKR TCYKLGENDFCNRECKWKHIGGSYGYCYGF-----GCYC-EGLP-DSTQTWPLPNK--CT
	C.e.	II.6.3	KEGYLVBHSTGCKYECFKLGDBDYCLRECR...
	CsE	v1	KEGYLVKKS DGCKYDCFWLKGNEHNTCECKAKNQQGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CS
CsE	v2	KEGYLVNKSTGCKY GCLKLGNEGNKCECKAKNQQGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CSS	
CsE	v3	KEGYLVKKS DGCKY GCLKLGNEGCDECKAKNQQGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK-SC	
2.	T.s.	III-10	KEGYLMD-HEGCKLSCF-IRPSGYGRECGIKK--GSSGYCAWP...
	T.s.	III-8	KEGYAMD-HEGCKFSCF-IRPAGFC DGYCKTHLK-ASSGYCAW...
	R.s.	IV-5	KKDGYPVE-YDNCA YICW-NYDNAYCDKLCCK-KK-ADSGYCYW...
3.	AaH	I	KRDGYIVYPN-NCVYHC VPP-----CDGLCKKN-GGSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPIKDTSRK--CT
	AaH	I'	KRDGYIVYPN-NCVYHC I'PP-----CDGLCKKN-GGSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPIKDTSRK--CT
	AaH	I''	KRDGYIVYPN-NCVYHC VPP-----CDGLCKKN-GGSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPIKDTSRK--CT
	AaH	III	VRDGYIVNSK-NCVYHC VPP-----CDGLCKKN-GAKSGS-CGFLIPSGLACWC-VALP-DNVPIKDPYSK--CHS
	Amm	III	GRDGYIVDTK-NCVYHC VPP-----CDGLCK...
4.	Bom	I	GRDGYIAQPE-NCVYHC FPGSHG--CDTLCKEK-GATSGX-CGFLP GXXVA...
	Bom	IV	GRDAYIAQPE-NCVYEC AKNSY---CNDLCTKX-GATSGY-CXW...
	Bom	VI	VRDAYIAQPD-NCVYHCAKDMY---CNDLCT...
	Bom	PI	GRDAYIAQPE-NCVYEC AKSSY---CNXLC...
5.	AaH	II	VKDGYIVDDV-NCTYFCGR--NAYCNEECTKL-KGESG-YCQWASPYGNACYCYK-LP-DHVRTKGPGR---CH
	Lqg	V	LKDGYIVDDK-NCTFFCGR--NAYCNDECKKK-GGESG-YCQWASPYGNACWCYK-LP-DRVSIKEKGR---CN
	Amm	V	LKDGYIIDD L-NCTFFCGR--NAYCDBECKKK-GGESG-YCQWASPYGNACWCYK-LP-DRVSIKEKGR---CN
	Bot	III	VKDGYIVDDR-NCTYFCGR--NAYCNEECTKL-KGESG-YCQWASPYGNACYCYK-VP-DHVRTKGPGR---CN
	Bot	XI	LKDGYIVDDR-NCTYFCGT--NAYCNEECVKL-KGE...
	Bep	M10	VRDGYIADDK-DCAYFCGR--NAYCDEECKK--GAESG-KCWYAGQYGNACWCYK-LP-DWVPIKQKVS GK-CN

TABLA II. (continuación)

Grupo

	Lqq	IV	GVRDAYIADDK-NCVYTCSG---NSYCNTTECTKD-GAESG-YCQWLKGYGNACWCIK-LP-DKVPPIRIP---GK-CR
	Amm	VI	DARDGYIVQPH-NCVYHCGK---NPHYC...
6.	Bot	II	GRDAYIAQPE-NCVYECAG---NSYCNLDLCTKN-GAKSG-YCQWLGRWGNACYC-IDLP-DKVPPIRIEGK---CHF
	Bot	I	GRDAYIAQPE-NCVYECAG---NSYCNLDLCTKD-GATSG-YCQWLKGYGNACWC-KDLP-DNVPPIRIPGK---CHF
	Bot	VIII	VRDAYIAQNY-NCVYTCKF---NDYCNLDLCTKN-GAXXG-YC...
	Lqq	III	VRDAYIAKNY-NCVYECFR---NSYCNLDL...
	Bop	I	GRGVYIADIA-NCAY...
	Bop	II	GRDAYIADDX-NCAYXCAL---XXYCN...
7.	C.N.	II-11	TII...
8.	AaH	IT	KKNGYAVDSS-GKAPECLL---SNYCNQCTKV-HYADKGYCCLL-----SCYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTTIIN
9.	Be	IT	MCMPCFTRPDMQQCRACCKGRGKCFGPQCLCGVD
	Amm P2		CGPCFTTDPYTESKCATCCGGRGKCVGPQCLCNRI

C.n. II.9.2.2., II-14, II-13, II-10, II-11 del Centruroides noxius activas en mamíferos (Possani y col., 1981); Cn I, II, III de Centruroides suffusus suffusus activas en mamíferos (García 1976; Zlotkin y col., 1978); CsE I activa en pollos del Centruroides sculpturatus Ewing (Babin y col., 1975), CsE v1, v2, v3 variantes del mismo veneno activas en insectos (Babin y col., 1974); T.S. III-10, III-8, IV-5 del Tityus serrulatus activas en mamíferos (Possani y col., 1981b); AaH I, I', I'', III, II del Androctonus australis Hector activas en mamíferos (Rochat y col., 1976; 1970 abc, 1972); AaH IT toxina del mismo alacrán activa en insectos (Zlotkin y col., 1971; Rochat y col., 1979); Amm III, V, VI del Androctonus mauretanicus mauretanicus activa en mamíferos; Amm P2 péptido homólogo al Be IT activa en insectos (Rochat y col., 1979); Be IT del Buthus epeus activa en insectos (Zhdavona y col., 1977); Bop I, II del Buthus occitanus paris activa en mamíferos (Rochat y col., 1976); Bot I, II, III, VIII, XI del Buthus occitanus tunetanus activa en mamíferos (Rochat y col., 1976, 1970b, 1979); Lqq III, IV, V del Leiurus quinquestriatus quinquestriatus activa en mamíferos (Kopeyan y col., 1978; Rochat y col., 1976, 1970). Be M10 del Buthus epeus activa en mamíferos (Grishin y col., 1981); Bom I, IV, VI, PI del Buthus occitanus mardochei (Vargas y col., 1982) Las secuencias de aminoácidos se alinearon respecto a la posición de los residuos de Cisteína y se asignaron arbitrariamente delecciones (-). (X) significa residuo no identificado.

TABLA III. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS TOXINAS DEL CENTRURÓIDES NOXIUS HOFFMANN

Aminoácido	II.9.2.2.* (II.9.1)	II.9.3	II.10* (II.10.3)	II.10.4	II.13* (II.13.1)	II.13.2	II.14* (II.14.1)	III.4 [‡]	IV. [‡]
Aspártico	6	(5.3) 5	6	(6.3) 6	6	(7.4) 7	7	(4.4) 5	4
Treonina	2	(1.9) 2	4	(5.3) 5	2	(3.0) 3	3	(1.8) 2	2
Serina	1	(3.5) 4	3	(10.3) 10	2	(6.2) 6	4	(4.1) 5	9
Glutámico	7	(6.6) 7	6	(7.9) 8	4	(6.5) 7	2	(6.8) 8	8
Prolina	2	(0.9) 1	2	(2.2) 2	2	(0.7) 1	2	(1.3) 1	1
Glicina	7	(7.2) 7	7	(9.9) 10	8	(9.9) 10	8	(7.2) 7	11
Alanina	4	(3.8) 4	3	(4.6) 5	4	(4.9) 5	1	(3.6) 4	4
Valina	2	(1.6) 2	1	(0.0) 0	2	(1.7) 2	1	(1.9) 2	2
Metionina	0	(0.0) 0	0	(0.0) 0	0	(0.1) 0	1	(0.0) 0	0
Isoleucina	1	(0.6) 1	1	(2.1) 2	1	(0.9) 1	0	(0.9) 1	1
Leucina	6	(5.3) 5	4	(3.2) 3	4	(3.8) 4	4	(3.7) 4	2
Tirosina	6	(4.7) 5	5	(2.3) 2	6	(5.8) 6	6	(4.1) 5	2
Fenilalanina	1	(1.1) 1	2	(1.7) 2	1	(1.4) 1	1	(1.0) 1	1
Histidina	1	(1.8) 2	1	(1.7) 2	1	(2.9) 3	1	(0.9) 1	1
Lisina	8	(5.2) 5	7	(3.7) 4	7	(7.1) 7	7	(4.5) 5	2
Arginina	2	(1.7) 2	2	(3.2) 3	2	(2.4) 2	3	(1.4) 2	1
Triptofano	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	(1.2) 1	1
Cisteína	8	n.d.	8	n.d.	8	n.d.	8	(4,3) 5-6	n.d.
Total	65	n.d.	62 + Trp	n.d.	60 + Trp	n.d.	59 + Trp	60 - 61	n.d.

* Valores tomados Possani y col., 1981.

‡ Valores tomados Dent y col., 1980.

n.d. = no determinado

Los valores entre paréntesis representan la integración de los valores reales que se llevaron a cabo de acuerdo al método de Moore y Stein (1963).

otras toxinas citadas en la literatura no contienen Metionina, excepto la toxina II-14 que presenta una. Es la primera toxina del género Centruroides descrita hasta el momento que contiene Metionina y constituye una excepción al igual que las toxinas II.11 (III-10, Y) y III-8 del T. serrulatus (Possani y col. 1981). Las toxinas II.10.4, II.13.2 y IV.2 presentan un alto contenido de Serina comparándolas con las otras toxinas descritas en la Tabla III.

Las secuencias que se aprecian en la Tabla II del género Centruroides presentan zonas de alta homología entre los residuos del 1-5, 8-10, 18-20, 21-25 y la posición de las cisteínas, a excepción de los tres primeros residuos obtenidos de la toxina II-11 que son totalmente diferentes al de todas las toxinas citadas hasta el momento en la literatura; posiblemente pertenezca esta toxina a una familia diferente (Carbone y col., 1982), en tanto todas las otras toxinas del género Centruroides, en que se conoce la secuencia N-terminal, pueden agruparse en un solo grupo (Ver Tabla II). Con las toxinas del T. serrulatus mantienen iguales los cuatro primeros residuos a las de los Centruroides, sin embargo, se observan claras diferencias que las hacen colocarse en dos grupos distintos. En general la porción C-terminal de las toxinas de los diferentes grupos es la más variable.

Considerando que este trabajo de tesis se ha centrado en forma preponderante en el aislamiento y en la composición química de las toxinas del alacrán de Nayarit, no se tomará tiempo y espacio para discutir en forma más general las secuencias de aminoácidos que aparecen en el trabajo N° 3 (Pág. 58) y en la Tabla II. Asimismo no se detendrá a discutir los -

resultados de resonancia magnética nuclear (NMR) y rotación óptica (CD) obtenidos con las toxinas de este alacrán y otras del alacrán Sudamericano. Se quiere, no obstante mencionar que se ha podido establecer por NMR y CD ciertas características importantes sobre la estructura secundaria y terciaria de estas moléculas, por ejemplo, la gran diferencia de estabilidad termodinámica de las toxinas del género Centruroides de México con las del género Tityus de Brasil.

IV. DISCUSION ESPECIFICA Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El estudio sobre las características de estas toxinas así como la determinación de su estructura primaria es uno de los pasos iniciales -- sobre el estudio del veneno de los alacranes. Una vez determinadas las se cuencias de aminoácidos las perspectivas se abren tanto en la parte química, sobre la localización del sitio activo de las toxinas mediante modificaciones químicas o por síntesis de péptidos en el laboratorio, como para estudios fisiológicos sobre las terminaciones nerviosas.

Como se mencionó anteriormente las toxinas actúan sobre los ca nales iónicos de las membranas nerviosas y por lo tanto pueden llegar a -- ser útiles herramientas específicas para estudios en Fisiología o en Bio-- química para el aislamiento de estos canales en las preparaciones biológicas.

Como se ha dicho, el conocimiento de los mecanismos de acción de las toxinas se inició con los alacranes norteafricanos, se observó que éstas actúan a nivel del canal de sodio y que su acción es dependiente del voltaje (Catterall, 1979). Se vió también que la toxina II del AaH afecta la cerrada del canal de sodio y la apertura del canal de potasio (Romey y col., 1975). En sistemas de cultivo de neuroblastomas (Catterall y col., 1976) y en preparaciones sinaptosomas (Jover y col., 1978) se ha demostrado que la afinidad de las toxinas por los sitios receptores depende del -- potencial de membrana: a mayor polaridad, mayor afinidad.

Sin embargo, con los alacranes del género Centruroides se ha -- observado ciertas diferencias, con la toxina II del C. suffusus suffusus

se demostró que no compiten con los Norteafricanos y que su acción es independiente del voltaje (Jover y col., 1980a).

Recientemente utilizando dos toxinas del veneno del C. noxius, se obtuvieron algunos datos nuevos complementarios, utilizando axones gigantes de calamar en experimentos de voltaje-sostenido ("voltage-clamp"). - (Carbone y col., 1981). Se encontró que la toxina II-10 actúa como bloqueador específico del canal de sodio, afectando exclusivamente la entrada del sodio en forma reversible. Utilizando la toxina II-11 se observó que esta afecta selectivamente el canal de potasio bloqueándolo también en forma reversible y son independientes del voltaje. Estos datos muestran claras diferencias con los venenos de los alacranes Norteafricanos que actúan sobre la inactivación del sodio, no son reversible, son dependientes del voltaje y al menos la toxina II del AaH no actúa en forma selectiva sobre un solo canal, sino que su acción se ejerce tanto sobre el canal de sodio como el de potasio. Estas diferencias por lo tanto crean mayor interés por el estudio de las toxinas del género Centruroides.

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de estas toxinas, permitirá la obtención de éstas mediante la síntesis de péptidos en el laboratorio, las cuales podrán utilizarse ya sea para los estudios sobre el modo de acción de las mismas o como herramientas para estudios neurofisiológicos.

De gran utilidad será también la determinación de la estructura primaria de estas toxinas para estudios taxonómicos y zoogeográficos. Dado que este tipo de trabajos en los alacranes no se han realizado más que en forma provisional, los estudios bioquímicos sobre la composición de su veno

no podrán compararse con las diferencias morfológicas y zoogeográficas que presentan.

Taxonómicamente, los trabajos sobre la estructura primaria del veneno del C. noxius mostrará al comparar las secuencias de sus toxinas -- con los otros venenos, si es realmente una especie endémica, desligada del resto de los Centruroides mexicanos como lo propone Hoffmann (1938). También podrá determinarse si el C.e. elegans que habita en Jalisco, Nayarit y Sinaloa es la misma subespecie con el que se localiza en Guerrero y Oaxaca, a pesar de encontrarse separados geográficamente o pertenecen a diferentes especies o subespecies. Asimismo con el C. infamatus que habita en el centro del país podrá verificarse su relación con el que se localiza en Jalapa, Ver. y clasificarlos ya sea como dos subespecies que habitan espacios distintos o como dos especies diferentes. De esta forma se podrán obtener mayores elementos de juicio para proponer la filogenia de estos organismos.

Otro factor que sería interesante investigar sería la posibilidad de encontrar diferencias en la composición del veneno de los alacranes de la misma especie situados en diferentes localidades, que se encuentren separados por unos cuantos Km de distancia entre ellos. Nosotros hemos siempre trabajado con una población muy grande de animales (alrededor de 10 a 40 mil individuos) de los cuales se ha obtenido el veneno y mezclado para el estudio bioquímico que se ha llevado a cabo. Si bien los individuos utilizados en estos trabajos provienen de regiones con un diámetro no mayor de 50 Km, sería interesante verificar si el veneno de poblaciones de alacranes de una misma localidad, muestra diferencias en relación con las

toxinas de otra población de la siguiente localidad, a pesar de que la distancia geográfica no fuera superior a los 50Km.

A pesar de que los alacranes no han presentado variaciones significativas en su estructura a lo largo del tiempo, es muy probable que su adaptabilidad ecológica, sí haya presentado cambios importantes en su fisiología, como lo sugieren las diferencias embrionarias entre algunas familias (Vachon, 1953), es decir, seguramente la composición de estos venenos estuvieron sujetos a importantes presiones de selección como resultado de las diferentes fuentes alimenticias a las que deben haber estado sujetos los alacranes a lo largo del tiempo, dando lugar a una adaptación química de los venenos.

Con base en el registro fósil los alacranes habitaron desde el Silúrico, esto significa que habitaron con los ostracodermos y cefalópodos de entonces (Camacho, 1974), seguramente las toxinas para crustáceos son un reflejo importante de este hecho, que demuestra la coexistencia de estos organismos. Recientemente hemos descubierto en el veneno del C. noxius que la fracción II-6 obtenida de la columna de CM-celulosa (Possani y col., 1981), es una potente toxina que actúa sobre crustáceos como acociles y cangrejos, mostrando una parálisis reversible en éstos.

Es de esperarse que si bien todavía no se ha demostrado la existencia de toxinas para insectos en el veneno del Centruroides noxius, éstas se encuentran presentes, dado que los alacranes son principalmente predadores de insectos y las toxinas para insecto son desde el punto de vista ecológico, el componente esencial de los venenos de los alacranes. Este tipo

de toxinas se han encontrado y estudiado en el veneno del C. sculpturatus (Babin y col., 1974).

Estos estudios sobre las toxinas para crustáceos y para insectos cobran mayor importancia tanto por su aspecto fisiológico sobre la acción neuronal de estos organismos, dado que se ha demostrado su acción sobre la actividad despolarizante de las membranas nerviosas de insectos (Walther y col., 1976), como por su aspecto evolutivo.

Posiblemente las homologías que se encuentren entre las toxinas para crustáceos de los alacranes Norteafricanos y los Americanos sean mayores que entre las toxinas para mamífero. Esto podría sugerir que los alacranes habitaron un espacio común antes de que los continentes se separaran. Posiblemente los alacranes se originaron en el continente de Gondwana, como sugiere la actual distribución geográfica de estos alacranes en el mundo y cruzaran los alacranes Norteamericanos, como los Centruroides, por el mar de Tetis hacia el continente de Laurasia. Si esto fuera cierto los alacranes Norteamericanos tendrían un origen Neártico y no Neotropical como podría suponerse. Esto podría explicar en gran parte la distribución geográfica del género Centruroides en México y por qué existe una escasa comunicación entre las especies de alacranes de América del Norte con los del Sur. También concordaría con Hoffmann (1938), el cual considera que estos alacranes han tenido una larga evolución aislada en centros de desarrollo distintos entre sí por largas épocas geológicas.

V. RESUMEN Y CONCLUSION

En resumen, se puede decir que el veneno del alacrán C. noxius contiene al menos 9 toxinas, dirigidas en contra de mamíferos y 1 en contra de crustáceos. Se pueden aislar estas toxinas por cromatografías sucesivas en columnas de Sephadex G-50, seguida por dos pasos de intercambio iónico - en diferentes sistemas amortiguadores.

La composición de aminoácidos revela que las toxinas para mamíferos son semejantes en cuanto al peso molecular, basicidad, composición de aminoácidos y secuencia N-terminal, excepto la toxina III.4 (II.9.3) y IV.2 (Dent y col., 1980) y la toxina II-11 (Carbone y col., 1982).

Desde el punto de vista fisiológico y del mecanismo de acción - molecular existen marcadas diferencias entre ellas. Estas diferencias probablemente se pueden explicar por la presencia de regiones variables en la secuencia de aminoácidos, que a su vez pueden producir diferencias a nivel de la estructura secundaria y terciaria de éstas.

En conclusión, queremos expresar nuestra opinión de que posible mente las toxinas de alacranes, bien estudiadas, puedan llegar a ser una de las herramientas más valiosas para el estudio de los mecanismos neurobiológicos y bioquímicos de comunicación entre las membranas celulares excitables y de ciertos mecanismos de secreción celular dependiente de iones. - También el estudio de su composición química pueden llegar a ser de gran valor para los estudios de Taxonomía y Evolución de estos organismos.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Adam, K.R., Weiss, C. (1958) The occurrence of 5-hydroxytryptamine in scorpion venom. *J. Exp. Biol.* 35: 39-41.
2. Adam, K.R., Weiss, C. (1959a) 5-hydroxytryptamine in scorpion venom. *Nature (Lond)*, 183: 1398.
3. Adam, K.R., Weiss, C. (1959b) Action of scorpion venom on skeletal muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 14: 334-339.
4. Adam, K.R., Schmidt, H., Stampfli, R., Weiss, C. (1966) The effect of scorpion venom on single myelinated nerve fibres of the frog. *Brit. J. Pharmacol.* 26: 666-677.
5. Alagón, A., Possani, L.D. (1981) Utilización de cromatografía por afinidad para la purificación de enzimas de venenos animales. I *Simp. Intern. sobre Biotec. de Enzimas.*
6. Alagón, A., Possani, L.D., Erickson, B.W. (1978) Isolation and characterization of several proteins from Tityus serrulatus scorpion venom. *Proc. 5th Inter. Symp. on Animal, Plant and Microbial Toxins.* San José, Costa Rica. Pergamon Press, New York. pp. 609-618.
7. 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.
8. 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.
9. Balozet, L. (1971) Scorpionism in the old world, In: *Venomous Animals and their Venoms.* Eds. Bücherl, W., Buckley E.E. Vol. III. Academic Press, New York, pp 349-371.

10. Bernard, P., Couraud, F., Lissitzky, S. (1977) Effects of a scorpion toxin from Androctonus australis venom on action potential of neuroblastoma cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 782-788.
11. Bravo-Becherelle, M.A. y Mazzotti, L. (1961) Distribución geográfica de la mortalidad por picadura de alacrán en México. *Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx.)* 21: (3-4) 129-140.
12. Brazil, O.V., Neder, A.C., Corrado, A.P. (1973) Effects and mechanisms of action of Tityus serrulatus venom on skeletal muscle. *Pharmacol. Res. Commun.* 5: 137-150.
13. Bücherl, W. (1971) Classification, biology and venom extraction of scorpions. In: *Venomous animals and their venoms*. Eds. Bücherl, W., Buckley, E.E. Vol. III. Academic Press, New York, London pp. 317-347.
14. Cahalan, M.D. (1975) Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by Centruroides sculpturatus scorpion venom. *J. Physiol.* 244: 511-534.
15. Camacho, H.H. (1974) *Invertebrados Fósiles*. Editorial Universitaria de Buenos Aires.
16. 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.
17. Catterall, W.A. (1975) Cooperative activation of action potential Na^+ ionophore by neurotoxins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 (5): 1782-1786.
18. Catterall, W.A. (1977) Activation of the action potential Na^+ ionophore by neurotoxins. *Jour. Biol. Chem.* 252 (23): 8669-8676.

19. Catterall, W.A. (1979) Neurotoxins as allosteric modifiers of voltage-sensitive sodium channels. In: Advances in Cytopharmacology Vol. 3. Ed. B. Ceccarelli and F. Clementi. Raven Press, New York pp. 305-316.
20. Catterall, W.A. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 15-43.
21. Catterall, W.A., Ray, R., Morrow, C. (1976) Membranes potential dependent binding of scorpion toxin to action potential Na^+ ionophore. Proc. Natl. Acad. Sci. 73 (8): 2682-2686.
22. Catterall, W.A., Beress, L. (1978) Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. Jour. Biol. Chem. 253 (20): 7393-7396.
23. Catterall, W.A., Beneski, D.A. (1980) Interaction of polypeptide neurotoxins with a receptor site associated with voltage-sensitive sodium channels. Jour. Supramol. Structure 14: 295-303.
24. Celeste Henriques, M., Gazzinelli, G., Diniz, C.R., Gómez, M.V. (1968) Effect of the venom of the scorpion Tityus serrulatus on adrenal gland catecholamines. Toxicon 5: 175-179.
25. Celeste Henriques, M., Gómez, M. V. (1975) Effect of scorpion venom, tityustoxin on the uptake of calcium by isolated nerve ending particles from bain. Brain Res. 93: 182-187.
26. Corrado, A.P., Riccioppo Neto, F. and Antonio A. (1974) The mechanism of the hypertensive effect of Brazillian scorpion venom (Tityus serrulatus Lutz e Mello). Toxicon 12: 145-150.
27. Couraud, F., Rochat, H. and Lissitzky, S. (1978) Binding of scorpion and sea anemone neurotoxins to a common site related to the action potential Na^+ ionophore in neuroblastoma cells. Bioch. Biophys. Res. Comm. 83 (4): 1525-1530.

28. Couraud, F., Rochat, H. and Lissitzky, S. (1980) Binding of scorpion neurotoxins to chick embryonic heart cells in culture and relationship to calcium uptake and membrane potential. *Biochemistry* 19 (3): 457-461.
29. Cunha-Melo, J.R., Freire-Maia, L. Tafuri, W.L., Maria, T.A. (1973) Mechanism of action of purified scorpion toxin on the isolated rat intestine. *Toxicon* 11: 81-84.
30. Cheymol, J., Bourillet, F., Roch-Arveilier, M., Heckle, J. (1974) Action cardiovasculaire de trois venins de scorpions nord-africains (A. australis, L. quinquestriatus, B. occitanus) et de deux toxines extraites de l'un d'entre eux. *Toxicon* 12: 277-282.
31. Chicheportiche, R., Lazdunski, M. (1970) The conformation of small proteins. The state-diagram of a neurotoxin of Androctonus australis Hector. *Eur. J. Biochem.* 14: 549-555.
32. Del Pozo, E.C. (1948) The action of the venom of a mexican scorpion (Centruroides noxius, Hoffmann) on cholinesterases. *Brit. J. Pharmacol.* 3: 219-222.
33. Del Pozo, E.C. (1956) Mechanism and pharmacological actions of scorpion venoms. In: *Venoms*. Eds. Buckley, E.E., Porges, N. Amer. Ass. Advanc. Sci. p. 123.
34. Del Pozo, E.C. (1962) Estudios experimentales sobre las acciones del veneno de alacrán. *Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx.)*. 22(3-4): 173-178.
35. Del Pozo, E.D., Anguiano, L.G. (1947) Acciones del veneno de alacrán sobre la actividad motora de músculo estriado. *Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx.)* 8: 231-263.
36. Dent, M.A.R., Possani, L.D., Ramírez, G.A., Fletcher, P.L. Jr. (1980) Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. *Toxicon* 18: 343-350.

37. Díaz Nájera, A. (1970) Contribución al conocimiento de los alacra nes de México (Scorpionida). Rev. Inv. Sal. Publ. (Méx.) 30(2): 111-122.
38. Erickson, B.W. (1978) Sequence homology of snake, scorpion and bee toxins. In: Toxins: Animal, Plant and Microbial (Proceed V Inter. Sym.) Ed. P. Rosenberg. Pergamon Press, Oxford, New York. pp. 1071-1086.
39. Fayet, G., Couraud, F., Miranda, F. Lissitzky, S. (1974) Electro-optical system for monitoring activity of heart cells in culture: application to the study of several drugs and scorpion toxins. Eur. J. Pharmacol. 27: 165-174.
40. Flores, R. (1963) Observaciones sobre la sintomatología y trata- miento de la intoxicación por picadura de alacrán. Rev. Ins. Sal. Enf. Trop. (Méx.) 23 (3-4): 175-178.
41. Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D. Bugg, Ch.E. (1980) Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. 77(11): 6496-6500.
42. Fraenkel, G., Zlotkin, E. (1970) Acceleration of puparium forma- tion in Sarcophaga argyrostoma by electrical stimulation and scorpion venom. J. Insect. Physiol. 16: 1549-1554.
43. Freiré-Maia, L., Ribeiro, R.M. Berald, W.T. (1970) Effects of purified scorpion toxin on respiratory movements in the rat. Toxicol. 8: 307-310.
44. 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.

45. Freire-Maia, L., Cunha-Melo, J.R., Gómez, M.V. Tafuri, W.L., Maria, T.A., Calixto, S.L., Futuro-Neto, H.A. (1976) Studies on the mechanism of action of Tityustoxin. In: Animal, Plant and Microbial toxins. Ed. A Ohsaka, K. Hayashi and Y. Sawai. Plenum Press, New York Vol. 2. pp 273-285.
46. Furst, P., Nahmad, S. (1972) Mitos y arte Huicholes. Sep. Setentas, Méx.
47. García, G.P. (1976) Étude des neurotoxines du venin du scorpion mexican Centruroides suffusus suffusus. Francia. Tesis (Doctorado) Universidad de Nice, Francia.
48. Gómez, M.V., Diniz, C.R. (1966) Separation of toxic components from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus venom. Mem. Inst. Butantan Simp. Intern. 33(3): 899-902.
49. Gómez, M.V., Dai, M.E. and Diniz, C.R. (1973) Effect of scorpion venom, Tityustoxin, on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. J. Neur. 20: 1051-1061.
50. Grishin, E.V., Soldatov, N.M., Soldatova, L.N., Ovchninnikov, Y.A. (1978). Studies of the toxins from Buthus eupeus scorpion venom. 5th Inter. Symposium on Animal Plant and Microbial Toxins, San José Costa Rica, Pergamon Press, New York.
51. Gueron, M., Yarom, R. (1970) Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting. Clinopathologic Correlations. Chest. 57: 156-162.
52. Hoffman, C.C. (1932) Monografías para la entomología médica de México. Monografía Núm. 2. Los escorpiones de México. Segunda Parte: Buthidae. Anales. Inst. Biol. 9(1,2): 318-337.
53. Hoffmann, C.C. (1938) Nuevas consideraciones acerca de los alacranes mexicanos. An. Inst. Biol. 9(1,2): 318-337.

54. Hoffmann, C.C., Vargas, R. (1935) Contribuciones al conocimiento de los venenos de los alacranes mexicanos. *Inst. Hig.* 2(4): 182-193.
55. Ismail, M., Osman, O.H., Ibrahim, S.A., El-Asmar, M.F. (1972) Cardiovascular and respiratory responses to the venom from the scorpion Leiurus quinquestriatus. *E. Afr. Med. J.* 49: 279-285.
56. Ismail, M., Osman, O.H., El-Asmar, M.F. (1973) Pharmacological studies of the venom from the scorpion Buthus minax (L. Koch). *Toxicon* 11: 15-20.
57. Jaques, R. (1956) The hyaluronidase content of animal venoms. *In: Venoms, Amer. Ass. Advanc. Sci.* 291.
58. Jover, E., Martin-Moutot, N., Couraud, F., Rochat, H. (1978) Scorpion toxin: Specific binding to rat synaptosomes. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 85(1): 377-382.
59. Jover, E., Martin-Moutot, N., Couraud, F., Rochat, H. (1980a) Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins. *Biochemistry* 19: 463-467.
60. Jover, E., Couraud, F., Rochat, H. (1980b) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 95(4): 1607-1614.
61. Katz, B., Miledi, R. (1967) Ionic requirements of synaptic transmitter release. *Nature (Lond)* 215: 651.
62. Katz, N.L., Edwards, Ch. (1972) The effect of scorpion venom on the neuromuscular junction of the frog. *Toxicon* 10: 133-137.
63. Kopeyan, C., Martínez, G., Lissitzky, S., Miranda, F., Rochat, H. (1974) Disulfide bonds of toxin II of the scorpion Androctonus australis Hector. *Eur. J. Bioch.* 47: 483-489.

64. Kopeyan, C., Martínez G., Rochat, H. (1978) Amino acid sequence of neurotoxin V from the scorpion Leiurus quinquestriatus quinquestriatus. FEBS Letters 89(1): 54-58.
65. Koppenhöfer, E., Schmidt, H. (1968) Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. *Experientia* (Basel) 24: 41-42.
66. La Grange, R.C. Russell, F. (1971) Effects of Centruroides sculpturatus and C. gertschi venom on the mammalian nerve-muscle preparation: a possible mechanism of action. *Proc. West.Pharmacol. Soc.* 14: 163-165.
67. Lazarovici, P., Yanai, P., Pelhate, M., Zlotkin, E. (1982) Insect Toxic components from the venom of a Chaetoid scorpion, Scorpio maurus palmatus (Scorpionidae). *Jour. Biol. Chem.* 257(14): 8397-8404.
68. Lin, S.S., Huang, M., Tseng, W.C., Lee, C.Y. (1975) Comparative studies on the muscular contracture induced by cobra cardiotoxin and scorpion toxin. Communication at 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. Tokyo 1974. *Toxicon* 13: 108.
69. Lissitzky, S., Miranda, F., Etzensperger, P., Mercier, J. (1956) Sur la toxicité du venin de deux especes de scorpion nord-africains. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*. 150: 741-743.
70. Macedo, T.M., Gómez, M.V. (1982) Effects of tityustoxin (TsTx) from scorpion venom on the release and synthesis of acetylcholine in brain slices. *Toxicon* 20(3): 601-606.
71. Master, R.W.S., Rao, S., Soman, P.D. (1963) Electrophoretic separation of biologically active constituents of scorpion venom. *Bioch. Biophys. Acta* 71: 422.
72. Mazzoti, L., Bravo-Becherelle, M.A. (1961) Escorpionismo en la República Mexicana. *Rev. Ins. Sal. Enf. Trop. (Méx.)* 21(1-2): 3-19.

73. McInstosh, 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 E. Kochva. Vol. 2, Gordon and Breach, New York pp 529-544.
74. Meves, H., Rubly, N., Watt, D.D. (1982) Effect of toxins isolated from the venom of the scorpion Centruroides sculpturatus on the Na⁺ Currents of the node of Ranvier. Pflügers Arch. 393: 56-62.
75. Miranda, F., Rochat, H., Lissitzky, S. (1960) Sur la neurotoxine du venin de scorpion. I-Purification a partir du venin de deux especes de scorpions nord-africains. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 42: 379-391.
76. Miranda, F., Rochat, H., Lissitzky, S. (1961) Sur la neurotoxine du venin des scorpions. II- Utilisation de l"électrophorese sur papier pour l'orientation et le controle de la purification. Biochimie. 43: 945-952.
77. Miranda, F., Kopeyan, 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 tunetanus and Leiurus quinques-triatus. Eur. J. Biochem. 16: 514-523.
78. Mohamed, A.H. (1942) Preparation of antiscorpion serum. Use of atropine and ergotine. Lancet 2: 364-365.
79. Mohamed, A.H., Kamel, A., Ayobe, M.H. (1969a) Studies of phospholipase A and B activities of egyptian snake venoms and scorpion toxin. Toxicon 6: 293-298.
80. Mohamed, A.H., Kamel, A., Ayobe, M.H. (1969b) Some enzymatic activities of egyptian snake venoms and a scorpion Venom. Toxicon 7: 185-188.

81. Moody, P.A. (1962) Introduction to Evolution. Harper & Row, New York and John Weatherhill, Inc., Tokyo.
82. Moore, S. and Stein, W.H. (1963) in Methods in Enzymology (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. eds.) Vol. 6 Academic Press, New York pp 819-831.
83. Moos, J., Thoa, N.B., Kopin, I.J. (1974) On the mechanism of scorpion toxin induce release of norepinephrine from peripheral adrenergic neurons. J. Pharm. Exp. Ther. 190(1): 39-48.
84. Narahashi, T., Deguchi, T., Urakawa, N., Ohkubo, Y. (1960) Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin. Am. J. Physiol. 198: 934-938.
85. Narahashi, T. Moore, J.W., Scott, W.R. (1964) Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. J. Gen. Physiol. 47: 965-974.
86. Narahashi, T., Shapiro, B.I., Deguchi, T., Scuka, M., Wang, Ch.M. (1972) Effects of scorpion venom on squid axon membranes. Am. J. Physiol. 222: 850-857.
87. Parnas, I., Avgar, D., Shulov, A. (1970) Physiological effects of venom of Leiurus quinquestriatus on neuromuscular systems of locust and crab. Toxicon 8: 67-79.
88. Patterson, R.A. (1962) Pharmacologic action of scorpion venom on intestinal smooth muscle. Toxicol appl. Pharmacol. 4: 710-719.
89. Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, P.L., Jr., Erickson, B.W. (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.

90. 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.
91. Possani, L.D., Fletcher, P.L. Jr., Alagón, A.B.C., Alagón, A.C., Juliá, J.Z. (1980) Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the mexican scorpion, Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. Toxicon 18: 175-183.
92. Possani, L.D., Steinmetz, W.E., Dent, M.A.R., Alagón, A.C., Wuthrich, K. (1981a) Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. Bioch. Bioph. Acta 669: 183-192.
93. Possani, L.D., Dent, M.A.R., Martin, B.M., Maelicke, A., Svendsen, I. (1981b) The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 46: 207-214.
94. Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J., Svendsen, I. (1981c) 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.
95. Rochat, C., Rochat, H., Miranda, F., Lissitzky, S. (1967) Purification and some properties of the neurotoxins of Androctonus australis Hector. Biochemistry 6: 578-585.
96. Rochat, H., Rochat, C., Kopeyan, C., Miranda, F., Lissitzky, S., Edman, P. (1970a) Scorpion neurotoxins: a family of homologous proteins. FEBS Lett. 10: 359-351.
97. 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.

98. 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.
99. Rochat, H., Kopeyan, C., García, L.G., Martínez, G., Rosso, J.P., Pakaris, A., Martin, M.F., García, 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. pp. 79-87.
100. Rochat, H., Bernard, P., Couraud, F. (1979) Scorpion Toxins: Chemistry and mode of action. In Advances in Cytopharmacology Vol. 3, ed. B. Ceccarelli and F. Clementi. Raven Press, New York.
101. Romey, G., Chicheportiche, R., Lazdunski, M., Rochat, H., Miranda, F., Lissitzky, S. (1975) Scorpion neurotoxin: a presynaptic toxin which affects both Na^+ and K^+ channels in axons. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64: 115-121.
102. Sampieri, F., Habersetzer-Rochat, C. (1975) Structure function relationship of scorpion neurotoxins. Communication at the 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxin. Tokyo (1974) Abstract: Toxicon 13: 120.
103. Selvarajan, V.R., Narayana Reddy, K., Swami, K.S. (1975) Scorpion Venom effects on succinate dehydrogenase activity of sheep tissues. Toxicon 13: 143-144.
104. Shigenobu, K., Sperelakis, N. (1971) Development of sensitivity to tetrodotoxin of chick embryonic hearts with age. J. Molec. Cell. Cardiol. 3: 271-286.
105. Shulov, A., Levy, G. (1978) Venoms of Buthinae. In: Arthropod Venoms Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 48 Ed. Sergio Bettini. Springer-Verlag, New York. pp. 309-317.

106. Stahnke, H.L. (1963) Some pharmacological and biochemical characteristics of Centruroides sculpturatus venom. 2nd Int. Pharm. Meeting Prague pp. 63-70.
107. Stahnke, H.L. (1971) Some observations of the genus Centruroides (Buthidae, Scorpionida). Entomol. News 82: 281-307.
108. Tazieff-Depierre, F. (1972) Venin de Scorpion, calcium et émission d'acetylcholine par les fibres nerveuses dans l'ileon de cobaye. C. R. Acad. Sci. (Paris) D. 275: 3021-3023.
109. Tintpulver, M. (1975) The action of different toxins derived from scorpion venom on the ileal smooth muscle preparation. M. Sc. thesis, Hebrew University Jerusalem.
110. Tintpulver, M., Zerachia, T., Zlotkin, E. (1976) The action of toxins derived from scorpion venom on the ileal smooth muscle preparation. Toxicon 14: 371-377.
111. Toledo, D., Neves, A. (1976) Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion Tityus serrulatus. Comp. Biochem. Physiol. 55b: 249-253.
112. Vachon, M. (1953) La Biología de los Escorpiones. Endeavour 12 (46): 80-89.
113. Vargas, O., Gregoire, J., Martin, M.F., Bechis, G., Rochat, H. (1982) Neurotoxins from the venoms of two scorpions: Buthus occitanus tunetanus and Buthus occitanus mardochei. Toxicon 20(1): 79.
114. Walther, Ch., Zlotkin, E., Rathmeyer, W. (1976) Action of different toxins from the scorpion Androctonus australis on a locust nerve-muscle preparation. J. Insect. Physiol. 22: 1187-1194.
115. Watt, D.D. (1964) Biochemical studies of the venom from the scorpion Centruroides sculpturatus. Toxicon 2: 171-180.

116. Watt, D.D., Babin, D.R., Mlejnek, R.V. (1974) The protein neurotoxin in scorpion and elapid snake venoms. *J. Agric. Food Chem.* 22: 43-51.
117. Watters, J.J., Possani, L.D., Mochca-Morales, J., Hess, B. (1981) Determination of alfa-helix and beta-sheet structure in toxins purified from the venoms of Latin American scorpions. 4th Eur. Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Marseille, Francia. Abstract: *Toxicon* 20(1): 81.
118. Wilson, W.H. (1904) The physiological action of scorpion venom. *J. Physiol. (Lond)* 31: 48-49.
119. Yarom, R., Braun, K. (1971) Ca^{24} changes in the myocardium following scorpion venom injections. *J. Molec. Cell Cardiol.* 2: 177-179.
120. Zhdavona, L.N., Adamovich, T.B., Nazimov, I.V., Grishin, E.V., Ovchinnikov, Y.A. (1977) *Bioorganidreskaya Khim* 3: 485-493.
121. Zlotkin, E., Blondheim, S.A., Shulov, A. (1970) Effect of the venom of the scorpion Leiurus quinquestriatus on the tympanic nerve of the locust Locusta migratoria migratorioides. *Toxicon* 8: 47-49.
122. Zlotkin, E., Fraenkel, G., Miranda, F., Lissitzky, S. (1971a) The effect of scorpion venom on blowfly larvae: a new method for the evaluation of scorpion venom potency. *Toxicon* 9: 1-8.
123. Zlotkin, E., Rochat, H., Kopeyan, C., Miranda, F., Lissitzky, S. (1971b) Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion Androctonus australis Hector. *Biochimie* 53: 1073-1078.
124. Zlotkin, E., Lebovitz, N., Shulov, A. (1972a) Toxic effects of the venom of the scorpion Scorpio maurus palmatus (Scorpionidae). *Riv. Parassit.* 33: 237-243.

125. Zlotkin, E., Miranda, F., Lissitzky, S. (1972b) A toxic factor to crustacean in the venom of the scorpion Androctonus australis Hector. Toxicon 10: 211-216.
126. Zlotkin, E. (1973) Chemistry of animal venoms. Experientia (Basel) 29: 1453-1466.
127. Zlotkin, E., Martínez, G., Rochat, H., Miranda, F. (1976) A protein from scorpion venom toxic to crustaceans. In: Animal, Plant and Microbial Toxins. Eds. A. Ohsaka, K. Hayashi and Y. Sawai. Plenum Press, N.Y. pp 73-80.
128. Zlotkin, E. Miranda, F., Rochat, H. (1978) Chemistry and Pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In: Arthropod Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 48. Ed. Sergio Bettini. Springer Verlag, New York. pp. 317-369.