

0307218
2eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES.**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PEPTIDOS
SEMEJANTES A LA NOXIUSTOXINA DEL VENENO
DEL ALACRAN CENTRUROIDES NOXIUS.**

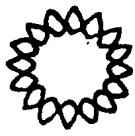
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

ALEJANDRO NIETO RODRIGUEZ



**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.

RESUMEN

El veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann ha sido objeto de numerosos estudios por parte del grupo del Dr. Possani (Possani L.D. y cols.1981, Possani L.D. y cols.1982, Valdivia H. y cols. 1988, Zamudio F. y cols. 1992, Gurrola G. y cols.1992, Vaca L. y cols. 1993, Vázquez A. y cols. 1993). Dada la importancia médica y favorecidos por contar en el país con esta especie de alacrán, el estudio de *C.noxius* (colectado en el estado de Nayarit) se ha desarrollado de manera amplia dentro del grupo, tratando de caracterizar los péptidos que presentan acción biológica a nivel de canales iónicos.

Con la ayuda de métodos cromatográficos a través de columnas de filtración molecular, intercambio iónico y cromatografía líquida de alta presión (CLAP), se aislaron varios péptidos que presentan semejanza con la Noxiustoxina (NTX), un péptido básico de 39 aminoácidos con actividad sobre canales de K⁺. Ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA) con el empleo de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra NTX permitieron identificar a través de los pasos de purificación los péptidos semejantes a la NTX.

Asímismo la caracterización química por medio de análisis y secuencia de aminoácidos, confirmaron la gran homología a nivel de estructura primaria que presentan algunos de éstos péptidos con la NTX.

Hasta el momento se han obtenido la secuencia N-terminal de 6 péptidos semejantes a NTX, así como la secuencia completa de aminoácidos de un péptido que dada su homología con NTX se ha llamado NTX-2. Con éste péptido se realizaron estudios de desplazamiento de (¹²⁵I)NTX en una preparación de membranas de cerebro de rata. Los resultados obtenidos sugieren que la NTX-2 compete con baja afinidad por el sitio de unión a NTX.

Aún cuando la homología presentada en la secuencia de aminoácidos entre la NTX y NTX-2 es elevada (cerca del 67%) el efecto tóxico de la NTX-2 sobre mamíferos a diferencia de la NTX es nulo. Sin embargo al efectuar los ensayos de toxicidad sobre insectos (grillos), se observó un efecto que según la sintomatología presentada puede considerarse como altamente tóxico. De igual manera éste péptido no presentó ningún efecto tóxico sobre crustáceos (acociles), a las concentraciones ensayadas.

Actualmente se está tratando de determinar la posición de los puentes disulfuro, así como su actividad sobre canales de potasio mediante ensayos electrofisiológicos.

Vo. Bo. Tutor

Dr. Lourival D. Possani

Este trabajo fué realizado en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani Postay, en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Biotecnología/UNAM, Cuernavaca Morelos.

TUTORES:

Tutor :

Dr. Lourival D. Possani Postay

Co-Tutores:

Dr. Jean Louis Charli Casalonga

M. en C. Georgina Gurrola Briones

Dr. Miguel Angel Cevallos

A Dios, por haberme puesto en este camino

A mis padres, por ser lo que soy

A mis hermanos, por ser parte de una maravillosa familia

**A Mary Paz, Lizzet G. y Ana Karen por su amor y confianza,
que le han dado otra perspectiva a mi vida.**

AGRADECIMIENTOS:

Deseo agradecer profundamente a la UNAM, a través de la Dirección General de Intercambio Académico, por el apoyo brindado al inicio de la Maestría y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca asignada, ya que de esta manera pude continuar mi formación académica en este Instituto.

Al jurado asignado para la calificación de esta Tesis por la dedicación prestada durante su realización:

Presidente: Dr. Jean Louis Charli Casalonga
Secretario: Dr. Lourival Domingos Possani Postay
Vocal: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz
Suplente : M. en C. Georgina Gurrola Briones
Suplente: Dr. Miguel Lara Flores

Esta tesis fué financiada en parte por los donativos : Howard Hughes Medical Institute No. 75191-527104, DGAPA-UNAM No. IN205893, CONACyT No. 0018-N9105, concedidos al laboratorio del Dr. L.D. Possani.

Al Dr. Possani por su apoyo y críticas dentro y fuera del laboratorio.

A Georgina Gurrola por todo el tiempo y dedicación mostrada durante el desarrollo de este trabajo .

A mis compañeros por su asistencia técnica: Fernando Zamudio (Secuencia de aminoácidos), Timoteo Olamendi (CLAP y Análisis de aminoácidos), Sandra Contreras (CLAP) y a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio por su apoyo y compañía, y aquéllos que no lo hicieron igualmente gracias por ser parte de las cosas que me motivan a superarme.

A todos mis amigos de la "Casa de estudiantes de Pericón", donde realmente llegue a conocer y apreciar al Instituto y a su gente.

Quiero agradecer en especial a Carlos González, Raunel Tinoco, Renaud Condé, Alejandra Vázquez y Fernando Martínez por haberme brindado su amistad y apoyo incondicional y haber compartido los momentos más difíciles durante mi estancia en Cuernavaca.

LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BNTX	Nomenclatura utilizada para los anticuerpos de la NTX
β -BTX	β -Bungarotoxina
CLAP	Cromatografía Líquida de Alta Presión
CMC	Carboximetil celulosa
ChTX	Caribdotoxina
DTT	Ditiotreitol
DTX	Dendrotoxina
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
h	Hora
IbTX	Iberiotoxina
KTX	Kaliotoxina
M	Molar
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
mg	Miligramo
MgTX	Margatoxina
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NTX	Noxiustoxina
NTX-2	Noxiustoxina -2
OPD	Orto-fenil diamina
PTH	Fenilisotidantofina
TFA	Ac. Trifluoroacético

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Filtración del veneno de *C. noxius* a través de Shepadex G-50 medio.
- Figura 2** Cromatografía en CMC-32 de la FII
- Figura 3** Recromatografía de las fracciones 11a y 11b
- Figura 4** Separación cromatográfica de la FII a través de una columna de intercambio iónico
- Figura 5** Perfil cromatográfico de la F II 11b por CLAP
- Figura 6** Reconocimiento por ELISA de los componentes de la FII 11b
- Figura 7** Cromatografía a concentración constante de eluyentes del péptido 36.26
- Figura 8** Reconocimiento por ELISA del péptido NTX-2
- Figura 9** Fraccionamiento de la FII a través de CLAP
- Figura 10** Reconocimiento por anticuerpos policlonales en un ensayo de ELISA de los componentes de la fracción II
- Figura 11** Reconocimiento por ELISA con anticuerpos monoclonales anti-NTX de los componentes de la F II purificados por CLAP
- Figura 12** Análisis por CLAP de la digestión e hidrólisis del péptido NTX-2
- Figura 13** Curva de desplazamiento de la unión de [¹²⁵I]NTX a P 3
- Figura 14** Curva de concentración-respuesta de la NTX y NTX-2 sobre un canal de potasio.

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 Análisis de aminoácidos de la NTX-2

TABLA 2 Determinación de la estructura primaria de la NTX-2

TABLA 3 Secuencias amino terminal de algunos péptidos homólogos a NTX

TABLA 4 Comparación de secuencias de toxinas que actúan sobre canales de K⁺

INDICE

	Página
RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	2
1. GENERALIDADES	2
A) ANTECEDENTES HISTORICOS	2
B) CLASIFICACION BIOLOGICA DE LOS ALACRANES	3
C) COMPOSICION DEL VENENO DE ALACRAN	3
D) CLASIFICACION DE LAS TOXINAS	4
E) ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS	5
F) MECANISMOS DE ACCION	6
a) Efecto a nivel sistémico	7
b) Acción a nivel molecular	7
F) CANALES IONICOS	8
G) TOXINAS QUE ACTUAN SOBRE CANALES DE POTASIO	9
2. CARACTERIZACION QUIMICA DE PROTEINAS	13
A) ANALISIS DE AMINOACIDOS	13
B) SECUENCIA DE AMINOACIDOS	13
II.- ANTECEDENTES	15
III.- OBJETIVOS	16
IV.- MATERIAL Y METODOS	17
1. MATERIALES	17
2. PURIFICACION DE PEPTIDOS SEMEJANTES A LA NTX	17

3. ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO (ELISA)	19
4. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS	20
5. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	20
A) Reducción y alquilación de toxinas	21
B) Digestión enzimática y química	21
6. ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE $[^{125}\text{I}]\text{NTX}$ POR LA NTX-2	22
A) Iodación de NTX y NTX-2	22
B) Preparación de membranas de cerebro de rata (P 3)	22
C) Curvas de desplazamiento	23
7. BIOENSAYOS	23
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
VI.- CONCLUSIONES	53
VII.- PERSPECTIVAS	54
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	55

RESUMEN

El veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann ha sido objeto de numerosos estudios por parte del grupo del Dr. Possani (Possani L.D. y cols.1981, Possani L.D. y cols.1982, Valdivia H. y cols. 1988, Zamudio F. y cols. 1992, Gurrola G. y cols. 1992, Vaca L. y cols. 1993, Vázquez A. y cols. 1993). Dada la importancia médica y favorecidos por contar en el país con esta especie de alacrán, el estudio de *C.noxius* (colectado en el estado de Nayarit) se ha desarrollado de manera amplia dentro del grupo, tratando de caracterizar los péptidos que presentan acción biológica a nivel de canales iónicos.

Con la ayuda de métodos cromatográficos a través de columnas de filtración molecular, intercambio iónico y cromatografía líquida de alta presión (CLAP), se aislaron varios péptidos que presentan semejanza con la Noxiustoxina (NTX), un péptido básico de 39 aminoácidos con actividad sobre canales de K^+ . Ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA) con el empleo de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra NTX permitieron identificar a través de los pasos de purificación los péptidos semejantes a la NTX.

Asimismo la caracterización química por medio de análisis y secuencia de aminoácidos, se confirmó la gran homología a nivel de estructura primaria que presentan algunos de éstos péptidos con la NTX.

Hasta el momento se han obtenido la secuencia N-terminal de 6 péptidos semejantes a NTX, así como la secuencia completa de aminoácidos de un péptido que dada su homología con NTX se ha llamado NTX-2. Con éste péptido se realizaron estudios de desplazamiento de [^{125}I] NTX en una preparación de membranas de cerebro de rata. Los resultados obtenidos sugieren que la NTX-2 compete con baja afinidad por el sitio de unión a NTX.

Aún cuando la homología presentada en la secuencia de aminoácidos entre la NTX y NTX-2 es elevada (cerca del 67%) el efecto tóxico de la NTX-2 sobre mamíferos a diferencia de la NTX es nulo. Sin embargo, al efectuar los ensayos de toxicidad sobre insectos (grillos), se observó un efecto que según la sintomatología presentada puede considerarse como altamente tóxico. De igual manera éste péptido no presentó ningún efecto tóxico sobre crustáceos (acociles), a las concentraciones ensayadas.

Actualmente se está tratando de determinar la posición de los puentes disulfuro, así como su actividad sobre canales de potasio mediante ensayos electrofisiológicos.

I.- INTRODUCCION

1. GENERALIDADES

A) ANTECEDENTES HISTORICOS

El alacrán o escorpión es uno de los organismos más antiguos que se conocen, su presencia sobre la tierra se remonta a los 450 millones de años. Su registro fósil data del período silúrico. Se supone evolucionaron de los euriptéridos, según evidencias paleontológicas. Los escorpiones silúricos fueron acuáticos, poseían branquias y no tenían pinzas tarsales. Nuevas evidencias han confirmado que la tradicional división de quelcerados dentro del grupo principal acuático Merostomata (Xífopsúridos y Euriptéridos) y el principal grupo terrestre Arácnida basaron sus diferencias en preferencias ambientales.

La interpretación de escorpiones fósiles como seres acuáticos no se basa únicamente en el descubrimiento de agallas. La sedimentología y fauna asociada proveen una buena evidencia de que algunos géneros, como *Paleoscorpilus* y *Palaephonus*, fueron igualmente marinos (Briggs D.E.G. 1987).

Si bien abundantes hoy, los alacranes han quedado restringido en gran medida a zonas tropicales y subtropicales. En México, el estudio sobre los efectos farmacológicos de algunos venenos de alacranes mexicanos se remonta hasta hace 50 años, con los estudios realizados en 1944 por el grupo del Dr. del Pozo. Aún cuando existen reportes desde 1809 por Altamirano, éstos se refieren principalmente a descripciones de sintomatología y efectos fisiológicos presentados por personas picadas por alacranes.

Por otro lado, a partir de 1977 el grupo del Dr. Possani ha publicado una serie de artículos sobre la caracterización bioquímica del veneno de alacranes tanto mexicanos como sudamericanos (Possani L.D. 1983).

Las toxinas que actúan sobre canales de sodio fueron las primeras moléculas con actividad biológica estudiadas a partir del veneno de alacrán (ver rev. por Zlotkin E. y cols. 1978, Rochat H. y cols. 1979). Las toxinas que actúan sobre canales de K^+ fueron estudiadas hasta 1982 cuando Carbone y cols. describieron el efecto de un péptido purificado (Possani L.D. y cols. 1982) del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius*, llamado posteriormente Noxiustoxina (NTX).

B) CLASIFICACION BIOLOGICA DE LOS ALACRANES

Pertenecientes al reino Animal, sub-reino Metazoo, filo Artrópoda, sub-filo Quelicerata, clase Arachnida, orden Scorpionida los alacranes o escorpiones se dividen en 6 familias: Buthidae, Chactidae, Scorpionidae, Diplocentridae, Vejovidae y Bothriuridae (ver Keegan H.L. 1980). De ellas Buthidae, comprende 48 géneros y unas 500 especies y es la más grande y ampliamente distribuida de las familias de escorpiones. Como ejemplos podemos citar los géneros: *Buthus*, *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthotus*, *Centruroides*, *Tityus*, *Parabuthus* y *Mesobuthus*.

De las 28 especies reconocidas del género *Centruroides* existentes en México, siete son consideradas venenosas para el hombre, entre las cuales han sido estudiadas: *Centruroides sculpturatus* Ewing (Babin y cols. 1974, Fontecilla-Camps y cols. 1980, Pete J.M. y cols 1992), *Centruroides suffusus suffusus* (Couraud 1979), *Centruroides elegans* Thorell (Possani L.D. y cols. 1978), *Centruroides limpidus limpidus* (Alagón A.C. and Possani L.D. 1983, Gúzman S.H. 1984, Alagón A.C. y cols. 1988, Balderas C.A. 1988.), *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann (Possani L.D. 1980, Ramírez A.N. y cols. 1988, Martín B.M. y cols. 1988) y *Centruroides noxius* Hoffmann (Possani L.D. y cols.1981, Carbone E. y cols.1982, Sitges M. y cols. 1986).

C) COMPOSICION DEL VENENO DE ALACRAN

El veneno de los alacranes se compone principalmente de proteínas y péptidos de diferentes pesos moleculares, aminoácidos libres, sales inorgánicas, nucleótidos y lípidos. El veneno de los alacranes venenosos para el hombre prácticamente carece de enzimas del tipo proteasas y fosfolipasas, fosfodiesterasa o con actividad fibrinolítica, pero posee una cantidad considerable de actividad hialuronidásica (por ejemplo el veneno del alacrán *Tityus serrulatus* Lutz y Melo) (Possani L.D. y cols. 1977, Alagón A.C. y Possani L.D. 1983). Asimismo contiene toxinas con distintas actividades biológicas entre las que se encuentran las neurotoxinas; el término neurotoxina se refiere a aquellas proteínas o polipéptidos que interactúan con el sistema nervioso (Babin D. y cols. 1974). También están presentes toxinas que reconocen solamente a tejidos excitables de insectos o crustáceos. Los componentes del veneno han sido sujetos a una extensa investigación por dos razones

principales: Primero, independientemente de su origen, los venenos constituyen exquisitas herramientas para investigar sistemas fisiológicos. Segundo, la elucidación del principio tóxico presente en los venenos puede ser de gran ayuda en el desarrollo de medios específicos para proteger al hombre contra mordidas y piquetes de animales ponzoñosos (Ménez A. y cols.1992).

El estudio bioquímico sistemático de los diferentes componentes del veneno de alacrán puede llevar a descubrir diferencias funcionales y estructurales importantes entre péptidos homólogos, como es el caso de la noxiustoxina NTX, uno de los componentes minoritarios (cerca del 1%) del veneno de *C. noxius* y péptidos semejantes.

En forma muy general las toxinas de alacrán son moléculas muy compactas y termoestables. Se pueden hervir durante 5 minutos y la estructura vuelve a replegarse tridimensionalmente conservando su toxicidad (Possani L.D. y cols. 1981b). De la misma manera conservan sus propiedades bajo condiciones extremas de pH y a tratamientos drásticos con urea (a concentraciones de hasta 9.5 M) (Habersetzer C. and Sampieri 1976).

D) CLASIFICACION DE LAS TOXINAS

Los venenos de alacrán contienen una variedad de toxinas que actúan de muy diversas maneras a nivel molecular sobre canales iónicos y con una marcada diferencia en la especificidad. Se han realizado diversos intentos para agrupar a las toxinas dentro de familias de acuerdo a sus propiedades toxicológicas, relacionando sus secuencias y composición de aminoácidos, alineamiento óptimo, etc. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado una clasificación general que englobe a todas las toxinas basándose en las características antes mencionadas, así como en sus características inmunológicas y evolutivas (Dufton M. y cols. 1984, Tyson H. 1992).

En base a su estructura primaria las toxinas de alacrán pueden dividirse dentro de tres categorías principales: Toxinas de cadena larga constituidas de 61-70 residuos de aminoácidos estabilizadas por cuatro puentes disulfuro y con alta afinidad por canales de sodio en mamíferos; toxinas de cadena corta, las cuales son proteínas de 36-39 residuos estabilizados por tres puentes disulfuros que actúan sobre canales de potasio en mamíferos y aquellas específicas a insectos constituidas de 60-74 residuos, estabilizadas por 2 a 4 puentes disulfuro (Zlotkin E. y cols. 1978, Possani L.D. 1983 y Possani L.D. 1984).

E) ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS

El número, naturaleza química y orden de la secuencia de aminoácidos en una cadena proteica determinan la estructura distintiva y las características químicas de comportamiento de cada proteína. Por esta razón, una apreciación de las propiedades químicas de los aminoácidos es pre-requisito para el entendimiento de las posibles estructuras tridimensionales de las proteínas y del posible papel biológico o función que desempeñan.

La conformación nativa de las proteínas es determinada por interacciones entre un polipéptido y su microambiente acuoso, en el cual el polipéptido adquiere una estructura tridimensional muy compleja.

Existen cuatro niveles de estructura que influyen en la conformación funcional biológica de las proteínas. Tres de éstos niveles estructurales (estructura primaria, secundaria y terciaria) pueden existir en moléculas compuestas por un simple cadena polipeptídica, sin embargo la estructura cuaternaria involucra interacciones de polipéptidos dentro de una molécula proteica multi-cadena.

Las toxinas a mamíferos que constituyen el primer y mayor grupo de toxinas de alacrán son muy similares entre sí (esto es entre toxinas que actúan sobre un mismo tipo de molécula blanco) en la estructura primaria, longitud de cadena, rearreglo y estabilización de la estructura tridimensional, la cual de alguna manera garantiza el reconocimiento de un sitio especial de unión en membranas excitables de mamíferos; sin embargo, modificaciones, sustituciones, deleciones o inserciones de nuevos aminoácidos en la correspondiente estructura primaria pueden producir inactivación de la toxina o al menos diferentes tipos de modulación de la función de estas toxinas a nivel molecular.

Asimismo, es importante enfatizar las grandes diferencias estructurales entre toxinas bloqueadoras de canales de potasio y los péptidos bloqueadores de canales de sodio. Las secuencias de aminoácidos no son comparables y el mecanismo molecular de acción es diferente. Aquí una diferencia en la estructura resulta en una diferencia en la función.

Las proteínas tóxicas de origen animal son económicamente bien adaptadas en términos de arquitectura y funcionalidad.

Las estructuras secundaria y terciaria de toxinas de alacrán han sido estudiadas por varias técnicas. Difracción de rayos X es el método por excelencia para determinar los detalles de las

estructuras tridimensionales de proteínas globulares y otros biopolímeros. Esta técnica tiene una fundamental limitación y es que puede ser empleada solamente cuando la molécula está cristalizada, y esto, la mayoría de las veces no es posible. Dentro de los métodos espectroscópicos tenemos: Espectroscopia de Absorción, Dicroísmo Circular el cual emplea luz polarizada, Resonancia Magnética Nuclear (NMR), Dispersión óptica Rotatoria. La combinación de algunas de estas técnicas ha permitido la determinación de algunas estructuras de toxinas de alacrán (Fontecilla-Camps y cols 1980, Bontems F. y cols. 1991, Johnson B.A. y Sugg E.E. 1992, Zhao B. y cols. 1992)

El mayor problema a resolver en biología molecular estructural es la manera de predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de la secuencia de aminoácidos. Uno de los caminos para simplificar este complejo problema es clasificando las proteínas por su forma y dominios estructurales, y llevando un modelo de construcción de la proteína basada en estas formas empleando métodos de minimización de energía para obtener una estructura terciaria predicha. En este caso la conformación de la proteína puede ser reducida a identificar características de dominios y subdominios estructurales. Las estructuras tridimensionales de las proteínas son más conservadas en la evolución que la estructura primaria (Narayanan P. y Lata K. 1992).

Las proteínas con secuencias de aminoácidos homólogos tienen estructuras tridimensionales similares. Usualmente tienen funciones similares, aunque existen excepciones. El contar con la información de la estructura tridimensional de una proteína que comparta regiones conservadas a nivel de estructura primaria con alguna proteína problema, facilita la obtención de la imagen tridimensional de la proteína en cuestión utilizando los parámetros energéticos de la proteína homóloga.

F) MECANISMOS DE ACCION

Las toxinas de alacrán dirigidas contra animales ejercen una amplia diversidad de acciones, incluyendo bloqueo del sistema nervioso central y periférico, alteración de varios tipos de músculos y perturbación en la coagulación de la sangre (Freire-Maia y Campos J.A. 1989). Por otra parte, cada una de éstas acciones generales puede ser realizada al interactuar con una variedad de moléculas blanco, incluyendo canales iónicos, receptores, enzimas, etc. (Ménez A. y cols., 1992).

a) Efectos del veneno del alacrán a nivel sistémico.

El veneno de alacrán puede actuar :

-Sobre el sistema cardiovascular provocando:

Hipertensión, arritmias cardíacas.

-Sobre el sistema respiratorio provocando:

Arritmias respiratorias, edema pulmonar

-Puede afectar sistema neuromuscular

-Tener efectos en sistema gastrointestinal, induciendo :

Secreción salival, gástrica, pancreática; motilidad Intestinal.

-Tener efectos sobre la sangre:

Interfiriendo en la coagulación, en la conversión de enzimas, produciendo leucocitosis

-Presentar efectos metabólicos:

Hiperglicemia, glicogenólisis.

Además de causar alteraciones en el sistema homeostático del organismo.

b) Acción de las toxinas a nivel molecular sobre canales iónicos

Las toxinas del veneno de alacrán pueden ser valiosas herramientas en el estudio de procesos fisiológicos esenciales controlados por el sistema nervioso. Potentes toxinas altamente puras aisladas de éstos venenos, como las neurotoxinas, pueden ser usadas para investigar cambios moleculares responsables de importantes funciones tales como síntesis, almacenaje y liberación de neurotransmisores . Al parecer los efectos fisico-farmacológicos inducidos por las toxinas de alacrán son debidos a su acción sobre sitios específicos de los diferentes canales iónicos. La arritmia respiratoria es debida, al menos en parte, a depolarización de las fibras aferentes viscerales, sin embargo los otros efectos descritos anteriormente son principalmente debidos a la liberación de neurotransmisores tales como acetilcolina y catecolaminas (Freire-Maia L. y Campos J.A. 1989).

Los primeros reportes sobre la acción de toxinas sobre canales iónicos fué descrita por Koppenhöfer y Schmidt(1968), quienes estudiaron y reportaron el efecto del veneno del alacrán *Androctonus* en el nodo de Ranvier. Estos autores demostraron que el veneno de alacrán contenía componentes capaces de modificar la permeabilidad de sodio y potasio en una preparación nerviosa de *Rana pipiens*. Cahalan (1975) amplió esta observación utilizando veneno del alacrán del Nuevo Mundo *Centruroides sculpturatus*. Pero fué hasta

(1976) que Catterall y Noner (1979) demostraron el efecto de proteínas purificadas del veneno de alacranes en canales de sodio, y más tarde Carbone y colaboradores (1982) en canales de potasio.

G) CANALES IONICOS

Los canales iónicos son elementos excitables en las membranas celulares nerviosas, musculares y de otros tejidos que producen y transducen señales eléctricas en células vivas. El número de clases de canales conocidos se ha incrementado y una sola membrana excitable puede tener de 5 a 10 clases y el genoma puede codificar, posiblemente para más de 50 (Hille B. 1992).

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

Los canales de potasio están presentes virtualmente en todas las células eucariontes desde levaduras hasta mamíferos. En neuronas, los canales de K^+ determinan el potencial de acción, la repolarización de la membrana y el potencial de reposo (Rehm H. 1991). Debido a estas múltiples funciones, se sabe que existe una alta diversidad de clases de canales de K^+ entre los que se encuentran: canales de K^+ dependientes de ATP, canales de K^+ dependientes de Ca^{++} , canales de K^+ activados por Na^+ y canales de K^+ dependientes de voltaje.

Los canales de potasio dependientes de voltaje son además sub-divididos en base a sus características de apertura en:

- a) Canal de K^+ tipo A, el cual se activa e inactiva rápidamente por depolarización de la membrana.
- b) Canal rectificador tardío, el cual se activa lentamente.
- c) Canal de rectificación interna, el cual abre cuando la membrana está hiperpolarizada.

H) TOXINAS QUE ACTUAN SOBRE CANALES DE POTASIO

Numerosas neurotoxinas han sido identificadas y purificadas a partir de diferentes especies de venenos, las cuales alteran selectivamente la operación de ciertos tipos de canales de potasio. Estas toxinas tienden a ser utilizadas como auxiliares en la purificación y caracterización de canales iónicos. Las características comunes de las toxinas que bloquean canales de potasio son, su carga básica, estabilización por puentes disulfuro intramolecular y baja masa molecular.

Entre estas toxinas encontramos a:

-Apamina, es un polipéptido tóxico de 18 aminoácidos con dos puentes disulfuros aislado a partir del veneno de la abeja *Apis mellifera*. Es el único polipéptido neurotóxico que se conoce que atraviesa la barrera hematoencefálica. Mediante análisis electrofisiológicos de voltaje sostenido se ha demostrado que la apamina a bajas concentraciones bloquea específicamente canales de K^+ dependientes de Ca^{++} en células diferenciadas de neuroblastoma (Hugues M. y cols. 1982).

-Caribdotoxina (ChTX), esta toxina es un componente menor del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, la cual bloquea reversiblemente canales de potasio activados por Ca^{++} de alta conductancia (maxi canal) en músculo esquelético, en una reacción bimolecular (Miller C. y cols. 1985). En cerebro de rata existen dos sitios de unión para ChTX, uno de alta y otro de baja afinidad (Schweit y col. 1989). Bloquea canales de potasio presentes en sarcolema aortico de bovino (García-Calvo y cols. 1991). La ChTX tiene una alta concentración de residuos básicos en la porción carboxilo terminal, marcando esta región como un potencial sitio de interacción con el canal de K^+ activado por Ca^{++} (Gimenez-Gallego y cols. 1988). La ChTX es desplazada de receptores en membranas plasmáticas de cerebro de rata por el α -dendrotoxina y la NTX (Vázquez J. y cols 1990).

-Iberitoxina (IbTX) consta de una sola cadena polipeptídica de 4.3 kDa. Es un bloqueador del canal de potasio activado por Ca^{++} de alta conductancia fué aislada del veneno del alacrán *Buthus tamulus*, representa menos del 1% de la proteína presente en el veneno crudo del

alacrán. En ensayos electrofisiológicos la IbTX bloquea de manera reversible el canal de alta conductancia de K^+ activado por Ca^{++} en membranas de músculo liso de aorta de bovino (Galvez A. y cols. 1990). Bloquea el maxi-canal con alta afinidad ocluyendo el lado externo de la boca del poro y la interacción es fuertemente influenciada por interacciones electrostáticas (Giangiacomo K.M. y cols. 1992).

-Kallitoxina (KTX), un péptido bloqueador del canal de potasio de alta conductancia activado por Ca^{++} . Purificado del veneno del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. Es un péptido de cadena sencilla formado de 37 aminoácidos con un peso molecular de 4kDa, el cual presenta una homología estructural con ChTX de un 44% de un 52% con NTX y un 44% con IbTX (Crest M. y cols. 1992).

-Leurotoxina I (Scyllatoxina) es un polipéptido de 31 aminoácidos con un peso molecular de 3.4 kDa aislado del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, representa menos del 0.02% del total de proteínas presentes en el veneno crudo. A pesar de no mostrar similitudes en la secuencia de aminoácidos con la apamina, tiene propiedades fisiológicas y de unión similares a aquellas encontradas para la toxina del veneno de abeja (Chicchi G. y cols 1988, Auguste 1990).

-Margatoxina (MgTX) es un péptido inhibidor de canales de K^+ purificado del veneno del alacrán *Centruroides margaritatus*, su estructura primaria consta de 39 aminoácidos presentando una gran homología en la secuencia con otras toxinas de K^+ . Presenta un 44% de homología con la ChTX, un 41% con IbTX, un 54% con KTX y un 79% con NTX. Es interesante notar que algunos de los residuos cargados que muestran ser importantes en la interacción de ChTX con el maxi-canal de K^+ son conservados en MgTX, en particular *Lys*₂₇ (García-Calvo y cols. 1993).

-Noxiustoxina (NTX) es un péptido de 39 aminoácidos con un peso molecular de 4kDa aislado del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffman (Possani L.D. y cols. 1982). Representa cerca del 1% del total de proteínas presentes en el veneno crudo. La relevancia de la NTX independientemente de su actividad sobre diferentes tipos de canales de K^+ , es de tipo histórico, ya que fué la primera toxina péptidica aislada y

caracterizada con actividad sobre canales de potasio (Carbone E. y cols. 1982, Possani L.D. y cols. 1982).

La NTX bloquea canales de K^+ dependientes de voltaje de manera reversible en preparaciones de axón gigante de calamar (Carbone E. y cols. 1982). Asimismo se ha reportado su efecto sobre canales de K^+ activados por Ca^{++} en músculo esquelético. En estas preparaciones la NTX compite con la ChTX simultáneamente por el mismo canal iónico. Ambas toxinas solamente son efectivas cuando se añaden a la cara externa del canal reincorporado en bicapas planas (Valdivia H. y cols. 1988). Además de competir por el sitio de unión a ChTX en músculo esquelético, la NTX desplaza totalmente la unión de Leiurotoxina III (Valdivia H. y cols. 1992) y compite por el sitio de unión a Dendrotoxina DTX (ver pág. 12)(Harvey A.L. y cols. 1992) en membranas sinaptosomales de cerebro de rata. Los datos obtenidos en experimentos realizados con péptidos sintéticos correspondientes a diferentes fragmentos de la NTX sugieren fuertemente que la porción amino terminal de la toxina es determinante en su efecto tóxico a mamíferos (Gurrola G. y cols. 1989). Complementando estos estudios se hicieron ensayos electrofisiológicos sobre canales de K^+ activados por Ca^{++} de baja conductancia obtenidos a partir de células endoteliales, donde se confirmó, utilizando los mismos péptidos sintéticos, que la región amino terminal de la toxina es esencial en el bloqueo específico de este tipo de canal. El péptido sintético correspondiente a la región C-terminal no presentó ningún efecto (Vaca L. y cols. 1993). La NTX ha sido utilizada en el aislamiento de un canal de K^+ del axón gigante de calamar *Loligo vulgaris*, el cual posteriormente fué reconstituido por la técnica de bicapas planas y mostrada su actividad (Prestipino G. y cols. 1989).

Además de estas toxinas existen otros péptidos mejor conocidos por su actividad de fosfolipasa, que también presentan algún tipo de efecto sobre canales de potasio. Entre estos se pueden mencionar a:

- β -Bungarotoxina (β -BTX) y sus isoformas, las cuales fueron aisladas por Chang y Lee en 1963; son los miembros mejor conocidos de la familia de toxinas neurotóxicas con actividad de fosfolipasa. La β -bungarotoxina es una proteína básica de una masa molecular de 21 kDa y consta de dos subunidades de masa molecular de 14kDa y 7kDa, unidas por un puente disulfuro. La subunidad de 14 kDa es una fosfolipasa del tipo A2 dependiente de Ca^{++} y la

subunidad de 7 kDa, tiene la secuencia de aminoácidos similar a una secuencia conservada en algunos inhibidores de proteasas (Rehm H. 1991). La β -bungarotoxina bloquea canales de K^+ en cuerpos celulares de nervios sensores (Peterson y cols. 1986).

-Crotoxina, notexina y taipoxina. Las fosfolipasas neurotóxicas crotoxina, notexina y taipoxina pueden actuar sobre canales de K^+ dependiente de voltaje; sus efectos en unión neuromuscular son similares a las de la β -BTX (Dreyer P. and Penner R. 1987). Sin embargo, estos canales de K^+ son diferentes de aquellos afectados por β -BTX, ya que la crotoxina, taipoxina y notexina no inhiben la unión de β -BTX.

-Dendrotoxina (DTX). Las dendrotoxinas son una familia de péptidos básicos de una masa molecular de 7kDa aisladas del veneno de las serpientes mamba verde *Dendroaspis angusticeps* y *Dendroaspis polylepis*; estos péptidos pueden modular un tipo de canal de potasio sensible a voltaje en membranas neuronales. La DTX presenta una extensa homología con la cadena de 7 kDa de otra toxina presináptica, la β -bungarotoxina (β -BTX) (Mehrahan F. y cols. 1984, Muñiz Z. y cols. 1990). El veneno de la especie *Dendroaspis* contiene una variedad de isoformas de dendrotoxina entre las que se encuentran la α , β , γ y δ dendrotoxina (en el veneno de *D.angusticeps*). La dendrotoxina I (*D. polylepis*) actúa sobre el canal de K^+ activado por calcio (maxi canal) en músculo esquelético de rata (Lucchesi K. and Maczydlowski E. 1990).

2. CARACTERIZACION QUIMICA DE PROTEINAS

A) ANALISIS DE AMINOACIDOS

Una vez obtenida una proteína en estado puro se procede al análisis de la composición de aminoácidos. Este estudio permite calcular el peso molecular mínimo de la proteína, la composición molar de cada aminoácido en la proteína y establecer una estrategia adecuada para la obtención de la secuencia completa de aminoácidos.

Al hidrolizar una proteína bajo un calentamiento en HCl 6N al vacío a 110 °C (condiciones comúnmente empleadas), las cantidades de serina, treonina, valina, isoleucina, metionina, tirosina, triptofano, cisteína presentes en el hidrolizado pueden diferir de la cantidad real en la proteína antes de hidrolizar. Los aminoácidos asparagina son desamidados y se transforman en ácido aspártico, mientras que glutamina es desamidada a glutámico. Las diferencias son pequeñas para algunos de estos aminoácidos, pero grandes para algunos otros. Afortunadamente, se pueden corregir muchos problemas si una muestra control es hidrolizada bajo las mismas condiciones que la muestra experimental.

El método más preciso para el análisis de serina, treonina y tirosina en proteínas es hidrolizar la proteína a diferentes tiempos (por ejemplo 24, 48 y 72 hrs.) y extrapolar los valores al tiempo 0 (Glazer A.N. y cols 1975), mientras que para los aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica larga como isoleucina, leucina y valina son extrapolados a tiempos prolongados. Las cisteínas son oxidadas con ácido performico y analizadas como ácido cisteico, mientras que el triptofano es analizado después de una hidrólisis alcalina (Moore 1964).

Durante la hidrólisis ácida de proteínas la isoleucina es liberada más lentamente que otros aminoácidos debido al impedimento estérico presentado por su cadena lateral. Los enlaces Ile-Ile son particularmente resistentes a hidrólisis y su rompimiento es cercano al 50% en 24h a 110°C. Los valores de ácido aspártico y asparagina, ácido glutámico y glutamina son reportados de manera conjunta ya que es imposible por este método diferenciar uno de otro.

B) SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Cuando se estudia la función de una proteína y su relación estructura-función, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos es esencial. El conocimiento de la estructura

de las proteínas ha sido indispensable para un entendimiento en términos moleculares de muchos procesos fisiológicos. La mayoría de las determinaciones de secuencias de aminoácidos en proteínas en el presente utilizan la degradación con fenilisotiocianato del método de Edman, en el cual los residuos de aminoácidos son rotos uno a la vez del extremo amino terminal de la proteína o de los fragmentos de péptidos (Edman 1970). Los aminoácidos liberados son identificados como feniltiohidantoinatos o derivados liberados. Las secuencias completas de pequeños polipéptidos pueden ser determinadas por degradación secuencial partiendo del extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal. Para polipéptidos de cadena larga se requiere el rompimiento en sitios específicos, la separación de los péptidos resultantes y la determinación de la secuencia de cada péptido. Con polipéptidos muy grandes, este método de rompimiento produce mezclas complejas de péptidos y el aislamiento de todos estos puede presentar considerables dificultades. Los fragmentos largos resultantes son separados unos de otros y sus secuencias determinadas. Después de la subfragmentación en pequeños péptidos, los fragmentos son alineados con la ayuda de solapamiento de péptidos de diferentes digestiones de la proteína. La experiencia revela que para evitar errores es preferible determinar cada parte de una secuencia de aminoácidos más de una vez, asegurarse que la secuencia total deducida sea consistente con la estructura primaria de alguna otra proteína con actividad semejante o al menos con la composición de aminoácidos de éste péptido (Allen G. 1983).

En resumen los pasos requeridos para la determinación de la secuencia completa de aminoácidos son:

- Análisis de aminoácidos .
- Rompimiento específico de la cadena polipéptidica por al menos dos diferentes métodos.
- Aislamiento de péptidos de mezclas resultantes del rompimiento usando métodos de detección disponibles.
- Deducción de la secuencia de los fragmentos peptídicos obtenidos en las hidrólisis y digestiones.

La proteína debe de estar por lo menos en un 95% pura en base a peso. La cantidad de proteína requerida para la completa determinación de la secuencia depende de muchos factores. El tamaño de la molécula es el principal factor, así como la disponibilidad de un analizador de aminoácidos de alta sensibilidad y para mayor rapidez, un microsecuenciador automático de péptidos.

II.- ANTECEDENTES

La caracterización tanto bioquímica como funcional de los componentes proteicos del veneno del alacrán *Centruroides noxius* ha arrojado datos muy importantes en el estudio de la diversidad biológica de las toxinas y también ha contribuido al estudio del mecanismo molecular de los canales iónicos.

Dentro de este grupo de toxinas específicas para canales de potasio se encuentra la noxiustoxina (NTX) descrita en la sección I.1.H de esta tesis.

La presencia de péptidos semejantes a la NTX dentro del veneno de *C.noxius* fué descrita inicialmente durante el trabajo de caracterización de la NTX (Possani L.D. y cols., 1982), de donde se logro obtener la secuencia N-terminal de un péptido llamado II-10-2 el cual mostró gran homología con la noxiustoxina. Posteriormente con la ayuda de CLAP durante la purificación rutinaria de NTX en el laboratorio del Dr. Possani, la M. en C. Georgina Gurrola logró aislar y obtener la secuencia N-terminal de otros dos péptidos homólogos a NTX (datos no publicados). Estos péptidos homólogos han sido detectados aún en venenos de otras especies como es el caso de *Centruroides limpidus limpidus* (Fernández J.A. 1992, Martín B.M. y cols. 1992 datos no publicados).

La presencia de una familia de péptidos con actividad sobre diferentes tipos de canales de potasio no es exclusiva del género *Centruroides*. En el veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus* se halla presente una familia de siete péptidos que tienen actividad sobre diferentes tipos de canales de potasio; de igual forma cinco de los componentes aislados del veneno del alacrán *Tityus serrulatus* (Ts) bloquean canales de K⁺ (Blaustein M. y cols. 1991). Asimismo, anteriormente se había descrito el aislamiento de tres péptidos presentes en el veneno de la serpiente *Dendroaspis angusticeps*, que muestran una gran homología con la secuencia de aminoácidos de la toxina bloqueadora de canales de potasio del mismo veneno α -dendrotoxina (DTX) (Muñiz Z. y cols. 1990).

III.- OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio fué el aislamiento y caracterización de péptidos semejantes a la Noxiustoxina del veneno del alacrán *Centruroides noxius*.

Para lograr tal objetivo se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Aislamiento de los componentes proteicos del veneno total del alacrán *Centruroides noxius* que presentaron reacción cruzada en inmunoensayos con la noxiustoxina (NTX).
- De los péptidos aislados, se determinó su composición química y secuencia de aminoácidos.
- Se realizaron pruebas del efecto del péptido NTX-2 sobre la unión al receptor a NTX en membranas de cerebro de rata (P 3).
- Se realizaron ensayos de toxicidad sobre diferentes especies de animales.

IV.-MATERIAL Y METODOS

1) MATERIALES

Los ratones empleados en los bioensayos, fueron de la cepa BALB-c, machos de aproximadamente 20 gr. de peso. Las ratas utilizadas en la obtención de membranas cerebrales fueron ratas albinas de aproximadamente 400 gr de peso.

Todos los compuestos empleados en la CLAP fueron de grado reactivo, de la compañía Pierce. Los reactivos empleados en la preparación de soluciones amortiguadoras fueron de la marca J.Baker.

2) PURIFICACION DE PEPTIDOS SEMEJANTES A LA NTX

A) Obtención del veneno

Los alacranes colectados en el estado de Nayarit (México), fueron anestasiados con CO₂ y el veneno obtenido por estimulación eléctrica de los telsons. El veneno fué recuperado en agua bidestilada centrifugado por 10 min. en un centrifuga Beckman J2-21 equipada con un rotor JA20 operada a 15000 rpm. El sobrenadante fué juntado, liofilizado y guardado a -20°C.

B) Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína durante todos los ensayos realizados en este trabajo se basó en la medición de la absorción de la luz UV por la solución proteica a una longitud de 280 nm, a través de una celdilla de cuarzo de 1 cm de camino óptico en un espectrofotómetro Beckman, asumiendo que 1 unidad de absorbancia es igual a 1 mg/ml de proteína. Muchas proteínas exhiben un máximo de absorción a 280 nm, lo cual es atribuible a los grupos fenólicos de tirosina e indólico de triptofano.

C) Métodos cromatográficos de purificación

Filtración molecular

En la primera etapa de purificación, se utilizó una columna (3x200 cm) de Sephadex G-50 medio, Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia). Empacada por gravedad y corrida a

presión constante. La muestra aplicada fué disuelta y eluída en una solución amortiguadora de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7.

Intercambio Iónico

a) En el siguiente paso cromatográfico se utilizó una columna (0.9x30 cm) que emplea carboximetil celulosa (CMC-32) de Wathman (Clifton, NJ, USA) como soporte. Equilibrada con una solución de acetato de amonio 20mM, pH 4.7, eluyendo con un gradiente salino de NaCl de 0 a 0.5 M en un volumen total de 500ml. Para lograr la formación de un gradiente continuo se emplearon unos vasos comunicantes. Se mantuvo la presión constante empleando una bomba peristáltica del tipo Milton Roy. Al término del gradiente salino, se hizo pasar una solución de NaCl 1M para despegar cualquier proteína que permaneciera adsorbida a la resina de la columna.

b) Se utilizó una segunda columna cromatográfica de intercambio iónico empleando el mismo tipo de resina. En esta ocasión la muestra previa diálisis fué aplicada y eluída con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM pH 6.0, eluyendo con un gradiente salino de 0 a 0.38 M de NaCl en la misma solución amortiguadora.

Cromatografía líquida de alta presión (CLAP)

Como siguiente paso cromatográfico, los péptidos seleccionados por ELISA, fueron pasados a través de cromatografía líquida de alta presión (CLAP) en un cromatógrafo Beckman en el cual se utilizaron columnas semipreparativas y/o preparativas de fase reversa C₄ y C₁₈ (Vydac de 250 x 15 mm).

Las soluciones empleadas como fase móvil fueron:

Solución A : Agua con 0.12% de ác. trifluoroacético (TFA)

Solución B : Acetonitrilo con 0.1% de TFA.

La elución de los componentes se realizó bajo un gradiente lineal de 0 a 60% de B en 60 minutos con una velocidad de flujo de 2 ml/min. La longitud de onda utilizada en el detector fué de 230 nm.

Algunos péptidos eluídos por CLAP no se obtuvieron de forma homogénea, por lo que fué necesario recomatografiarlos por CLAP a concentración constante de soluciones eluyentes (elución isocrática).

3) ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO (ELISA)

La búsqueda de los péptidos semejantes a NTX a través de los pasos de purificación se realizó mediante el empleo de anticuerpos policlonales y monoclonales levantados contra NTX en un ensayo inmuno enzimático (ELISA). En el laboratorio contamos con seis anticuerpos monoclonales que reconocen a la NTX. Estos anticuerpos fueron preparados por Rafael Saavedra, Georgina Gurrola, Fernando Zamudio y Pascal Heri6n en el laboratorio del Dr. Possani, y fueron denominados BNTX 4, BNTX 12, BNTX 14, BNTX 16, BNTX 18 y BNTX 21 (Trabajo no publicado). Así mismo, se obtuvieron los anticuerpos policlonales inyectando ratones por vía intraperitoneal con NTX.

Los anticuerpos monoclonales utilizados durante el seguimiento de la purificación de los péptidos semejantes a NTX reconocen epítopes muy cercanos o solapados ya que estos no pueden unirse simultáneamente a la toxina presumiblemente por impedimento estérico, de acuerdo a los datos obtenidos en ensayos inmuno enzimáticos (ELISA) de competencia. Sin embargo, utilizando péptidos sintéticos correspondientes a diferentes regiones de la estructura primaria de la NTX, se ha podido demostrar que los Ac monoclonales tienen distintos epítopes específicos. Así se pudo localizar el (los) epítopo(s) para los Ac monoclonales BNTX-18 y 21 en la región 11-31 de la toxina. Los resultados obtenidos en estos experimentos sugieren que la unión de los Ac monoclonales a la toxina es altamente dependiente de la conformación de la molécula. Todos estos datos fueron obtenidos durante la caracterización de la especificidad de los Ac monoclonales en el laboratorio del Dr. Possani por parte de Georgina Gurrola y colaboradores (datos no publicados).

El procedimiento general utilizado en este ensayo fué el siguiente:

- En una placa de polivinilo de 96 pozos (COSTAR, Broadway Cambridge, USA) se pusieron a incubar toda la noche a 4°C los péptidos problema (100 µl a una concentración de 1 µg/ml en una solución de carbonato de sodio 20 mM pH 9.4).
- Se lavó 5 veces con la solución de lavado (solución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM, 0.15 M NaCl pH 7.4 (PBS), 0.05 % de Tween 20 y 0.01% mertiolato). Este procedimiento fué repetido después de cada paso de incubación.
- Después de bloquear los sitios de unión inespecífica con albumina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS (4 h a temperatura ambiente), se colocó el primer anticuerpo(Ac) (policlonal o monoclonal según las necesidades) de ratón anti-NTX diluido en una solución de PBS

20mM, BSA al 1% y 0.1% de Tween 20 a una concentración de 3 µg/ml agregando 100 µl por pozo e incubando 2 h a 37°C.

- La unión específica de este Ac fué revelada utilizando un segundo Ac policlonal de conejo anti IgG de ratón, el cual lleva acoplado una enzima peroxidasa. Diluido en una proporción 1:3000 (v/v) con la misma solución con que fué diluido el primer Ac, el segundo Ac fué incubado por 2 h a 37 °C. El sustrato cromógeno utilizado fué Ortopenildiamina (OPD) (0.4 mg/ml) y H₂O₂ al 30% (0.4 µl/ml), diluidos en una solución de fosfato de sodio 100mM pH 5.0. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con HCl 6N (50µl).

- Por último se obtuvo la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un lector de ELISA BIORAD Mod. 2250 EIA Reader, USA. Estos ensayos fueron realizados por triplicado en dos diferentes experimentos con sus respectivos controles.

4) ANALISIS DE AMINOACIDOS

Aproximadamente 4µg (1 nmol) del péptido liofilizado NTX-2 fueron hidrolizados con vapores ácidos, al calentar a 110°C (por 24 y 48 h) 1 ml de HCl 6N en una cámara de reacción libre de O₂. Para lograr una atmósfera libre de O₂, se hizo pasar N₂ por la cámara de reacción. Una gota de fenol al 5% fué añadida a cada muestra con el fin de proteger a algunos grupos lábiles durante la hidrólisis ácida. Después de la hidrólisis las muestras fueron enfriadas y el ácido fué removido por evaporación en un concentrador Savant.

Posteriormente la muestra fué puesta en el analizador de aminoácidos System 6300E High Performance Analyzer Beckman USA.

La cantidad de cada aminoácido fué determinada por integración del área bajo la curva, teniendo como referencia una muestra estándar.

5) SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Para obtener la secuencia de aminoácidos de éstos péptidos se siguieron dos estrategias:

- Tentativa de conseguir la secuencia completa a partir de la porción amino terminal del péptido completo.
- Generación de fragmentos péptidicos mediante el empleo de digestiones enzimáticas o

hidrólisis química, y secuenciando cada fragmento.

La proteína y los fragmentos generados fueron secuenciados en un aparato ProSequencer, modelo 6400/6600 Milligen/Biosearch,(USA). Este aparato realiza automáticamente la reacción de Edman, que consiste en el pegado covalente del feniltiotiocianato a aminas libres del péptido a secuenciar. En condiciones ácido-acuosas se libera el aminoácido del extremo amino-terminal, por ruptura del enlace peptídico. El aminoácido liberado está en forma de un derivado tioazolnona-aminoácido que en presencia de TFA se convierte a feniltiohidantoina-aminoácido (PTH-aminoácido). El PTH-aminoácido es separado por el cromatógrafo CLAP acoplado al ProSequencer. Este proceso se repite en forma secuencial y automática. Permitiendo de esta forma determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos en cuestión.

A) Reducción y alquilación de toxinas

En ambas opciones fué necesario reducir y carboximetilar la muestra, bajo el siguiente protocolo:

La proteína liofilizada se resuspendió en 100 µl de amortiguador Tris-HCl 200 mM(EDTA 1mg/ml) en cloruro de guanidina 6M, ajustando a un pH de 8.6 con HCl. La reducción se llevó a cabo con dithiotreitol (DTT) (0.5 mg DTT/ mg proteína), burbujando N₂ para eliminar el O₂; se dejó incubando a 55°C por 45 minutos. Se agregó ác. iodo-acético (un exceso de 100 veces la cantidad de residuos de cisteína) y se dejó incubando por 30 minutos. La proteína alquilada se purificó de la mezcla de reacción a través de una columna (30 x 0.2 cm) de Biogel P-30 (Bio-Rad Laboratories, Richmond Cal.,USA) eluyendo con ác. acético al 20% en agua. La muestra fué secada en un concentrador al vacío (Savant), quedando lista para continuar su caracterización.

B) Digestion e hidrólisis

- Hidrólisis con bromuro de cianógeno

Cerca de 30 µg del péptido NTX-2 reducido y alquilado fué disuelto en ác. fórmico al 70% y bromuro de cianógeno 1mg/ml. Se incubó por 2 h protegido de la luz a temperatura ambiente . Posteriormente se evaporó el BrCN con flujo gaseoso de nitrógeno (N₂).

-Digestión tríplica.

Aproximadamente 30 µg de muestra fueron disueltos en 500 µl de bicarbonato de amonio 100mM pH 7.8. Se agregó tripsina grado reactivo (Boehringer Mannheim, Germany) diluida en HCl 0.1M a una concentración de 5 µg/100 µg de muestra, incubándose por espacio de 4 h a 37°C. Después de purificar los diferentes fragmentos obtenidos en la hidrólisis y digestión por CLAP se pasaron a secuencia.

6) ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE LA UNIÓN DE [¹²⁵I]NTX A P 3 POR LA NTX-2

A) Iodación de NTX y NTX-2

Los péptidos NTX y NTX-2 fueron marcados radioactivamente con [¹²⁵I] (2,100 Ci/mmol; ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA), por el método de lactoperoxidasa de Morrison M. y Baysen G.S. (1970). Aproximadamente 30 µg de cada péptido fueron disueltos (150 µl de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1M pH 7.4) y puesto a reaccionar con 0.25 U.I. de lactoperoxidasa (Sigma, 5mg/ml, 385 u/ml) y 1mCi de [¹²⁵I]Na.

Se hicieron adiciones continuas de 3 µl de H₂O₂ 5mM y lactoperoxidasa a los tiempos 0, 5, y 10 minutos de reacción a temperatura ambiente parando la reacción a los 15 minutos.

Los péptidos marcados fueron separados del [¹²⁵I] libre por medio de una columna (0.5 x 8 cm) de Sephadex G-15 equilibrada con la misma solución amortiguadora. La radioactividad específica fué determinada contando pequeñas alícuotas (5 µl) de cada una de las muestras preparadas en el contador gamma LKB wallac 1275.

B) Preparación de membranas de cerebro de rata (P 3).

La preparación de membranas de cerebro de ratas, conocida como fracción P 3 (mezcla de mitocondrias, sinaptosomas y restos de membranas) fué realizada de acuerdo a la técnica descrita por Catterall W. A. y cols 1979, con ligeras modificaciones.

Los cerebros de 6 ratas albinas fueron removidos y homogenizados en una solución amortiguadora fría de Tris-HCl 5mM, pH 7.4 conteniendo 0.32M de sacarosa e inhibidores de proteasas (0.1mM iodoacético, 1mM 1-10 fenantrolina, 1nM pepstatina A y 1 µM leupeptina). El homogenizado resultante fué centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. El sobrenadante fué guardado y el sedimento fué resuspendido en 10 ml de la misma solución

0.32M Tris-HCl y sedimentado a 1000 x g por 10 minutos. Los dos sobrenadantes fueron mezclados y centrifugados a 17,000 x g por 60 min. El sobrenadante fué descartado y el sedimento resuspendido en un volumen final de 10 ml en la misma solución amortiguadora. Se hicieron alicuotas de 500µl y se congelaron a -70°C hasta su uso.

C) Curvas de desplazamiento

Para el análisis del efecto inhibitorio de la unión de [¹²⁵I]NTX a su receptor por parte de la NTX-2 fué preparada una curva empleando concentraciones de NTX-2 que fueron desde 1.0 nM hasta 10 µM y para NTX fué de 10 pM a 10 nM, utilizando concentraciones de 50 y 100 pM de [¹²⁵I]NTX para ser desplazada. Las diluciones de estas toxinas fueron hechas en una solución amortiguadora de Tris-HCl 20mM, pH 7.4 con 50 mM de NaCl y 0.1% de BSA.

Durante la preparación de las mezclas de reacción se mantuvo la temperatura a 4°C en un baño de hielo, esto fué necesario, ya que la cinética de estos experimentos es dependiente de temperatura.

En tubos de poliestireno se colocaron 5 µl de P 3 (85 µg de proteína), [¹²⁵I]NTX (50 - 100pM) y NTX-2 en el rango de concentraciones antes mencionado; para obtener un volumen final de 500 µl se aforo con la solución amortiguadora antes descrita. El tiempo de incubación fué de 45 minutos a temperatura ambiente. Las membranas fueron colectadas inmediatamente, después del término del período de incubación en filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C , previamente tratados con polietilenimina al 5 %) y lavados (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, con 100mM de NaCl) en un sistema de filtración al vacío Brandel Gaithersburg, USA. Por último se cuantificó la cantidad de radioactividad en cada muestra en un contador gamma LKB Wallac 1275 .

7) BIOENSAYOS

Se probó la toxicidad del péptido NTX-2 sobre mamíferos (ratones), inyectando dos concentraciones (100 y 200 µg) por vía intraperitoneal. Además se ensayó sobre crustáceos (acocfles) e insectos (grillos) inyectando 30µg de péptido en el tercer segmento de la parte dorsal del animal.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION

A.- PURIFICACION DE PEPTIDOS SEMEJANTES A LA NTX.

La purificación es el paso inicial en el estudio de actividad, estructura o relación estructura-función de una proteína. Durante los pasos de purificación cierta cantidad de proteína es pérdida, por lo cual es recomendable minimizar el número de pasos a usar. Sin embargo, el minimizar el número de pasos, muchas veces va en detrimento de la pureza de la proteína. Para separar moléculas de una mezcla, la bioquímica aprovecha diferencias entre ellas que pueden ser explotadas. Tales diferencias pueden ser en tamaño, masa, carga eléctrica o afinidad por otras moléculas.

Considerando la limitada cantidad de veneno que un escorpión puede inyectar y el dramático cuadro clínico que puede resultar de un simple piquete, es obvio que el veneno del alacrán debe contener componentes altamente activos cuya purificación se hace necesario cuando se desea determinar su estructura y elucidar su modo de acción.

La purificación de los polipéptidos tóxicos que constituyen el veneno de los alacranes implica una cierta dificultad. Esto se debe a la presencia de ciertas moléculas con peso molecular muy semejante y con propiedades fisicoquímicas muy parecidas.

La presentación de los resultados se hará de acuerdo a las tres estrategias empleadas durante el desarrollo del trabajo de purificación.

PRIMERA ESTRATEGIA

La primera estrategia a seguir fué la de purificar los péptidos análogos a NTX en base al reconocimiento por anticuerpos empleando los procedimientos tradicionales de purificación a través de cromatografía en columnas de filtración molecular, intercambio iónico y subsecuentes separaciones por cromatografía líquida de alta presión (CLAP).

El trabajo de purificación se inició con 390 mg de veneno total soluble el cual se aplicó a través de una columna de Sephadex G-50 medio en un amortiguador de acetato de amonio 20mM pH 4.7, dando un patrón cromatográfico característico para el veneno de *C. noxius* (Figura 1). Esta cromatografía se repitió varias veces con resultados muy semejantes.

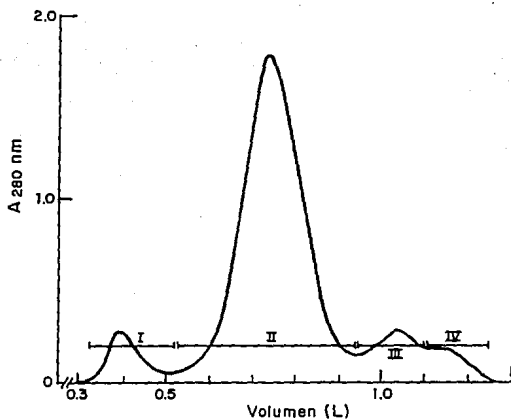


Figura 1. Filtración en Sephadex G-50 medio del veneno total de *C. noxius*.

En una columna (3 x 200 cm) de Sephadex G-50 medio equilibrada con un amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 se aplicaron 6 ml de veneno soluble de *C. noxius* (390 mg). La velocidad de flujo fué de 58 ml/h y las fracciones colectadas de 5.8 ml cada una. Las líneas horizontales indican los cortes que se hicieron. La eficiencia de recuperación fué del 85%. De la cantidad de muestra recuperada correspondió el 6.9% a la FI, 75.5% a la FII, 11.5% a la FIII y 6.0% a la FIV.

La fracción I contiene componentes de alto peso molecular (hialuronidasa entre otros) y la fracción III contiene péptidos de bajo peso molecular y otros derivados aminados libres, la composición de la fracción IV no ha sido determinada.

La fracción II corresponde a componentes de 3 a 15 kDa de peso molecular. En la fracción II se encuentran los péptidos que presentan efectos tóxicos sobre mamíferos, las fracciones I y III no son tóxicas en ratones a concentraciones de aproximadamente 120 µg/20 g de peso (Possani L.D. y cols. 1981).

La F II fué recromatografiada a través de una columna de intercambio iónico. Se procesó un total de 250 mg de FII en cuatro diferentes aplicaciones en una columna de carboximetil celulosa (CMC-32) equilibrada con una solución amortiguadora de acetato de amonio 20mM pH 4.7, eluyendo con un gradiente salino de 0 a 0.5 M de NaCl. Al término del gradiente se hizo pasar una solución 1M de NaCl en el mismo amortiguador para despegar posibles componentes que pudieran permanecer adheridos a la resina. Bajo estas condiciones, se obtuvieron 14 fracciones (Figura 2), entre las que se encuentra la F 11 a partir de la cual se purifica la NTX. Por ésta razón decidimos hacer la búsqueda de los péptidos homólogos a NTX en las fracciones vecinas. Tomando en consideración el reconocimiento obtenido por ELISA con el anticuerpo monoclonal BNTX-16 que se utilizó para identificar los péptidos semejantes a NTX en este patrón cromatográfico, las fracciones se dividieron en dos porciones que se trabajaron por separado: la FII 11a (que incluye únicamente a la fracción 11) y la FII 11b (en la cual se agruparon las fracciones 12, 13 y 14). Estas fracciones obtenidas a partir de 4 aplicaciones de la F II, se mezclaron de manera homogénea y se recromatografiaron.

Ambas fracciones fueron aplicadas por separado a través de una columna de intercambio iónico CMC-32 en solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM, pH 6.0 eluyendo con un gradiente de 0 a 0.38 M de NaCl. Los perfiles cromatográficos se presentan en la Figura 3a y 3b. Las fracciones obtenidas en el patrón cromatográfico de ambas fracciones, 11a y 11b, fueron discriminadas en un ELISA por reactividad cruzada con el anticuerpo monoclonal BNTX-16. Posteriormente las fracciones que dieron resultados positivos con el anticuerpo BNTX-16 (12 en total, 7 de la FII 11a y 5 de la FII 11b) fueron analizadas con el resto de los anticuerpos monoclonales y de acuerdo al porcentaje de reconocimiento obtenido con cada uno de los anticuerpos se juntaron en 4 diferentes grupos (datos no mostrados). Estos 4 grupos fueron separados por CLAP en un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo en 60

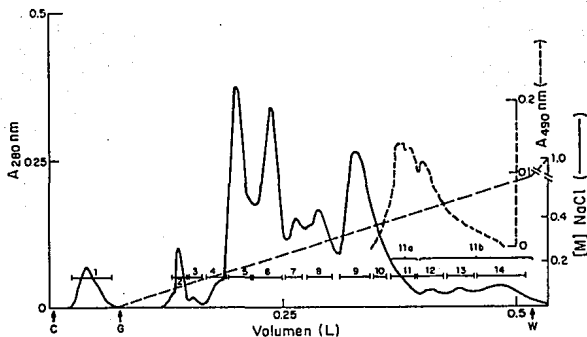


Figura 2. Cromatografía en CMC-32 de la FII.

En una columna (0.9 x 32 cm) de carboximetil celulosa equilibrada con un amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 y eluído bajo un gradiente salino de 0 a 0.5 M de NaCl. Se procesaron 250 mg de FII en 4 diferentes experimentos, aplicando en cada uno aproximadamente 70 mg de muestra diluída en 3 ml de la misma solución amortiguadora, con un flujo de operación de 33 ml/h, colectando volúmenes individuales de 2.5 ml. Se obtuvieron 14 fracciones las cuales se indican con líneas horizontales. De la misma manera se muestra el patrón de reconocimiento obtenido por el anticuerpo monoclonal BNTX-16 (línea punteada) en un ensayo de ELISA (Para mayores detalles ver Material y métodos). De acuerdo al patrón cromatográfico e identificación con el anticuerpo monoclonal se hicieron los cortes mostrados por los corchetes horizontales en F 11a (F 11) y F 11b (F 12,13 y 14). C es el cargado, G inicio del gradiente y W lavado de la columna con 1M de NaCl.

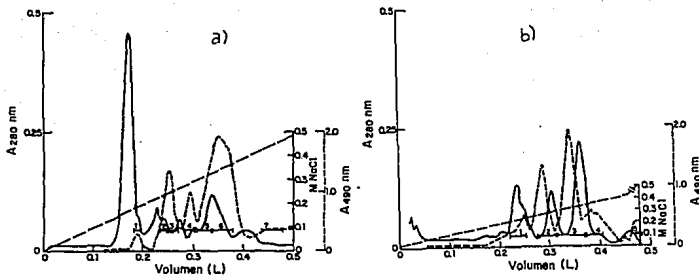


Figura 3. Recromatografía de las fracciones 11a y 11b

Las figuras muestran el perfil cromatográfico de la FII 11a (a) y FII 11b (b). Se utilizó una columna de CMC-32 amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.0 bajo un gradiente de 0 - 0.38 M de NaCl, con un flujo de operación de 30ml/h colectando volúmenes de 2.5 ml en cada tubo. Las fracciones obtenidas en el patrón cromatográfico de ambas fracciones fueron discriminadas en ELISA por reactividad cruzada con anticuerpos monoclonales. De aquí se obtuvieron 12 sub-fracciones positivas en el ensayo de ELISA (7 de la F II 11a y 5 de la FII 11b).

minutos en una columna C4 (fase reversa), obteniéndose una gran cantidad de péptidos (cerca de 40 en total), que dieron resultados positivos en el reconocimiento por anticuerpos. La presencia de 40 péptidos semejantes a NTX en el veneno de *C. noxius*, nos pareció artefactual. Al comparar los patrones cromatográfico de los 4 grupos de fracciones, se observó la presencia de algunos componentes que eluyeron en tiempos de retención muy parecidos, lo cual iba de acuerdo con la idea de que algunos péptidos estaban presentes de manera repetida en más de un grupo de fracciones. Por las razones antes expuestas y tomando en consideración el perfil de reconocimiento por los seis diferentes anticuerpos monoclonales, se mezclaron los péptidos con tiempos de retención muy parecidos y se recomatografiaron por CLAP en un gradiente de acetonitrilo de 0 a 60% en 60 minutos. El número total de péptidos que en un principio se obtuvieron por CLAP, se redujo a 10 componentes con reactividad específica por los anticuerpos monoclonales (Datos no mostrados). Sin embargo los resultados no fueron nada alentadores en cuanto a los rendimientos obtenidos, ya que finalmente se terminó con cantidades muy pequeñas de entre 10-20 μg de cada uno de éstos péptidos. Estas cantidades fueron insuficientes para tratar de continuar su caracterización. A pesar de ello se obtuvo la secuencia N-terminal de 3 péptidos que se muestran en la tabla 3. Dado los resultados tan pobres obtenidos con esta estrategia de ir uniendo fracciones con características de elución y reconocimiento con anticuerpos homólogos, fué necesario modificar algunos pasos para tratar de obtener una mayor cantidad de material. Sin embargo, quedaba claro como conclusión de esta primera estrategia de purificación que el veneno de *C. noxius* contiene un número importante de péptidos semejantes a la NTX.

SEGUNDA ESTRATEGIA

El procesamiento del veneno se realizó de manera habitual pasándolo por una columna de Sephadex G-50 bajo las condiciones antes mencionadas, dando un patrón cromatográfico semejante al mostrado en la figura 1. La FII se paso por una columna de intercambio iónico en acetato de amonio 20mM, pH 4.7, obteniéndose un patrón cromatográfico semejante al obtenido en la estrategia anterior con algunas diferencias en la resolución cercanas al volumen de elución de la fracción 10 y fracciones posteriores a ella. Estas diferencias pueden deberse principalmente a factores tales como tamaño de la columna, cantidad de muestra aplicada, volumen de aplicación, formación de gradiente, etc. El fraccionamiento de los componentes de la fracción II se muestra en la Figura 4 (material proporcionado por la M. en

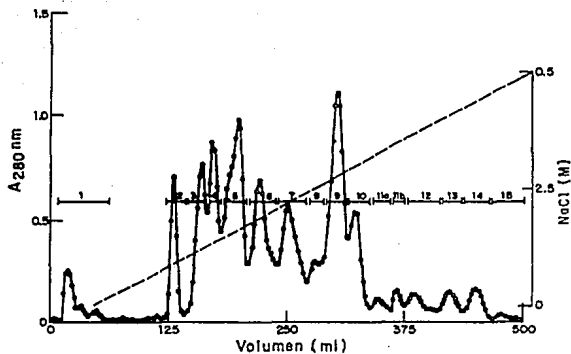


Figura 4. Separación cromatográfica de la F II a través de una columna de intercambio iónico. En una columna (0.9 x 32 cm) de carboximetil celulosa equilibrada con una solución amortiguadora de acetato de amonio 20mM, ph 4.7 eluido con un gradiente salino de 0 a 0.5 M de NaCl. Se aplicaron 100mg de F II con un flujo de operación de 30 ml/h y se colectaron volúmenes de 2.5 ml. Se obtuvieron 15 fracciones las cuales se indican con barras horizontales.

C. Georgina Gurrola obtenido durante la purificación de la NTX). Unas de las principales diferencias con respecto a la estrategia anterior fué que ahora se evitó cualquier mezclado de fracciones y que a partir de estos experimentos se contó con anticuerpos policlonales anti-NTX, obtenidos por la QFB Alejandra Solache en el laboratorio, que permitieron una búsqueda más amplia de los péptidos homólogos a NTX.

De la fracción 11a se aisló la NTX por CLAP (datos no mostrados) y una mínima cantidad de péptido semejante a ella. Tratando de evitar más pasos de purificación a través de los cuales se pudiera perder un poco de muestra y tratando de evitar problemas artefactuales, la fracción 11b fué directamente pasada a través de CLAP en una columna C4 semi-preparativa, dando un patrón cromatográfico como el que se muestra en la Figura 5. Con la ayuda de los anticuerpos policlonales se realizó la búsqueda de los péptidos análogos a la NTX (Figura 6). La cantidad de FII 11b procesada fué de 26 mg; dada la cantidad tan grande de muestra procesada, fué necesario hacer 19 aplicaciones independientes de aproximadamente 1.3 mg cada una en el cromatógrafo. Debido a que se mezcló de manera homogénea el material obtenido de estas aplicaciones fué necesario verificar la pureza de cada uno de los péptidos. Por tal motivo se llevo a cabo una cromatografía a concentración constante de eluyentes por CLAP a cada uno de los péptidos que presentaron reacción cruzada con los anticuerpos en el ensayo de ELISA, considerando homólogos a NTX aquellos péptidos que dieron positivo por encima del 10%, considerando como un 100 % la absorbancia obtenida con NTX a 490 nm, en el reconocimiento por anticuerpos policlonales. Lamentablemente se tuvo problemas con el cromatógrafo, en cuanto a la recuperación final, quedando cantidades muy pequeñas de cada una de ellas. El péptido del cual se pudo recuperar una mayor cantidad (1 mg aproximadamente) para continuar el trabajo eluyó en el tiempo de retención (TR) 36.26 (marcado en la figura 5 con un asterisco) y en una recromatografía isocrática en un TR 11.50 (Figura 7). Este péptido presenta cerca de un 20% de reconocimiento por anticuerpos policlonales (Figura 8a), sin embargo no es reconocido por ninguno de los anticuerpos monoclonales (Figura 8b).

Es importante resaltar el hecho de que los anticuerpos monoclonales no reconocieron al péptido 36.26 (11.50) y por el contrario sí es reconocido por el anticuerpo policlonal. Esto sugiere que los anticuerpos monoclonales están reconociendo una región de la NTX que no se encuentra presente en éste péptido, mientras que en el suero policlonal existen anticuerpos que reconocen segmentos homólogos en ambos péptidos.

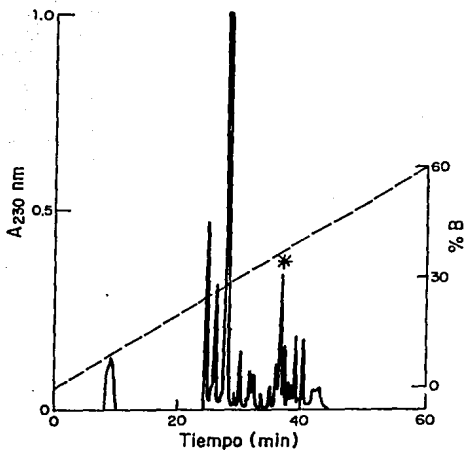


Figura 5. Perfil cromatográfico de la F II 11b por CLAP

Perfil cromatográfico de la FII 11b, en un gradiente lineal de 0 a 60 % de B en 60 minutos con una velocidad de flujo de 1 ml/min (Marcado con línea punteada).

El péptido con TR 36.26 (señalado con un asterisco), fué el péptido del que se obtuvo una mayor cantidad de muestra, de entre todos los componentes que dieron positivo en el ensayo de ELISA con el anticuerpo policlonal (ver figura 6).

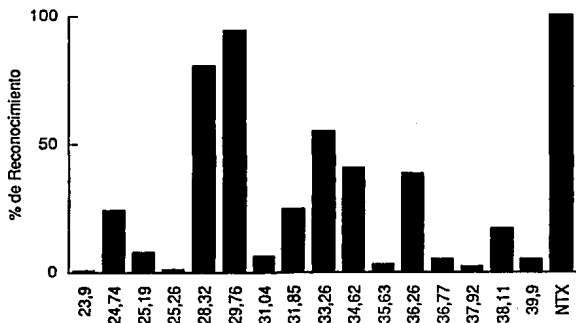


Figura 6. Reconocimiento por ELISA de los componentes de la FII 11b

Los péptidos eluidos en el CLAP de la fracción II 11b fueron ensayados por ELISA. Se consideraron como péptidos semejantes a NTX aquellos péptidos que obtuvieron un reconocimiento con anticuerpos policlonales anti-NTX superior al 10% del valor obtenido con NTX (ver material y métodos). En el eje horizontal se presentan los tiempos de retención que corresponden a los diferentes péptidos obtenidos en el patrón cromatográfico. En el eje vertical se grafica el % de reconocimiento mostrado por cada uno de éstos péptidos con los anticuerpos policlonales, tomando como 100% el reconocimiento obtenido por la NTX.

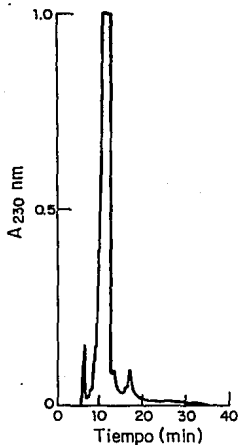


Figura 7. Cromatografía a concentración constante de eluyente del péptido 36.26

En este cromatograma se muestra una corrida isocrática por CLAP en una columna C_4 con una concentración 20% de B constante con un flujo de 1ml/min durante 40 minutos. El péptido mayoritario eluye con un tiempo de retención 11.50.

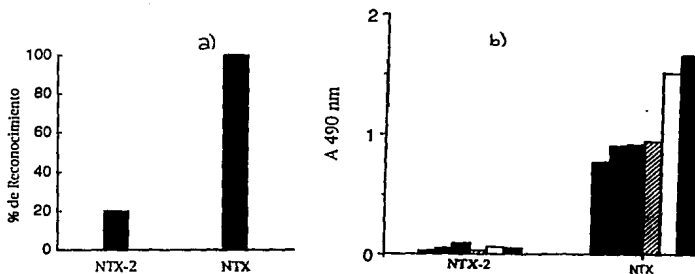


Figura 8. Reconocimiento por ELISA del péptido NTX-2

a) En esta gráfica se muestra el porcentaje de reconocimiento obtenido por el péptido NTX-2 con el anticuerpo policlonal anti-NTX (cerca del 20%).

b) Reconocimiento por parte de los 6 anticuerpos monoclonales levantados contra NTX (BNTX-4, BNTX-12, BNTX-14, BNTX-16 BNTX-18 y BNTX-21).

Cada uno de éstos experimentos fué realizado en dos diferentes ocasiones por triplicado y se grafica el promedio de cada valor obtenido.

Como conclusión de esta segunda estrategia de purificación quedaban claras dos cosas: 1.-) que independientemente de la estrategia utilizada para purificar los péptidos semejantes a NTX en el veneno de *C. noxius* existen varios componentes distintos, confirmando la primera estrategia anteriormente citada; 2.-) que al utilizar anticuerpos policlonales fué posible identificar y caracterizar un componente nuevo, semejante a la NTX cuyos epítopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales son distintos a los epítopes presentes en la NTX-2.

TERCERA ESTRATEGIA

La estrategia utilizada anteriormente confirma la presencia de una variedad de péptidos homólogos a la NTX, pero no proporciona la cantidad exacta del número de estos que pudieran estar formando la familia de péptidos semejantes a NTX dentro del veneno de *C. noxius*. Fué necesario buscar otra estrategia más adecuada para establecer el número de proteínas semejantes a NTX sin realizar demasiados pasos de purificación.

La fracción II proveniente de Sephadex G-50 (ver fig 1) fué pasada directamente por CLAP. Se aplicaron 3mg de FII en una columna C₄ semi-preparativa en un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo en 60 minutos. Se obtuvo un patrón cromatográfico con aproximadamente 40 péptidos (Figura 9). Esto resultó lógico si se considera que en ésta fracción se encuentran presentes tanto las toxinas que actúan sobre canales de sodio así como las que tienen actividad sobre canales de potasio. Estos datos fueron confirmados al hacer una búsqueda con anticuerpos policlonales anti NTX y anti Cn2 (una péptido representante del grupo de toxinas que bloquean canales de sodio presentes en el veneno de *C. noxius*) ver Figura 10. De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 10 se puede observar que las diferentes toxinas dirigidas contra canales de potasio y canales de sodio, están perfectamente agrupadas y que de acuerdo a sus características hidrofóbicas eluyen en tiempos de retención muy parecidos. Esto nos habla de que existen ciertas características fisicoquímicas semejantes entre los péptidos miembros de una familia de toxinas.

A los péptidos que dieron reacción cruzada con los anticuerpos policlonales anti-NTX se realizó un ensayo de ELISA con los seis anticuerpos monoclonales para observar y comparar el grado de reconocimiento de los monoclonales por cada uno de los péptidos homólogos a NTX (Figura 11).

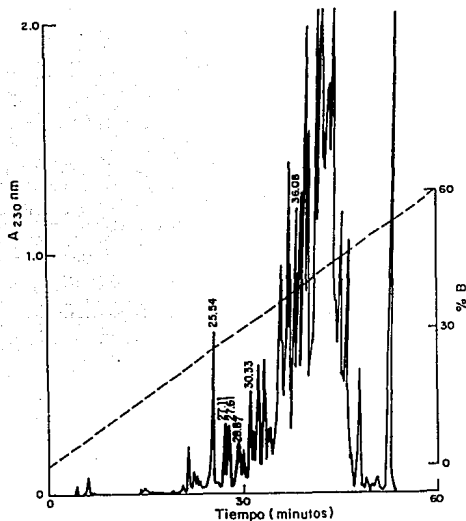


Figura 9. Fraccionamiento de la FII a través de CLAP.

La FII (3 mg) fué pasada directamente por una columna C₄ semipreparativa en un gradiente de acetonitrilo de 0 a 60% en 60 minutos por CLAP. Mediante este paso de purificación se obtiene la separación de los péptidos que actúan a nivel de canales de sodio y de aquéllos que actúan sobre canales de potasio. Los péptidos semejantes a NTX se eluyen a partir del minuto 25. El péptido que eluye en TR 25.54 corresponde a NTX, los péptidos semejantes a NTX eluyen hasta un TR máximo de 36.08.

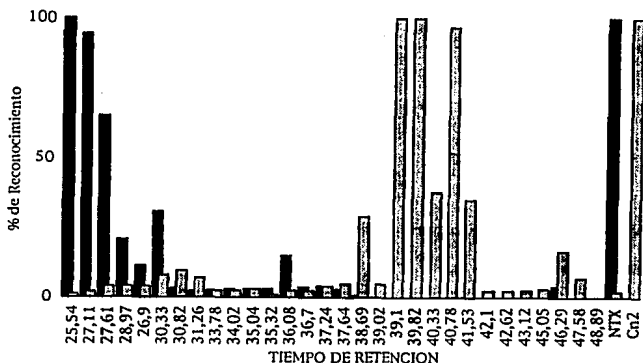


Figura 10. Reconocimiento por anticuerpos policlonales en un ensayo de ELISA de los componentes de la fracción II.

Cada uno de los péptidos obtenidos al pasar la FII por CLAP fueron seleccionados de acuerdo al reconocimiento obtenido con los anticuerpos anti NTX ■ y anticuerpos anti Cn2 ▨ (péptido representante de las toxinas de sodio en el veneno de *C. noxius*). En la extrema derecha se muestran los controles de las toxinas NTX y Cn2, los cuales representan el 100% de reconocimiento obtenido con sus respectivos anticuerpos policlonales.

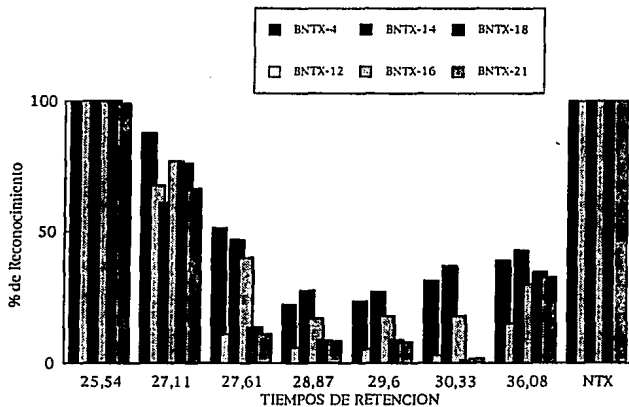


Figura 11. Reconocimiento por ELISA con anticuerpos monoclonales anti-NTX de los componentes de la FII purificados por CLAP.

En esta gráfica se muestran los distintos % de reconocimiento obtenidos por los componentes de la FII del veneno de *C. noxius* que anteriormente dieron reacción positiva con los anticuerpos policlonales. En la parte superior se muestran las columnas correspondientes a los diferentes anticuerpos monoclonales.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que la eficiencia relativa en el reconocimiento obtenido con cada uno de los anticuerpos monoclonales varía con los diferentes péptidos semejantes a la NTX. El uso de anticuerpos monoclonales junto con las características de elución en CLAP permiten diferenciar entre varios péptidos pertenecientes a una misma familia. Mediante esta estrategia se pudo demostrar la existencia de un mínimo de 6 péptidos semejantes a NTX presentes en el veneno de *C. noxius*. El número exacto de péptidos semejantes a NTX hasta ahora descritos podría aumentar, ya que algunos de estos péptidos analizados presentan contaminaciones que probablemente correspondan a otros péptidos homólogos. No se puede considerar un estrategia optativa para purificar grandes cantidades de proteína, ya que una de las principales limitantes es la cantidad de muestra que se puede aplicar en el cromatógrafo.

B.- CARACTERIZACION QUIMICA

El trabajo desarrollado posterior a la purificación se realizó principalmente con el péptido 36.26 (11.50), además de lograr establecer la secuencia N-terminal de algunos otros péptidos mencionados en la estrategia de purificación No. 1

1.-Análisis de aminoácidos

Para obtener la composición de aminoácidos se proceso 1 nanomol de muestra, tomando como base el peso molecular de la NTX. Este material fué hidrolizado a dos tiempos (24 y 48 hrs.) a 110 °C. La composición de aminoácidos del péptido 36.26 (11.50) es mostrada en la Tabla 1. La cantidad de cada aminoácido fué determinada por integración del área bajo la curva. Serina, treonina y tirosina son muchas veces parcialmente destruidos por hidrólisis ácida, donde la cantidad de destrucción depende del tiempo de hidrólisis. La inclusión de fenol en la mezcla de hidrólisis tiende a disminuir la destrucción de algunos aminoácidos, particularmente tirosina.

La determinación de la composición molar de cada aminoácido en la proteína se calculo en base al análisis comparativo de una muestra estándar de concentración conocida bajo las mismas condiciones de trabajo que la muestra problema.

TABLA 1 Analisis de Aminoácidos del Péptido 36.26 (11.50) NTX-2

	Observado	Integrado mol Residuos/mol Péptido
Alanina	2.13	2
Ac. Aspártico o Asparagina	3.33	3
Cisteína	ND	ND
Fenilalanina	1.15	1
Glicina	2.84	3
Ac. Glutámico o Glutamina	2.70	3
Isoleucina	2.84	3
Leucina	1.15	1
Lisina	6.16	6
Metionina	0.16*	1
Serina	2.77	3
Tirosina	0.05*	1
Treonina	2.32	3
Total		30 + ND

ND = No determinado

* Valores extrapolados a tiempo 0.

Los valores mostrados en esta tabla están basados en un análisis comparativo con una muestra estándar bajo las mismas condiciones de trabajo que la muestra problema.

2.-Secuencia de aminoácidos.

De acuerdo al tipo de membranas (de fluoruro de polivinilo PVDF), utilizada como soporte en la obtención de la secuencia de aminoácidos basados en el método de Edman, se siguieron dos protocolos : adsorbido y covalente.

La muestra, sin reducir ni alquilar, colocada en la membrana de manera adsorbida, permitió obtener la secuencia de los primeros 15 aminoácidos de la porción amino terminal de la proteína NTX-2.

El protocolo covalente utilizado en el laboratorio, se basó en el empleo de membranas derivatizadas con grupos químicos que permitieron unir a las proteínas covalentemente. Los dos tipos de membranas utilizadas fueron las derivatizadas con el grupo aril amino y las que utilizan el grupo fenil isotiocianato (DITC) como grupo de unión .

Las membranas derivatizadas con el grupo fenil isotiocianato, el cual reacciona con aminas primarias, permitieron obtener los primeros 30 residuos de la porción amino terminal de la NTX-2. Se observaron algunos espacios vacíos que probablemente correspondan a residuos de lisina, los cuales no pueden ser detectados en este tipo de membrana, ya que la unión de las proteínas a esta membrana se realiza principalmente con la amina primaria de las lisinas.

Las membranas con el grupo aril amino, el cual reacciona con los grupos carboxílicos, permitieron corroborar los datos obtenidos anteriormente y confirmar la posición de los residuos de lisina en la secuencia.

El utilizar métodos complementarios, como son la hidrólisis con bromuro de cianógeno y la digestión tróptica, permitió conocer la secuencia carboxilo terminal de la proteína y obtener fragmentos péptidicos que se sobrelapanan con los ya conocidos, respectivamente (ver Figura 12). La estrategia seguida para la obtención de la secuencia completa de aminoácidos esta esquematizada en la Tabla 2.

Las secuencias amino terminal de algunos otros péptidos obtenidos durante el desarrollo de las tres estrategias de purificación se pueden observar en la Tabla 3. En primer término se muestran los péptidos aislados durante la estrategia No. 1. La secuencia de la NTX-2 se presenta como el péptido aislado durante la estrategia No. 2. Los péptidos aislados durante la última estrategia corresponden a péptidos agrupados dentro de los péptidos homólogos a NTX, ya que de estos se logro obtener la secuencia amino terminal más completa. Se les ha

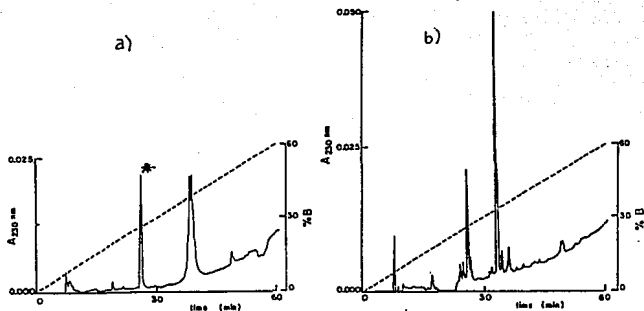


Figura 12. Análisis por CLAP de la digestión e hidrólisis del péptido NTX-2.

En esta figura se muestran los productos de digestión e hidrólisis del péptido NTX-2 :

a) Representa la hidrólisis con bromuro de cianógeno, el fragmento señalado con un asterisco corresponde de acuerdo a la secuencia de aminoácidos a la porción carboxilo terminal del péptido.

b) Patrón cromatográfico de la digestión trípica según el protocolo detallado en materiales y métodos. Cada fragmento generado en la digestión fué posteriormente analizado en el secuenciador automático (ver tabla 4).

Las condiciones de ambos cromatogramas fueron las mismas: eluidos en un gradiente lineal de acetonitrilo de 0 a 60% en 60 minutos en una columna C₄ preparativa.

**TABLA 2. DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA NTX-2
[PEPTIDO 36.26(11.50)]**

SECUENCIA					MEMBRANA-TR
1	10	20	30	39	
TIINEKCFAT	SQXWTP...		...MN	GKCKCYN...	Directo
..CFAT	SQCWTPCK...				H. BrCN
TIINEK...					D. triptica 32.30
					D. triptica 23.74
					D. triptica 26.46
		...KXA	IGSLQSK...	...CKCYN...	D. triptica 24.43
TIINEKCFAT	SQCWTPCKXA	IGSLQSKCMN...			RC-DITC*
TIINEKXFAT	SQXWTPXKKA	IGSLQSKXMN	GKXX...		RC-aril* amino
			...G		Analisis a.a
TIINEKCFAT	SQCWTPCKKA	IGSLQSKCMN	GKCKCYNG		Secuencia Completa

*, muestra reducida y alquilada

b, membrana derivatizada con el grupo fenil-isotiocianato

c, membrana derivatizada con el grupo aril-amino

D, digestión

H, hidrólisis

TABLA 3. SECUENCIAS AMINO TERMINAL DE ALCUNOS PEPTIDOS HOMOLOGOS A NTX

TR	1	10	20	30	39
20.43 ¹	AV_NY	RTSDK	DD_Q...		
24.72 ¹	NV_AG	ATGVR...			
29.95 ¹	KNGYP	V_N...			
36.26 (11.50) ¹	TIINE	KCFAT	SQCWT	PCKKA	IGSLQ SKCMN GKCKC YNG
NTX-3 ²	TFINV	KCTSP	KQCSK	PQQLQ	PCKEL...
NTX-4 ³	TFINV	KCTSP	LQCLQ	PGDEL	YG...
28.97 (NTX-5) ⁴	TFIDV	K...			
29.60 (NTX-6) ⁴	TFINV	KATSG	YE_LP	AAKAA	IG_AS...
30.33 (NTX-7) ⁴	VTINV	KATSP	QQ_LG	YYKAA	FGI_A _G...
NTX	TIINV	KCTSP	KQCSK	PCKEL	YGSSA GAKCM NGKCK CYNN

¹ Péptido aislados en la estrategia No. 1

² Péptido (NTX-2) aislado en la estrategia No. 2

³ Péptido aislados por G. Gurrola

⁴ Péptido aislado en la estrategia No. 3

Los tiempos de retención (TR) corresponden a los tiempos de elución mostrado en el patrón cromatográfico por CLAP en las diferentes estrategias.

dado un número (NTX-5, NTX-6 y NTX-7) de acuerdo al orden en el tiempo de elución. Los péptidos NTX-3 y NTX-4 corresponden a péptidos aislados y secuenciados en un trabajo anterior desarrollado por la M. en C. Georgina Gurrola.

En la familia de los péptidos homólogos a NTX, según los datos obtenidos hasta ahora (ver tabla 3), existe un alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal, los cambios más notables y los que posiblemente no alteren de manera considerable su especificidad, se encuentran en la región central de la estructura primaria de éstos péptidos. Estos datos aumentan el interés de nuestro grupo en completar la caracterización de la secuencia de aminoácidos y su efecto sobre canales de potasio en ensayos electrofisiológicos y contribuir de una forma más completa al entendimiento de la relación estructura-función de estas biomoléculas y tratar de analizar desde un punto de vista evolutivo la presencia de esta variedad de péptidos semejantes en el veneno de alacrán.

Existe otro grupo de péptidos que difiere considerablemente de la secuencia de aminoácidos de la NTX, sin embargo son reconocidos por los anticuerpos policlonales levantados contra la propia NTX; existe la posibilidad de que la homología con la toxina se encuentre en la región central o en la porción carboxilo terminal hasta ahora no descritas. Hasta el momento podemos hablar de dos grupos de péptidos semejantes a la NTX, uno de alta homología a nivel de secuencia de aminoácidos y otro de baja homología, pero ambos grupos reconocidos por los anticuerpos policlonales.

C.- ENSAYOS DE COMPETENCIA

Uno de los objetivos propuestos al inicio de éste trabajo, fué el de comparar las propiedades de los péptidos análogos a NTX con la propia NTX. Con tal motivo y teniendo la secuencia de aminoácidos conocida, resultaba interesante ver si existía algún tipo de competencia por el sitio de unión a NTX en membranas de cerebro de rata, según el protocolo descrito en material y métodos. Los efectos inhibitorios de varias concentraciones de NTX y NTX-2 en la unión al equilibrio de [¹²⁵I] NTX a membranas P3 son mostrados en la Figura 13. El IC₅₀ (mitad de la concentración inhibitoria) para NTX fué de 0.30 nM y para la NTX-2 de 300 nM. Con el objeto de complementar éstos ensayos de competencia se marco radiactivamente la NTX-2. Sin embargo, dada la radioactividad específica tan baja obtenida (5.7 Ci/mol), no se

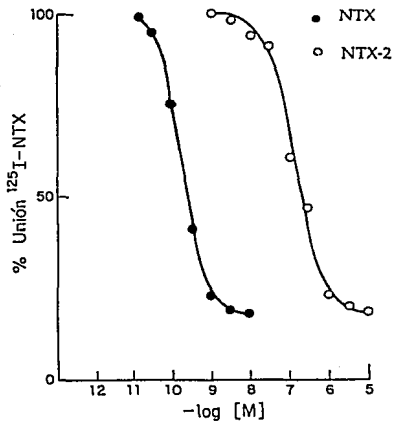


Figura 13. Curvas de desplazamiento de la unión de [¹²⁵I] NTX a P 3.

Utilizando la NTX-2 como competidor se realizaron curvas de desplazamiento de [¹²⁵I]NTX en membranas de cerebro de rata (P 3) (ver mat y mét.). Se probaron varias concentraciones de NTX fría como control (10nM a 10 pM) y NTX-2 como competidor (10 uM a 1.0 nM) .

podieron realizar los ensayos de desplazamiento con NTX fría. El intento de marcar radioactivamente el péptido NTX-2 se hizo por duplicado, sin embargo en ambos casos los resultados fueron similares. Tratando de analizar las diferencias encontradas en la cantidad de radioactividad específica obtenida para ambas toxinas, 131 Ci/mol para NTX, podremos explicar esas diferencias si comparamos sus estructuras primarias. Analizando la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas y tomando en consideración la estructura terciaria predicha para la NTX (de "puño cerrado", en base al modelo descrito para la CHTX) se puede suponer que en dicha estructura la tirosina de la posición 21 pudiera estar expuesta favoreciendo la iodación de la toxina, mientras que la tirosina presente en ambas toxinas en la porción carboxilo terminal (en la posición 36 en la NTX-2 y 37 en la NTX) pudiera no estar tan disponible en las condiciones experimentales de iodación .

D.- BIOENSAYOS DE LA NTX-2

Se realizaron pruebas de toxicidad sobre mamíferos (ratones) inyectando dos ratones por vía intraperitoneal con 100 y 200 µg de NTX-2 por 20g de peso de ratón. Al igual que en mamíferos NTX-2 no presentó ningún efecto tóxico a las dosis ensayadas (30 µg), sobre crustáceos (acociles). Sin embargo, al administrar la misma dosis aplicada a los acociles sobre insectos (grillos) éstos sí presentaron síntomas de toxicidad (convulsiones, parálisis de miembros inferiores y pérdida de reflejos). En ambos ensayos se inyectaron a los animales en la parte dorsal de su cuerpo.

E.- DETERMINACION DE LOS PUENTES DISULFURO DE LA NTX-2

Los puentes disulfuros intramoleculares estabilizan el rearreglo tridimensional de una cadena peptídica sencilla, haciéndola menos susceptible a la degradación. Experimentalmente se ha demostrado (Habersetzer-Rochat 1976) la disminución y pérdida de la actividad mostrada por las toxinas presentes en el veneno de alacrán al reducir los puentes disulfuro.

Sometiendo a digestión trípica 30 µg de muestra, sin reducir ni carboximetilar y pasando los productos de digestión purificados por CLAP a secuencia, se ha obtenido hasta el momento la posición de uno de los puentes disulfuro presentes en la molécula entre los residuos 7 y 28 (datos no mostrados), el cual concuerda con la posición de uno de los puentes disulfuro que presentan la ChTX (Gimenez-Gallego y cols. 1988, Massefski y cols. 1990, Bontems F. y cols. 1991) y la NTX (Gurrola G. datos no publicados).

F) COMPARACION DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA NTX-2 CON OTRAS TOXINAS CON ACTIVIDAD SOBRE CANALES DE POTASIO.

Es interesante analizar toda esta serie de datos obtenidos a partir del estudio de la proteína NTX-2 y compararlos con NTX. Aún cuando las toxinas en general expresan múltiples funciones, estas presentan un pequeño número de arreglos espaciales. La presencia de varios péptidos semejantes entre sí en el veneno de *C. noxius*, pudiera deberse a un fenómeno natural evolutivo, en donde los péptidos con menor concentración dentro del veneno representan las estructuras menos activas que evolutivamente han sido relegadas y tienden a desaparecer del veneno, conservando únicamente aquellas proteínas que aporten mayores beneficios en sus mecanismos de defensa y en la obtención de alimento.

Otra posibilidad sería que estos péptidos representen toda una variedad de toxinas que pudieran estar afectando a igual número de canales iónicos. Pudiera representar un amplio mecanismo de defensa que los alacranes hubieran desarrollado para poder contender contra diversos organismos. Cualquiera que sea la realidad resulta muy importante e interesante continuar el estudio de esta sub-familia de péptidos tratando de entender el carácter evolutivo y funcional de estos péptidos dentro del veneno de los alacranes.

Sí observamos detenidamente la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas y las comparamos con las secuencias de otras proteínas que actúan sobre canales de potasio notaremos la conservación tan grande que presentan los residuos de cisteína en la estructura primaria, lo que probablemente le confiera un arreglo tridimensional característico para este tipo de proteínas (Tabla 4).

Ahora bien analizando por separado a la NTX y NTX-2 y comparando detenidamente las diferencias presentes en la secuencia de ambas proteínas, podemos observar un alta

TABLA 4. Comparación de secuencias de toxinas que actúan sobre canales de K⁺

	1	10	20	30	39
NTX-2	TIINEKCFAT	SQCWTPCKKA	IGSLQSKCMN	GKCKCYNG	
NTX	TIINVKCTSP	KQCSKPCKEL	YGSSAGAKCM	NGKCKCYNN	
MgTX	TIINVKCTSP	KQCLPPCKAQ	FGQSAGAKCM	NGKCKYPH	
CnII 10.2	TFIDNVKCGS	SKEEXP...			
C.l.l.l.	TVDIVKCTSP	KQSLP CSKEI	YGRHAG...		
TS II-9	VFINAKCRGS	PGCLPKCKGA	XGKAAGKCN...		
ChTX	EFTNVSCCTS	KECWSVCQRL	HNTSRGKCMN	KKRCYYS	
IbTX	EFTDVDCSVS	KECWSVCKRL	FGVDRGKCMG	KKRCYQ...	
LTX II	ZFTQESCTAS	NQCWSICKRL	HNTNRGKCMN	KKRCYYS	
LTX III	GLIDVRCYDS	SQCG...			
KTX	KTXGVEINVK	CSGSPQCLKP	CKDAGMRFGK	CMNRKCHCTP	
LeTX (Scyllatoxin)	AFCNLRHCQL	SCRSLGLLGK	CIGDKCECVK	H...	
Apamina	CNCKAPETAL	CARRCQQH			

ChTX caribdotoxina; KTX kallitoxina; IbTX Iberitoxina; LeTX Scyllatoxina; CnII 10.2 Toxina de *Centruroides noxius* fracción II 10; LTX II Lelurustoxina II; LTX III Lelurustoxina II; C.l.toxina de *Centruroides limpidus impidus*; MgTX Margatoxina; NTX Noxiustoxina; NTX-2 Noxiustoxina 2

homología en la región carboxilo terminal y en los primeros siete residuos de la porción amino de la proteína. Si tomamos en cuenta los reportes que se tienen de la importancia de la región amino terminal de la NTX en su efecto tóxico (Gurrola y cols. 1989) y su actividad bloqueadora sobre canales de potasio en ensayos electrofisiológicos (Vaca L. y cols. 1993) utilizando péptidos sintéticos, resulta de interés el cambio tan importante que tiene la NTX-2 respecto de la NTX en la posición 5 donde existe un cambio de valina por un glutámico.

Aprovechando los datos obtenidos por G. Gurrola en el sentido de que el nonapéptido sintético de la porción amino terminal de la NTX₁₋₉ es capaz de producir una sintomatología similar a la producida por la NTX en ratones, se sintetizó un péptido similar cambiando únicamente el residuo de la posición 5 Glu- Val (NTX_{1-9E}). Contando con la colaboración del estudiante de doctorado Luis Vaca, ambos péptidos fueron probados en ensayos electrofisiológicos sobre canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia obtenidos de un cultivo de células endoteliales de aorta de bovino. Los datos obtenidos indican una disminución en el bloqueo por parte de la NTX_{1-9E} que la mostrada por el péptido NTX₁₋₉ (Datos no publicados). Más recientemente Luis Vaca probó en el mismo sistema el efecto bloqueador de la NTX nativa y la NTX-2, de donde se obtuvo una curva de dosis-respuesta (a -40 mV) de donde se puede apreciar el efecto de ambas toxinas en la probabilidad de apertura de este canal. El efecto más notorio es presentado por la NTX (ver Figura 14).

Asimismo, resultados preliminares obtenidos por la estudiante de doctorado Angelina Ramírez en ensayos electrofisiológicos en el canal de potasio modificado Sheaker sugieren que el comportamiento obtenido en estos canales por parte de la NTX-2 es similar al obtenido con la NTX (datos no presentados).

Estos datos nos muestran la variabilidad en el comportamiento de las toxinas ante diferentes canales de potasio. Así un mismo canal puede ser bloqueado por una variedad de toxinas con diversas afinidades y viceversa, una misma toxina puede actuar sobre diferentes canales pero no con el mismo efecto.

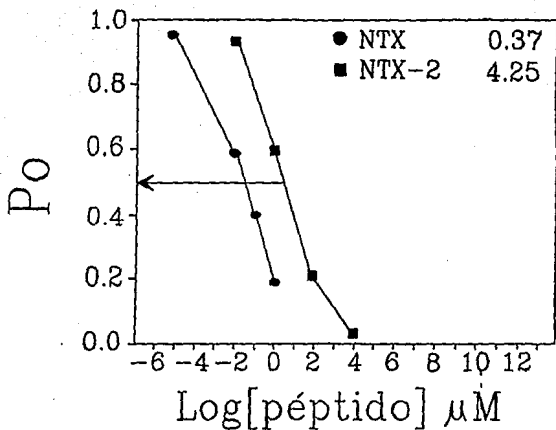


FIGURA 14 Curva dosis-respuesta de la NTX y NTX-2 sobre un canal de potasio.

Curva dosis-respuesta donde se puede observar el efecto presentado por la NTX y NTX-2 sobre la probabilidad de apertura (P_o) de un canal de potasio activado por calcio de baja conductancia obtenido de un cultivo de células endoteliales de aorta de bovino, en un ensayo de voltaje sostenido (-40 mV). La concentración media inhibitoria se muestra anotada en el extremo superior derecho de la figura (esta gráfica fué obtenida por Luis Vaca, trabajando en colaboración con nuestro laboratorio).

VI.- CONCLUSIONES

En forma general podemos concluir:

-En el veneno del alacrán *Centruroides noxius* está presente una familia de péptidos, posiblemente de 9 componentes, que presentan una alta homología en composición, secuencia de aminoácidos y probablemente comportamiento electrofisiológico, con la Noxiustoxina (NTX).

- El uso combinado de anticuerpos policlonales y monoclonales producidos contra NTX, da un amplio espectro en la búsqueda de péptidos y permite una sencilla selección de los péptidos homólogos a NTX en el veneno de *C.noxius*.

- La cantidad de NTX y péptidos homólogos presentes en el veneno total de *C.noxius* es muy pequeña. Mientras la NTX representa cerca del 1% del total de proteínas presentes en el veneno, cada uno de los péptidos homólogos no se encuentra en una cantidad mayor del 0.1% .

El estudio completo de la familia de péptidos semejantes a NTX, ayudará a la comprensión de la relación estructura-función de las toxinas a nivel de canales iónicos, así como ampliará la perspectiva del uso de toxinas como sondas para el estudio de los mecanismos moleculares de la gran diversidad de canales de potasio presentes en las células.

Como mencione anteriormente, los cambios en la secuencia, pero conservando un motivo estructural, probablemente sea una de las estrategias que por selectividad evolutiva se ha desarrollado para dar con pocas alteraciones mayor especificidad y afinidad por ciertas moléculas.

VII.- PERSPECTIVAS

Dada la importancia que representa el tener péptidos específicos para el estudio de los diferentes tipos de canales de potasio presentes en toda membrana biológica, resulta relevante la caracterización de nuevos péptidos que amplíen el número de moléculas que puedan ser utilizadas como herramientas. El aislamiento y caracterización de péptidos semejantes permitirá el estudio funcional de una diversidad de canales de potasio.

Una de las estrategias para poder estudiar la relación estructura función de las toxinas de alacrán es la de aislar y caracterizar péptidos con cierta homología en su secuencia de aminoácidos pero con algunas diferencias. El relacionar los cambios en la secuencia de aminoácidos con las diferencias en reconocimiento de anticuerpos y actividad molecular ayudará grandemente al entendimiento de este paradigma.

El lograr purificar y caracterizar diferentes péptidos pertenecientes a una misma familia de toxinas abre la posibilidad de intentar aislar diferentes tipos de canales iónicos.

Dada la importancia que representa el tener péptidos específicos para el estudio de los diferentes tipos de canales de potasio presentes en toda membrana biológica, resulta relevante la caracterización de nuevos péptidos que amplíen el número de moléculas que puedan ser utilizadas como herramienta.

Este estudio puede ampliarse en el futuro utilizando veneno de alacranes de otras especies que también poseen toxinas dirigidas contra canales de potasio.

Otra perspectiva futura de mucho interés en este campo es la obtención del gen que codifica para la NTX. Si se llegarán a presentar dificultades en la clonación se podría intentar sintetizar el gen, como ya se ha hecho para otras toxinas (Chul-Seung Park 1991). La utilización de las herramientas recientemente desarrolladas por la Biología Molecular permitiría originar modificaciones dirigidas (mutaciones sitio específico) o al azar ("phage display") mediante el uso de fago filamentosos para ampliar la diversidad de estructuras semejantes a la NTX para su estudio. Este trabajo se vería beneficiado por la utilización de técnicas electrofisiológicas de "patch-clamp" (voltaje sostenido en fragmentos de membranas) o con la expresión de RNAs mensajeros específicos para canales de potasio en oocitos de rana, o en células de insecto (SF 9), con la finalidad de estudiar la relación estructura función a nivel molecular y de forma sistemática.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

Alagón A.C and Possani L.D. (1983) Utilización de cromatografía por afinidad para la purificación de enzimas de venenos animales . Biotecnología de enzimas -UNAM.

Alagón A.C., Guzmán H.S., Martín B.M., Ramírez A.N., Carbone E. and Possani L.D. (1988) Isolation and characterization of two toxins from the mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. Comp.Biochem. Physiol. 89B : 153-161.

Allen G. Preliminary characterization of the protein sequencing of proteins and peptides. Work T. S. and Burdon R.H. Elsevier Science Publishing Co. Inc. England. 1983 :17-40 (2 Ed.)

Auguste P., Hugues M., Gravé B., Gasquière J.C., Moes P., Tartar A., Romey G., Schweitz H. and Lazdunski M. (1990) Leiurotoxin I (Scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ channels. J. Biol.Chem. 265: 4753-4759.

Babin D.R., Watt D., Goos S.M., Mlenjnik R.V. (1974) Amino acid sequence of neurotoxic proteins variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. Arch.Biochem.Bioph. 164: 694-706.

Balderas C.A., (1988) Aislamiento y caracterización de toxinas del veneno del alacrán de Morelos *Centruroides limpidus limpidus* (Karsch) Tests de licenciatura U.Auto.Edo. Mor./ CEINGEBI-UNAM.

Blaustein M.P., Rogowski S. R., Schneider M. J. and Krueger B.K. (1991) Polypeptide toxins from the venom of old world and new world scorpions preferentially block different potassium channels. Mol. pharm. 40 932-942.

Bontems F., Roumestand C., Gilguin B., Ménez A. Toma F. (1991) Refined structure of charibdotoxi: common motifs in scorpions toxins and insect defensins. Sciences 254: 1521-1523.

Briggs D.E.G. (1987) Scorpions take to the water. Nature 326: 645-646.

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.

Chahalan M.D. (1975) Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom. *J. Physiol. Lond.* 244(2): 511-534.

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

Catterall W.A., Morrow C.S. and Harfshorne R.P. (1979) Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage-sensitive sodium channels in intact, lysed and detergent-solubilized brain membranes. *J. Biol. Chem.* 254 : 11379-11387.

Chang C.C., and Lee C.Y. (1903) *Arch. Int.Pharmacodyn. Ther.* 144, 241-257.

Chicchi G.G., Gimenez-Gallego G., Ber E., Garcia M.L. Winqvist R. and Cascien M.A. (1988) Purification and characterization of unique, potent inhibitor of apamin binding from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom. *J. Biol. Chem.* 263: 10192-10197

Chul-Segung Park, Hausdorff S. F., Miller C. (1991) Design, synthesis, and functional expression of a gene for charybdotoxin, a peptide blocker of K⁺ channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 88. : 2046-2050

Couraud F. and Bernar P. (1979) Electrophysiological studies on embryonic heart cells in culture. Scorpion toxin as a tool to reveal latent fast sodium channel. *Bioch. Biophys. Acta* 553(1): 154-168.

Crest M., Gola M., Zerrouk H., Benslimane A., Rochat H., Mansuelle P., Martin-Eauclaire M-F. (1992) Kallotoxin(KTX) a novel peptidyl inhibitor of neural BK-type Ca⁺⁺-activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J. Biol. Chem.* 267: 1640-1647.

Dufton M.J. and Rochat H.(1984) Classification of scorpion toxins according to amino acid composition and sequence . J. Mol.Evol. 20 : 120-127.

Edman P. and Begg G. (1967) A protein sequenator Eur. J. Biochem. 1: 80-91.

Fernández A.J.A. (1992) Aislamiento y caracterización química de componentes tóxicos del veneno de alacrán *Centruroides limpidus limpidus* (Alacrán de Guerrero). Tesis de licenciatura. U. Aut.Agrar. "Antonio Narro"/Instituto de Biot.-UNAM

Fontecilla-Camps J.C., Alm assay R.J., Suddath F.L., Watt D.D. and Bugg C.E. (1980) Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. Proc. Natl. Acad. 77: 6490-6500.

Freire-Maia L. and Campos J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. Natural Toxins. Charlotte L. Ownby and George V. Odell. Pergamond Press, USA 1989 : 139-159.

Galvez A., Gimenez-Gallego G.,Reuben P.J., Roy-Contanan L., Feigenbaum P., Kaczorowski G.J.,García M.L. (1990) . Purification and characterization of a unique potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. J. Biol. Chem. 265: 11083-11090

García-Calvo M., Vázquez J., Smith M., Kaczorowski G.J. García M.L. (1991) Characterization of the solubilized charybdotoxin receptor from bovin aortic smooth muscle. Bioch. 330: 1157-1164.

García-Calvo M., Leonard R.J., Novick J., Stevens S.P., Schmalhofer W., Kaczorowski G.J. and García M.L. (1993) Purification, characterization and biosynthesis of Margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. J. Biol. Chem. 268: 18866-18874.

Giangiacomo K.M., García M.L. and McManus O.B. (1992) Mechanism of Iberitoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Bioch.* 31: 6719-6727.

Gimenez-Gallego G., Navia M.A., Reuben J.P., Katz G.M., Kaczorowski G.J., García M.L., (1988) Purification, sequence and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-channel activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 85 :3329-3333.

Glazer A.N., Delange R.J., Segman D.S. Chemical characterization of protein and their derivatives. Chemical modification of proteins. *Work. T.S. and Work E. Elsevier Science Publishing Co. Inc. USA, 1975 :13-30 (1 er Ed.)*.

Gurrola G.B., Molinar-Rode R., Sitges M., Bayón A. and Possani L.D. (1989) Synthetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this K⁺ channel blocker is located its amino terminal portion. *J. Neu. Trans.* 77 : 11-20

Gurrola G.B., Heri6n P., S6nchez M.R., Saavedra R. and Possani L.D. (1992) Immunochemical characterization of noxiustoxin with synthetic peptides and monoclonal antibodies (Sin publicar)

Guzm6n S.H. (1984) Purificaci6n y caracterizaci6n bioqu6mica de toxinas del veneno de alacr6n *Centruroides limpidus limpidus* (Alacr6n de Guerrero) Tesis de licenciatura, Ins. Inv. Biom. UNAM

Habersetzer-Rochat C. and Sampieri (1976) Structure-function relationship of scorpion neurotoxins. *Bioch.* 15: 2254-2260.

Harvey A.L., Marshall D.L. and Possani L.D. (1992) Dendrotoxin-like effects of noxiustoxin. *Toxicon* 30: 1497-1500

Hille B. (1992) Ionic Channels of excitable membranes. Ed. Sinauer, Sunderland, M.A. 77: 153-161

Hugues M., Romey G., Duval D., Vicent J.P., Lansdunski M . (1982) Apamina as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 1308-1312.

Johnson B.A. and Sugg E. (1992) Determination of the three-dimensional structure of Ibero toxin in solution by H-nuclear magnetic resonancespectroscopy. Bioch. 31: 8151-8159.

Keegan H.L. Scorpions of medical importance. University press of Mississippi. USA. 1980: 41-43

Koppenhöfer E. and Schmidt H. (1968) Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. Experientia 24: 41-42.

Lucchesi K. and Moczydlowski E. (1990) Subconductance behavior in a maxi Ca⁺⁺-activated K⁺ channel induced by dendrotoxin-I, Neuron 2 : 141-148.

Martin B.M., Carbone E., Yakatani A., Brown A.M., Ramírez A.N., Gurrola G.B., and Possani L.D. (1988) Aminoacid sequence and physiological characterization of toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffman . Toxicon 26 : 785-794.

Martin B., Ramírez A.N., Gurrola G.B., Nobile M., Magnelli V. and Possani L.D. (1992) Datos no publicados.

Mehrahan F., Breeze A.L. and Dolly O. (1984). Identification by cross-linking of a neural acceptor protein for dendrotoxin, a convulsant polypeptide. FEBS lett 174: 116-121

Ménez A., Bontems F., Roumestand C., Gilguin B., Toma F. (1992) Structural basis for functional diversity of animal toxins. Proc. R. Soc. End. 99B (1/2) : 83-103.

Massefski W., Redfield A.G., Hare D.R., Miller C. (1990) Molecular structure of charybdotoxin, a pore-directed inhibitor of potassium ion channels. Science 249 : 521-524.

Miller C., Moczydlowski E., Latorre R., Phillips M., (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{++} -activated K^{+} channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313: 316-318.

Moore S. (1963) On the determination of cysteine acid. *J. Biol. Chem.* 238: 235-237.

Morrison M. and Bayse G.S. (1970) Catalysis of iodination by lactoperoxidase. *Biochem.* 9(15): 2995-3000

Muñiz Z., Diniz C., and Dolly (1990) Characterization of binding sites for d-Dendrotoxin in guinea pig synaptosomes, relationship to receptor for the K^{+} channel probe a-Dendrotoxin. *J. Neuroch.* 54:

Narayanan P. and Lala K. (1992) Prediction of tertiary structure in scorpion-toxin type proteins. *Lif. scien.* 50: 683-693.

Nonner W. (1979) Effect of *Leiurus* scorpion venom on the "gaiting" current in myelinated nerve. *Adv. Cytoph.* 3: 345-352.

Pete M.J., Canton J.M., Murphy R.F. (1992) Isolation and primary structure of a potent toxin from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Intr.J. Pr. Res.* 40 : 582-586.

Petersen M., Penner R., Rierau F. and Dreyer F. (1986) β -Bungarotoxina inhibits a non-inactivating potassium current in guinea pig dorsal root ganglion neurones. *Neurosci. Lett.* 68(1): 141-145

Possani L.D., Alagón A.C., Fletcher 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. *Arch. Bioch. Bioph.* 180: 394-403.

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

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

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

Possani L.D., MSteinmetz W.E., Dent M.A., Alagón A.C., and Wüthrich K. (1981b) Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. *Biochem. Biophys. Acta* 669: 183-192 .

Possani L.D., Martin B.M., Svendsen I. (1982) The primary structure of noxiustoxin: A K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman (1982) *Carls. Res. Comun.* 4: 285-289.

Possani L.D. (1983) Las toxinas del veneno de alacranes: Estructura y función *Bol.Ins. Med.Biol.Méx. Suplemento* 32: 285-297.

Possani L.D., Structure of scorpion toxin (1984). *Handbook of natural toxins vol.2 Insect,poisonn,allergens and other invertebate venom* Cap. 15.Marcel Dekker Inc. New York and Basel.

Prestipino G., Valdivia H.H., Liévano A., Dárzon A., Ramirez A.N. and Possani L.D.(1989) Purification and reconstitution of potassium channel from squid axon membranes. *FEBS* 250 : 570-574

Ramírez A.N., Gurroía G.B., Martín B.M., and Possani L.D. (1988) Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* 26: 773-783.

Rehm H. (1991) Molecular aspect of neural voltage-dependent K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 202: 701-713.

Rochat H., Bernard P., Couraud F. (1979) Scorpion toxins: Chemistry and mode of action. *Advan. cytoph.* 3: 325-334.

Schweitz H., Stansfeld C.E., Bidard J., Fragni L., Maes P. and Lazdunski M. (1989) Charybdotoxin blocks dendrotoxin-sensitive voltage-activated K⁺ channels. *FEBS lett.* 250: 519-522.

Sitges M., Possani L.D., Bayon A. (1986) Neurotoxin, a short-chain toxin from the Mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K⁺ permeability. *J. Neurosci.* 6(6): 1570-1574.

Tyson H. (1992) Relationships between amino acid sequence determined through optimum alignments, clustering and esteric distance patterns: application to a group of scorpion toxins. *Genom.* 35: 360-371.

Vaca L., Gurrola G.B., Possani L.D. and Kunze D.L. (1993) Blockade of K_{Ca} channel with synthetic peptides from noxiustoxin: a K⁺ channel blocker. *J. Memb. Biol.* 134: 123-129.

Valdivia H.H., Smith J.S., Martin B.M., Coronado R. and Possani L.D. (1988) Charybdotoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the K⁺(Ca²⁺) channel. *FEB* 226: 280-284.

Valdivia H.H., Martin B.M., Escobar L. and Possani L.D. (1992) Noxiustoxin and leiorustoxin III, two homologous peptide toxins with binding properties to synaptosomal membrane K⁺ channels. *J. Neurosci.* 12: 953-962.

Vázquez A., Becerril B., Martin B.M., Zamudio F., Bolívar F. and Possani L.D. (1993) Primary structure determination and cloning of the cDNA encoding toxin 4 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *FEBS* 320: 43-46.

Vázquez J., Feigenbaum P., King F.V., Kaczorowski G.J. and García M.L.(1990) Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265: 15564-15571

Zhao B., Carson M., Ealick S.E., and Bugg E. (1992) Structure of scorpion toxin variant-3 at 1-2A°. *J.Mol. Biol.* 227: 239-252.

Zamudio F., Saavedra R., Martín B.M., Gurrola G.B., Heri6n P. and Possani L.D. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *FEBS* 204 281: 292.

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