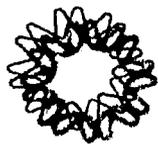


00550
11



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



Plegamiento *in vitro* de una Toxina Sintética de Araña

TESIS

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias

PRESENTA

Q. Deyanira Fuentes Silva

Director de tesis:

Dr. Alejandro Alagón Cano.

Asesor

Dr. George V. Odell

Cuernavaca, Mor. 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

UNAM a la Dirección General de Bibliotecas
contiene en formato electrónico e impreso en
trabajo de impresión
NOMBRE: Deyanira Fuentes Silva
FECHA: febrero 12 de 2003
FIRMA: [Firma]



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

...A ti, por elegir experimentar nuevamente...

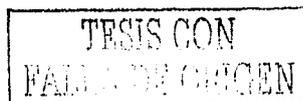
*...a Sonia Rojas, con todo mi cariño ...
Porque siendo lo que es, y lo que no...
Sera a través del tiempo y la distancia
una bella coincidencia en mi camino de
vida... Gracias Sonia.*

*y quienes representan un motivo en mi vida: Mamá, Papá,
mi hermano Abel, mis sobrinas María José y Nicole Fuentes.
A y mi querida prima Sonia María Vanegas O.*

TESIS CON
FUELE DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología por la oportunidad de ingreso.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo financiero mediante el proyecto Z-005
- Al Dr. Alejandro Alagón Cano, mi sincera admiración, gratitud, y cariño por su generosidad al brindarme la oportunidad de concluir esta maestría, por su calidad como director y un buen ejemplo de profesionalismo.
- Al Dr. George Odell, por su amistad y por transmitir las enseñanzas que el tiempo concede sólo a personas privilegiadas.
- A los miembros integrantes del jurado:
 - Dr. Alejandro Alagón cano
 - Dra. Alejandra Hernández Santoyo
 - Dr. George V. Odell
 - Dr. Lourival D. Possani P.
 - Dr. Fernando Zamudio
- A la Dra. Adela Rodríguez Romero y el Dr. Lorenzo Segovia Forchela, miembros del Comité Tutorial, por su apoyo, consejo y estímulo a lo largo de mi trabajo previo.
- Al Dr. Abel Moreno del Instituto de Química, mi sincera gratitud por ser mi guía en México, por su invaluable ayuda y la confianza que desde un principio depositó en mí.
- Al Dr. Baltazar Becerril Lujan, por su ayuda, consejos y estímulos.
- Dr. Enzo Wanke y el Dr. Lourival Possani, por su colaboración y el interés en el presente trabajo.
- Al Dr. Marcos Antonio Ramos Ibarra y Dra. Rosana Sánchez, por su ayuda y amistad
- A la Dra. Rosa María Uribe por su atenta y gentil colaboración.
- A la Dra. Martha Eugenia Ramírez, por su gentil disposición y colaboración para mis consultas.
- Dr. Cesar Ferreira Batista por los análisis iniciales de ES-MS, en la búsqueda de la toxina GrTx1 (Lab. Dr. Possani).
- Al Dr. Steve Hartson por algunos análisis de MALDI-TOF.



- A la Dra. Beatriz Palmeros, por su guía, ayuda y amistad.
- A todos los técnicos de los diferentes laboratorios en los que me apoyé para realizar algunos experimentos, por su disposición y el espíritu de colaboración que en ellos existe.

Técnico Académico Biol. Felipe Olvera Rodriguez (Lab. Dr. A. Alagón)

Técnico Acaémico M.C. Carlos González Juarez (Lab. Dr. A. Alagón)

Técnico Académico Biol. Sonia Rojas Trejo (Lab. Dr. E. Horjales)

Técnico Académico QFB. Myriam Ortiz Garcia (Planta Piloto)

Técnico Académico T.L. Fernando Gonzalez Munoz (Lab. Dr. A. López-Muguia)

Técnico Académico M.B. Jose Raunel Tinoco Valencia (Lab. Dr. R. Vázquez)

Técnico Académico M.C. Eugenio Lopez Bustos (U. de Síntesis y Secuenciación)

Técnico Académico Q.I. Santiago Becerra (U. de Síntesis y Secuenciación)

Q. Jorge Yañez (U. de Síntesis y Secuenciación)

Técnico Académico M.B. Timoteo Olamendi Portugal (Lab. Dr. L. Possani)

Biol. Cipriano Balderas (Lab. Dr. L. Possani)

Técnico Académico Dr. Fernando Zamudio (Lab. Dr. L. Possani)

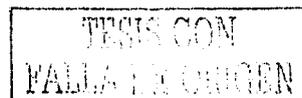
Técnico Académico B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth (Biblioteca)

Al Jefe de la Unidad de síntesis de Oligonucleótidos, Dr. Ruben Paul Gaytan por colaboración y grata amistad.

Al Ingeniero Jalil Saab, Gloria Villa Herrera y Maribel Velasco Rodriguez de la Unidad de Docencia por su amistad y recíproco aprecio.

Y mil gracias a Mayela Dingler por todo el apoyo recibido de su parte.

A Nelly y Graciela, quienes por mucho tiempo han cuidado y velado por mí. Con gran cariño y aprecio a Leonor Yamile Vargas, por la verdadera amistad que nos une. A Delia C. Burgos Dávila, quien siempre querré y recordaré con mucho cariño; a Rosita y Sonia, a quienes quiero mucho; al Dr. Jaime Pradilla Sorzano, Dr. Guillermo González Sierra y Dr. Edgar Páez Mozo, gracias por las enseñanzas; a las Dras. Martha Eugenia Niño y Luz amparo Lozano, por su amistad y confianza; a mi gran amiga Diana Fuentes Fonseca; a Araceli Sánchez, por todos los momentos compartidos y ser más que una amiga; a Lidia Riaño Umbarila, por esos buenos y malos momentos compartidos que acrecentaron la amistad que nos une; a Humberto Flores, por lo grata, divertida y fabulosa que ha sido su amistad; a Rita Restano, por su colaboración y ayuda; a Santiago Becerra y Jorge Yanez por la amistad sincera que me profesaron y los divertidos momentos compartido; a Montserrat Orenco por esa maravillosa amistad que me brindó; A Luis Ledesma, por su



amistad y ayuda; a Myriam Ortiz y Rosario Colin, por la amistad que me brindaron; a Laura Moreno por su fraternal amistad; a Tere Hernández y Mary Carmen Ramírez, por la sincera y hermosa sencillez de nuestra amistad ; a Lorena Chiu, por la confianza brindada; a Juditita y Herlinda por todos aquellos momentos que comparten los buenos amigos.

A los integrantes del Laboratorio: Dr. Alejandro Alagón, Dr. George Odell, Judith Sánchez, Herlinda Catalina Clement, M en C. Carlos González, Dra. Rosana Sánchez, Felipe Olvera, Olegaria Benitez, Alejandro Saucedo, Erwin Martí, Angélica Linares, Blanca Ramos, Milena Salgado, Mónica Prud'homme, Andrés Saralegui, Ricardo Modragón, Ricardo Sánchez, Alejandro Olvera y el Dr. Roberto Stock.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

...A ti, por elegir experimentar nuevamente...

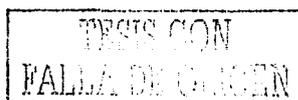
*...a Sonia Rojas, con todo mi cariño ...
Porque siendo lo que es, y lo que no...
Sera a través del tiempo y la distancia
una bella coincidencia en mi camino de
vida... Gracias Sonia.*

*y quienes representan un motivo en mi vida: Mamá, Papá,
mi hermano Abel, mis sobrinas María José y Nicole Fuentes.
A y mi querida prima Sonia María Vanegas O.*

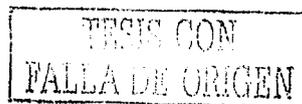
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
II.1 Generalidades	3
II.2 Morfología de las arañas	6
II.3 Principales tarántulas venenosas	7
II.4 Veneno de arañas	10
II.4.1 Composición del veneno de araña	10
II.4.1.1 Componentes orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular	10
II.4.1.2 Polipéptidos	15
II.4.1.3 Proteínas	18
II.5 Estructura de las toxinas peptídicas de arañas	19
II.6 Plegamiento <i>in vitro</i> de proteínas	22
III. ANTECEDENTES	28
IV. OBJETIVOS	29
IV.1 Objetivo general	29
IV.2 Objetivos específicos	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
V.1 Caracterización del material de síntesis de la toxina GrTx1	29
V.1.1 Reactivos	30
V.1.2 Reducción y purificación de la toxina sintética	30
V.1.3 Determinación de grupos sulfhidrilos	30
V.2 Caracterización del veneno de <i>G. rosea</i> y purificación de la toxina GrTx1	31
V.2.1 Obtención del veneno	31
V.2.2 Separación del veneno de <i>G. rosea</i> por cromatografía de exclusión molecular	30
V.2.3 Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida-SDS	32
V.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (rp-HPLC)	32
V.2.5 Determinación de la estructura primaria	32
V.2.6 Determinación de la masa molecular	32
V.2.7 Determinación del enlace disulfuro C2-C5 de la toxina GrTx1	33
V.3 Plegamiento <i>in vitro</i>	33
V.4 Ensayos de actividad	34
V.4.1 Ensayos <i>in vivo</i>	34
V.4.2 Ensayos electrofisiológicos	34



V.5	Análisis de la estructura primaria y terciaria de GrTx1	35
V.5.1	Alineamiento de secuencias	35
V.5.2	Construcción del modelo tridimensional de GrTx1	36
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
VI.1	Caracterización de la toxina GrTx1 sintética	37
VI.1.1	Reducción y purificación de la toxina sintética	38
VI.2	Caracterización del veneno de <i>G. rosea</i> y purificación de la toxina GrTx1 nativa	39
VI.2.1	Obtención del veneno	39
VI.2.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del veneno de <i>G. rosea</i>	40
VI.2.3	Separación del veneno por cromatografía de exclusión molecular	41
VI.2.4	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (r-HPLC)	44
VI.2.5	Determinación de la estructura primaria y peso molecular de la toxina GrTx1 nativa	49
VI.2.6	Determinación del enlace disulfuro C2-C5 de la toxina GrTx1 nativa	49
VI.3	Plegamiento <i>in vitro</i>	52
VI.4	Ensayos de actividad	56
VI.4.1	Ensayos de actividad <i>in vivo</i>	56
VI.4.2	Efecto de la toxina plegada sobre canales de sodio y canales de potasio tipo Erg	57
VI.4.3	Efecto de las fracciones I-VI del veneno de <i>G. rosea</i> sobre canales de sodio y canales de potasio tipo Erg.	59
VI.5	Análisis de la estructura primaria y terciaria de GrTx1	59
VI.5.1	Homología de secuencia de toxinas de la familia <i>Theraphosidae</i>	59
VI.5.2	Análisis de secuencias	61
VI.4.3	Modelo estructural de la toxina GrTx1	65
VI	CONCLUSIONES	69
VII	BIBLIOGRAFIA	71



ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1. Especie <i>Liphistius</i> de Tailandia	4
2. Cladograma de los principales grupos monofiléticos de las Arañas	5
3. Morfología general de las arañas	6
4. Fotografías de tres especies diferentes de araña	9
5. Estructura general de las acilpoliaminas	12
6. Estructura general de acilpoliaminas aisladas del género <i>Nephila</i>	13
7. Estructura de algunas poliaminas endógenas de Arañas	14
8. Diagrama esquemático del nudo de cistina inhibitorio	20
9. Alineamiento de varias secuencias polipeptídicas representativas que adoptan la topología del motivo ICK	21
10. Diagrama esquemático de rutas de plegamiento desde un estado reducido hasta un estado nativo	24
11. Ruta hipotética del plegamiento de una proteína con seis residuos de cisteína	26
12. Etapas de formación de un enlace disulfuro empleando un agente redox con disulfuro intermolecular, RSSR	27
13. Gel de poli(acrilamida)-SDS al 15 % del material de síntesis de la toxina GrTx1	37
14. Rp-HPLC del material de síntesis de GrTx1	38
15. Espectro de masas de la toxina sintética GrTx1 reducida	39
16. Gel de poli(acrilamida)-SDS al 15 % de veneno crudo de la tarántula <i>G. rosea</i>	41
17. Perfil cromatográfico de la elución por exclusión molecular del veneno de <i>G. rosea</i>	42
18. Gel de poli(acrilamida)-SDS de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular del veneno de <i>G. rosea</i>	43
19. Perfil cromatográfico por rp-HPLC de las fracciones III y IV	45
20. Perfil cromatográfico por rp-HPLC de la fracción V	45
21. Perfil de la elución cromatográfica por rp-HPLC de veneno crudo de <i>G. rosea</i>	46
22. Perfil rp-HPLC de la fracción VI, registrado simultáneamente a 230, 260 y 280 nm	47
23. Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF de la toxina nativa GrTx1 y de la toxina GrTx1 completamente reducida	49
24. rp-HPLC de la digestión enzimática de GrTx1	50
25. Cinética de plegamiento	53

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

26.	Espectro de masas de la toxina sintética plegada	54
27.	Coelución de las formas plegadas y reducidas de la toxina sintética y la toxina nativa	54
28.	Registros de las corrientes de sodio y potasio tipo Erg de la toxina nativa GrTx1	57
29.	Registros de las corrientes de sodio y potasio tipo Erg de la toxina sintética GrTx1 plegada <i>in vitro</i>	58
30.	Histograma de inhibición sobre corrientes de sodio y potasio de las fracciones II, III, IV y VI del veneno de <i>G. rosea</i> .	59
31.	Alineamiento de secuencia de toxinas pertenecientes a tarántulas de la familia <i>Theraphosidae</i> con similar estructura y modo de acción conocida.	62
32.	Arbol filogenético de las toxinas de la familia <i>Theraphosidae</i>	64
33.	Secuencias de toxinas homólogas a GrTx1 que actúa sobre canales de potasio	65
34.	Comparación de la superficie del modelo estructural de GrTx1 con GsMTx2	66
35.	Comparación de la estructura de GrTx1 con estructuras que adoptan la topología del ICK	67

TEXIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>	
Tabla I.	Constantes determinadas para GrTx1 a partir de su secuencia de aminoácidos usando el programa ProtParam tool	39
Tabla II.	Recuperación obtenida en la separación cromatográfica del veneno	44
Tabla III.	Tabulación de masas moleculares observadas por MALDI-TOF para algunos picos de la fracción V	48
Tabla IV.	Condiciones ensayadas para la optimización del plegamiento <i>in vitro</i> de GrTX1	52
Tabla V.	Efecto dosis-respuesta de la toxina GrtX1 nativa y plegada sintética sobre grillos	57

ABREVIACIONES

ADP	Difosfato de adenosina (Adenosine diphosphate)
AMP	Monofosfato de adenosina (Adenosine monophosphate)
Arg	Arginina
ATP	Trifosfato de adenosina (Adenosine triphosphate)
DTT	Ditiotreitol
4-DTDP	4,4 -ditiopiridina
EDTA	Acido etilendiaminetetracético (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	Acido etilenglicoltetracético (Ethylene glycol-bis-(β -aminoethylether) N,N,N',N'- tetraacetic acid.
GABA	Aminoácido Gamma aminobutírico
GSH	Glutation reducido (γ -Glutamylcisteinilglicina)
GSSG	Glutation oxidado
GuCl	Cloruro de guanidinio
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
ICK	Nudo inhibitorio de cistina (Inhibitor cistine knot)
MBP	Proteina de unión a maltosa (Maltose-binding protein)
MES	2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid.
Tris	Hydroxymethyl-aminomethane

TEMA CON
FALLA DE ORIGEN

I. RESUMEN

Como otros venenos, los venenos de arañas son mezclas complejas, con una variedad de componentes de naturaleza proteica y no proteica, los cuales incluyen proteínas, componentes orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular y una diversidad de péptidos neurotóxicos que actúan a nivel de canales iónicos.

En este trabajo se realizó el plegamiento *in vitro* de la toxina GrTx1 sintética en buffer conteniendo una mezcla de GSH/GSSG; la eficiencia obtenida en la reacción de plegamiento fue del 45 %. Para fines comparativos, se purificó del veneno de la tarántula *Grammostola rosea* (o *Phrixotrichus auratus*), la toxina GrTx1 nativa utilizando cromatografía de exclusión molecular y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. La secuencia de aminoácidos de GrTx1 YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKKKIEW se corroboró directamente por degradación de Edman y la masa molecular de 3979.6 Da, determinada por espectrometría de masas, coincidió con la deducida de la secuencia.

A nivel de estructura primaria, GrTx1 conserva el motivo de cisteínas análogo a otras toxinas de araña y caracoles marinos, y presenta identidad de secuencia con las toxinas GsMTx2 (87.1%), GsSeq1 (79.3%) de la especie *G. spatulata* y HwTx-1 (34.5%) de la especie *S. huwena*. La presencia de seis cisteínas en la secuencia sugirió la existencia de 3 puentes disulfuros, los cuales fueron demostrados por espectrometría de masas después de la reducción de la toxina nativa con ditiotreitól.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Se investigó la actividad de GrTx1 sobre canales de sodio en células de rhabdomyosarcoma humano y canales de potasio tipo Erg empleando células de un hibridoma de neuroblastoma murino fusionadas con células de ganglio dorsal de ratón. A dosis de 5 $\mu\text{g/ml}$ (1.2 μM), GrTx1 bloquea reversiblemente el 40% de las corrientes de sodio y a dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ (4.8 μM) bloquea en un 90% las corrientes de potasio tipo Erg.

Este resultado constituye una novedad, ya que es el primer reporte de una toxina peptídica de araña que bloquea canales de potasio tipo Erg y también canales de sodio; otras toxinas de araña reportadas han mostrado, principalmente actividad sobre otros canales de potasio del tipo voltaje dependiente y mecanosensibles.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Generalidades

Las arañas pertenecen al orden *Aranea*, una de las principales divisiones de la clase *Arachnida*. Más de 40.000 especies han sido descritas y probablemente muchas más permanecen aún sin ser identificadas (Escoubas *et al.*, 2000). Muy pocas especies de arañas son realmente venenosas y representan un verdadero riesgo para el hombre.

El término tarántula, otorgado al orden *Mygalomorphae*, apareció en la literatura para describir a la araña de la región italiana de Taranto, *Lycosa tarentula*, en donde su picadura habría ocasionado crisis semejantes a las de la epilepsia, siendo el único remedio para éstas, los bailes frenéticos de las tarantelas que los aldeanos practicaban colectivamente y que "curaban" a las víctimas. En realidad la tarantela fue una excusa para organizar bailes debido a imposiciones de la iglesia católica en limitar este tipo de actos.

La principal característica que diferencia a las tarántulas de las arañas verdaderas es la disposición de sus quelíceros. En las primeras, éstos se mueven paralelamente respecto al eje de su cuerpo, mientras que en las arañas verdaderas se mueven de manera perpendicular (Marshall, 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las arañas son animales antiquísimos; los primeros fósiles de arácnidos se remontan al periodo Devónico, hace aproximadamente cuatrocientos millones de años. Las primeras arañas fueron segmentadas, similares al suborden *Mesothelae* (*Liphistiidae*) que vive actualmente y por cuya razón se les refiere frecuentemente como "Fósiles viviente", (Fig. 1). Vestigios de esta segmentación abdominal también se halla claramente presente en familias como *Hypochilidae* así como en varias arañas *Mygalomorphae* de la familia *Antrodiaetidae*. No obstante, se conoce con poca precisión los ancestros de las arañas. Como el resto de los artrópodos, proceden posiblemente de gusanos marinos metamerizados, es decir, constituidos por una serie de segmentos iguales que se repiten varios números de veces (Masiac, 1996). Estas criaturas son tres veces más antiguas que los dinosaurios y al compararlás con los primeros hombres, cuya aparición se remonta a sólo hace dos millones de años, tendremos que constatar que son al menos, cien veces más antiguas que nosotros.



Figura 1. Especies *Liphistius* de Tailya en donde se puede apreciar la segmentación externa del opistosoma

En cuanto a la clasificaci n de las arañas, existen muchos desacuerdos especialmente con la posici n de la *Mesothelae*. Autores como Millot en 1947 y Glatz en 1973 las agrupan con las tar ntulas dentro del suborden *Mygalomorphae* (*Orthognatha*). Otros, como Platnick (1973), asignan a las *Mesothelae* en una posici n m s aislada pero consideradas como grupo hermano de todas las arañas recientes las cuales clasifica dentro del suborden *Opisthothelae*. En muchos sistemas de clasificaci n, el rden *Araneae* est dividido en tres sub rdenes de igual rango: *Mesothelae*, *Mygalomorphae* (*Orthognatha*) y *Araneomorphae* (*Labidognatha*) (Bristowe, 1999).

El orden *Mesothelae* (*Liphistius*) comprende 40 especies incluidas en una familia, el *Mygalomorphae* abarca 2,200 especies distribuidas dentro de 15 familias y el suborden *Araneomorphae*, referido como "arañas verdaderas", engloba 32,000 especies incluidos en 90 familias (Fig. 2).

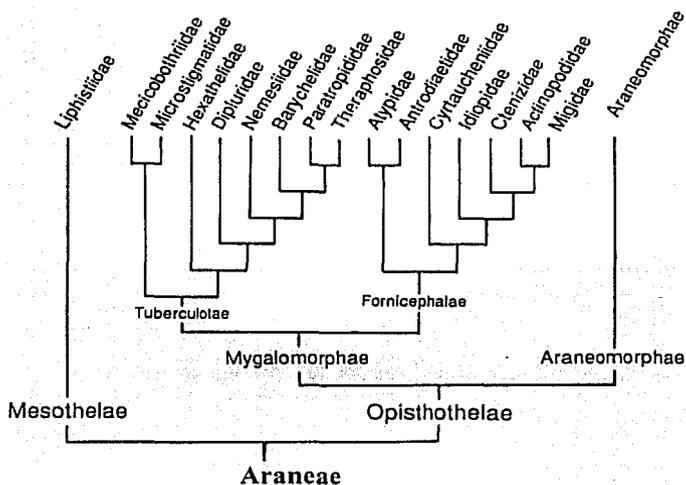


Figura2. Cladograma de los principales grupos monofil ticos de las arañas: *Mesothelae*, *Mygalomorphae* y *Araneomorphae*. La figura s lo presenta las familias de las *Mygalomorphae*.

II.2 Morfología de las arañas

Estructura general. Las arañas tienen el cuerpo dividido en dos partes: el cefalotórax (o Prosoma) y unido a este, por un estrecho pedúnculo, se encuentra el abdomen (u Opistosoma). En general, y a pesar de las diferencias de tamaño, color y forma, la estructura de las arañas es bastante homogénea (Foelix, 1996; Schultz y Schultz, 1998; Rankin, 2000). En el cefalotórax se encuentran los queleros, que son los ganchos encargados de inyectar el veneno producido por las glándulas situadas en la base de estos. Estas últimas, se encuentran enrolladas por un músculo en forma de espiral que se contrae en el momento de la mordedura expulsando el veneno, el cual se desplaza a lo largo de un conducto que recorre el centro del quelero y desemboca un poco antes de llegar a la punta. La estructura de la glándula consta de la capa muscular, capa secretora y conducto glicular. Además de los queleros y de las glándulas venenosas, en el cefalotórax se encuentran cuatro pares de patas constituidas por los artejos, partiendo del cuerpo, cadera, trocánter, fémur, rótula, tibia, metatarso y tarso, acabando en dos o tres garras. Cerca del orificio de la boca se encuentra un par de apéndices denominados palpos, los cuales están provistos de estructuras con sensibilidad química. Los palpos, en los machos, presentan los bulbos copuladores, una especie de jeringuillas destinadas a la fecundación (Fig. 3).

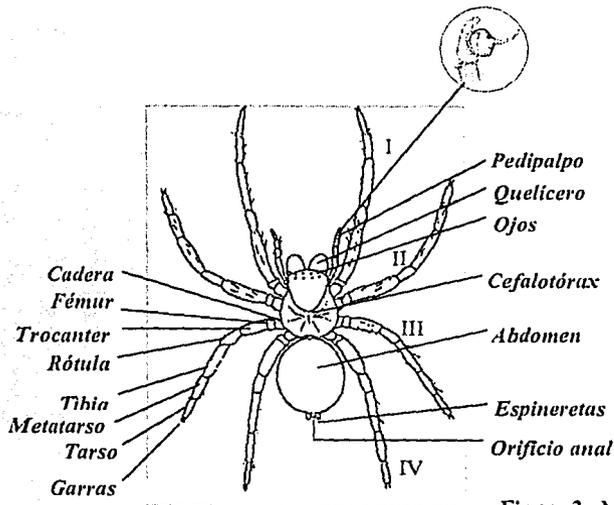


Figura 3. Morfología general de las arañas.

II.3. Principales tarantulas venenosas.

Las *Mygalomorphae* o tarantulas se han identificado dentro de las arañas más antiguas e incluyen más de 1000 especies. Se han encontrado tarantulas notablemente venenosas en la familia *Ctenizidae*, *Dipluridae*, *Theraphosidae* y *Barychelidae*.

La familia *Ctenizida* cuenta con muchas especies distribuidas ampliamente en la tierra, y representan la familia de arañas del suborden *Mygalomorpha* principalmente hallado en Europa y el Mediterráneo; raramente se encuentran en zonas tropicales. De las pocas especies estudiadas (*Cteniza*, *Actinopus*, *Idiops*, *Pselligmus* y *Hermacha*), se ha deducido que su veneno posee escasa acción neurotóxica en vertebrados y no tiene efecto necrótico (Geren y Odell, 1984). Una especie altamente tóxica dentro de esta familia es la araña brasileña *Phoneutria nigriventer* (Fig. 4b), cuyo veneno produce la liberación masiva de neurotransmisores por acción sobre los canales de sodio de la membrana de las terminales nerviosas. Por su parte, la familia *Dipluridae*, la menor en número de especies se encuentra en el sureste del hemisferio y las regiones australianas. El género más importante, por razones múltiples, es *Atrax*. La especie *A. robustus* (Fig. 4c) es considerada la tarantula más peligrosa debido a su agresividad y letalidad del veneno para el hombre, con 14 muertes registradas (Sheumack *et al.*, 1983). Su veneno induce la liberación masiva de neurotransmisores en las terminales nerviosas del sistema nervioso autónomo ocasionando fallas respiratorias, circulatorias y la muerte. La neurotoxina letal de este veneno es la robustoxina, un polipéptido de 42 aminoácidos (Pallaghy *et al.*, 1997). Otro género de esta familia es la araña *Trechona*, distribuida en Suramérica y cuyo veneno también es letal para humanos. *Macrothela holsti* es otra especie muy parecida a *Atrax* distribuida desde el sur de Japón hasta Formosa.

La familia *Barychelidae* incluye un poco más de 100 especies; casi todas ellas se encuentran en el hemisferio sur. El género más importante es la *Harpactirella*, en Suráfrica y Australia. Las *Harpactirella* son pequeñas tarantulas comúnmente llamadas Arañas Baboon. Se han descrito dos casos de envenenamiento humano por *Harpactirella*

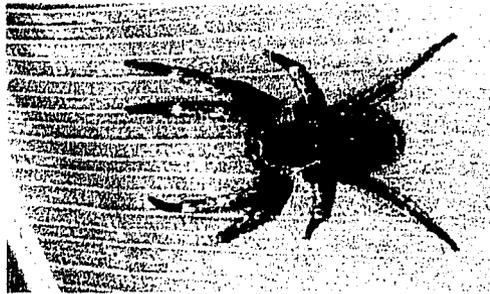
lightfooti. Dentro de las *Mygalomorphae*, la familia *Theraphosidae* es la mayor en número y tamaño. Comparten junto con la familia *Hexatelidae*, el mayor número de registros de secuencias depositados en la base del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Muchas de estas especies son diles y raramente muerden cuyo son molestadas .

Algunos géneros presentan en la parte superior de su abdomen una región particular de pelos urticantes. Estos pelos son típicamente llamados *Setae*, y son proyecciones de la cutícula. Los pelos de géneros como *Grammostola* y *Lasiadora*, pueden causar inflamación del sistema respiratorio y subsecuente asfixia en roedores pequeños (Ori, 1984). Las especies orientales *Selenocosmia* causan espasmo muscular en humanos. Dentro de ellas, el veneno de la especie reciente identificada *Selenocosmia huwena* fue neurotóxico para ratones. De este veneno se aislaron y caracterizaron estructuralmente dos péptidos neurotóxicos, Huwetoxina-I (Liang *et al.*, 1993; Zhang y Liang, 1993 ; Qu *et al.*, 1997) identificada como el principal componente, y Huwetoxina-II (Shu y Liang, 1999; Shu *et al.*, 2002). Otros de los venenos considerablemente tóxico para los humanos son de las especies *Sericopelma* y *Pterinochilus*. La mordedura de las especies *Aphonopelma* y *Dugesiella*, aunque poco tóxica para humanos, causan alteraciones locales como edema y dolor. Otra de las especies *Theraphosidae* altamente agresivas y cuyo veneno es comparable al veneno de la araña brasileña *Phoneutria nigriventer* o araña platanera es la especie africana *Scodra griseipes* estudiada recientemente (Marvin *et al.*, 1999).

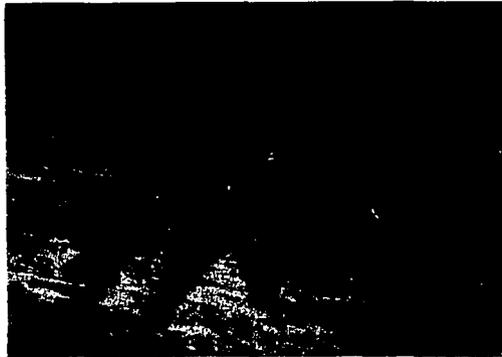
Como conclusión de lo precedente, con la excepción de las especies nombradas anteriormente, la mayoría de las arañas son por naturaleza no agresivas e inofensivas para el hombre. Cuyo una araña muere generalmente es por accidente y/o en defensa propia.



a)



b)



c)

Figura 4. Fotografías de las especies: a) *Brachypelma smithii* (Theraphosidae), b) *Phoneutria nigriventer* (Ctenizidae) y c) *Atrax robustus* (Dipluridae)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II.4 Veneno de arañas.

En general, el veneno de las arañas y específicamente el de tarántulas, es un líquido incoloro, soluble en agua y con pH neutro o alcalino, aunque algunos como los de las especies *Atrax robustus*, *Aphonopelma hentzie* y *Euripelma californicum* son ácidos con pHs de 4.5 a 5.5 (Savel-Niemann, A., 1989).

El primer propósito del veneno de las arañas es paralizar o matar a su presa, aunque puede también jugar un papel importante en la predigestión de su alimento o a como mecanismo de defensa contra sus depredadores.

Los venenos, representan una increíble fuente de sustancias biológicamente activas, las cuales son selectivas para una variedad de funciones fisiológicas vitales de insectos y mamíferos. Muchas de estas toxinas aisladas han sido de invaluable ayuda para determinar el papel y la diversidad de los canales iónicos presentes a nivel de neuronas y en el proceso de exocitosis (Bernard *et al.*, 2000; Ertel *et al.*, 1994; Rash y Hodgson, 2002). Por ello, desde décadas pasadas, se ha incrementado enormemente el estudio del veneno de muchos animales, particularmente el de alacranes y arañas (García *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 1993).

II.4.1 Composición del veneno de araña.

El veneno de araña es una mezcla compleja, constituida por tres clases de componentes principales: moléculas orgánicas e inorgánicas de bajo peso molecular, polipéptidos y proteínas de alto peso molecular (Escoubas *et al.*, 2000^a; 2000^b)

II.4.1.1 Componentes orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular.

En el veneno de las araña se han identificado varios componentes de bajo peso molecular, entre los cuales figuran iones como calcio, sodio, potasio, magnesio, cloruro y fósforo; además de ácido cítrico, láctico, fosfórico y dihidrofenilacético, alguno de los cuales podría estabilizar a los péptidos y las enzimas presentes en el veneno.

El ácido cítrico en particular se halla a altas concentraciones en el veneno de las especies *A. robustus*, *G. cala* y la araña *L. reclusa*; así como también en venenos de serpiente, abeja, avispa, alacrán y hormiga (Fenton *et al.*, 1995). Conforme a otros sistemas biológicos, la función del citrato en el veneno de arañas ha sido parcialmente establecida como quelante de iones metálicos divalentes, fuente de energía, anticoagulante y amortiguador de pH. Como amortiguador, el citrato serviría como un contra-ión negativo para los péptidos básicos y las acilpoliaminas y como anticoagulante podría facilitar el movimiento del veneno desde el sitio de la mordedura o picadura (Odell *et al.*, 1999; Fenton *et al.*, 1995). Empero a todo lo anterior, la función de éste componente no ha sido claramente establecida. En el veneno de arañas también se han detectado una amplia variedad de aminoácidos libres, los cuales incluyen glicina, serina, treonina, lisina, glutamina, alanina, arginina, asparagina, leucina e histidina. Se han encontrado en varios venenos de *Mygalomorphae*, los aminoácidos neurotransmisores γ -aminobutírico (GABA), ácido glutámico y ácido aspártico. El aminoácido taurina se encontró presente a alta concentración en el veneno de *C. salei*, determinándose posteriormente que su presencia en la hemolinfa de insectos incrementa notablemente la sensibilidad del insecto por la toxina peptídica CSTX-1 de esta especie (Kunh-Nentwing *et al.*, 2002).

En arañas suramericanas y en tarántulas como *D. hentzi* y *E. californicum* se ha reportado la presencia de serotonina, histamina, AMP, ADP y ATP, éste último como el nucleótido de mayor concentración. El ATP ha demostrado tener un efecto sinérgico sobre la toxicidad de neurotoxinas del veneno de *D. hentzi* en ratones, con un contenido de 28.1 μg de ATP por microlitro (Savel-Niemann, 1989).

El papel funcional de todos estos constituyentes es desconocido, aún cuando algunos de ellos potencian la acción de neurotoxinas, y pudieran representar productos de degradación de otros constituyentes del veneno como resultado del proceso de colecta (Ori y Ikeda, 1998).

Dentro de los componentes de bajo peso molecular figuran también las acilpoliaminas, las cuales constituyen el segundo arsenal tóxico del veneno de tarántulas. Estos componentes, son policationes orgánicos que están protonados a pH fisiológico y potencialmente pueden interactuar con una variedad de dianas celulares como ácidos nucleicos y proteínas (Williams, 1997). En años recientes se han reportado interacciones específicas de las acilpoliaminas con un número de diferentes tipos de canales iónicos como canales de potasio y receptores de glutamato (Oliver *et al.*, 2000; Usherwood y Blagrough, 1991). La presencia de las acilpoliaminas se detectó por primera vez cuyo Fisher y Bohn, en 1957, identificaron la espermina y trimetilendiamina en el veneno de la tarántula suramericana *Pamphobeteus tetracanthus* (Cabbines *et al.*, 1980). Posteriormente, en 1982, se aisló de la especie japonesa *Nephila clavata*, la toxina JSTX (Fig. 5), de aproximadamente 600 daltones, la cual actúa postsinápticamente bloqueando los receptores de glutamato en la sinapsis neuromuscular de crustáceos (Hisada *et al.*, 1998). Desde entonces, un número de acilpoliaminas similares se han detectado en todo el género *Nephila*, las cuales han sido clasificadas en cinco estructuras generales desde el tipo A al tipo E; de acuerdo a su esqueleto de carbono.

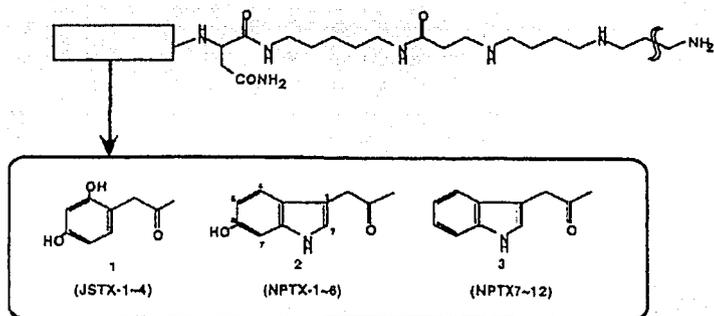
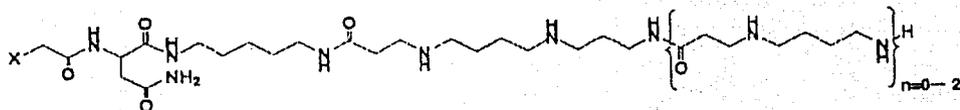


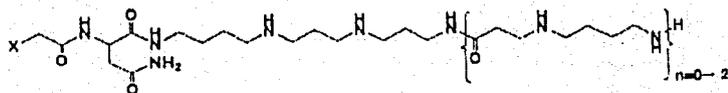
Figura 5. Estructura general de las acilpoliaminas

Todos los tipos del A al E contienen una mitad hidrofóbica y otra mitad hidrofílica (Fig. 6). La mitad hidrofóbica está compuesta de un ácido carboxílico aromático tal como el ácido benzoico mono o dihidroxiacetilado o un derivado del ácido indolacético. La mitad hidrofílica contiene de una a nueve unidades aminopropil, aminobutil o aminopentil, algunas veces metilados o hidroxilados. Al extremo de estas cadenas puede adicionarse una arginina o putreanina (ácido N-(4-aminobutil)-3-aminopropiónico). Cuyo el extremo es una putreanina, se pueden formar una serie de acilpoliaminas análogas por la adición sucesiva de múltiples unidades de putreanina. En el caso de ser arginina el extremo terminal, no se extiende la longitud de la cadena (Hisada *et al.*, 1998).

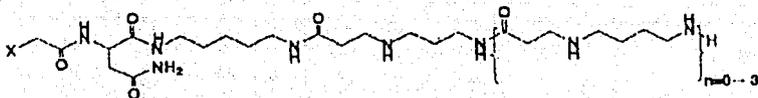
Tipo A



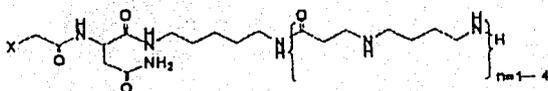
Tipo B



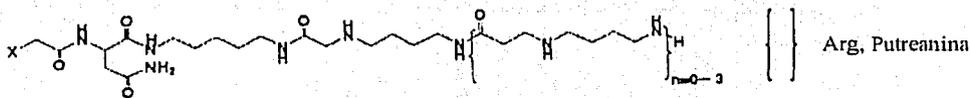
Tipo C



Tipo D



Tipo E



X: 4-hidroxindol, derivado de ácido benzoico.

Figura 6. Estructura general de las acilpoliaminas aisladas del género *Nephila*

Otras toxinas estrechamente parecidas a las nefilatoxinas, son las argiotoxinas aisladas del género *Argiope* (Fig. 7). Argiotoxina-636 (AgTX-636) bloquea la transmisión sináptica mediada por glutamato (McCormick y Meinwald, 1993).

Otras acilpoliaminas presente en el veneno de las tarántulas *D. hentzie*, *A. emilia* y *Aphonopelma sp.*, fueron: espermina (N,N'-bis(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano), la poliamina principal, putrescina (1,4-diaminobutano), cadaverina (1,5-diaminopentano) y espermidina (N-(3-aminopropil)-1,4-butyamine), detectadas en menor proporción (Cabbiness *et al.*, 1980). A la espermina se le ha podido comprobar efectos nefróticos en ratones, ratas, conejos y perros. Aminas como la 5-hidroxitriptamina e histamina se han hallado en una amplia variedad de venenos y han sido asociadas con la producción de dolor.

A la luz de todos estos resultados, las acilpoliaminas obtenidas del veneno de una variedad de arañas están emergiendo rápidamente como herramientas únicas para entender la transmisión mediada por aminoácidos excitatorios y como nuevas estructuras para la investigación farmacológica y pesticida, debido a su diversidad estructural y funcional.

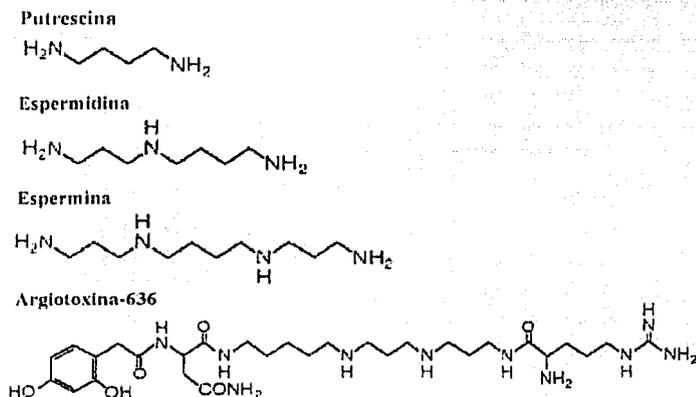


Figura 7. Estructura de algunas poliaminas endógenas de arañas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II.4.1.2 Polipéptidos.

Los componentes polipeptídicos del veneno de las arañas integran la mayoría de las toxinas aisladas hasta la fecha, y junto con las poliaminas, constituyen el principal arsenal tóxico de las arañas. Poseen pesos moleculares entre 3 y 10 kDa, con alto número en residuos de cisteína, las cuales forman puentes disulfuros intramoleculares. El número de estos puentes disulfuros puede oscilar entre 3 y 7. Estas toxinas polipeptídicas pueden clasificarse, a su vez, de acuerdo a sus características funcionales y moleculares (Escoubas *et al.*, 2000^a).

Hasta la fecha se han publicado en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), decenas de secuencias de péptidos tóxicos provenientes de diversas especies de arañas. Estas toxinas son altamente específicas a canales iónicos. Pueden bloquear la liberación de neurotransmisores afectando la exocitosis de las vesículas presinápticas e inducir modificaciones anormales de la transmisión sináptica en la parálisis flácida. Algunos péptidos pueden también provocar parálisis excitatoria como resultado de una actividad paroxística inducida por una excesiva despolarización. Además, este efecto tóxico puede ser específico para un grupo zoológico (Grishin, 1999).

Los primeros péptidos obtenidos a partir de arañas, lo constituyen las Agatoxinas, una familia de polipéptidos relacionados aislados del veneno de *Agelenopsis aperta*. Todas estas toxinas bloquean canales de calcio y sodio (Ertel *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1990; Reily *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1995; Omecinsky *et al.*, 1996). Seguido al descubrimiento de las ω -Agatoxinas, se han purificado y caracterizado una gran variedad de péptidos tóxicos del orden *Mygalomorphae* y *Araneomorphae*. Por ejemplo, del veneno de la tarántula *Grammostola spatulata* se aisló una toxina peptídica, ω -grammotoxina SIA (Lampe *et al.*, 1993), compuesta por 36 residuos de aminoácidos y tres puentes disulfuros. La ω -grammotoxina SIA bloquea los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N, P y Q (Keith *et al.*, 1995). Otras dos toxinas, altamente homólogas, aisladas de esta misma especie son Hantoxina-I, HaTx1, y Hanatoxian-II, HaTx2 (Takahashi *et al.*, 2000), las

cuales bloquean canales de potasio a concentraciones nanomolares y poseen un 40% de homología con la toxina ω -grammotoxina SIA. Recientes publicaciones han revelado que ambas toxinas pueden actuar tanto en canales de calcio como de potasio (Swartz y MacKinnon, 1995). GsMTx-4 y GsMTx-2 son dos nuevas toxinas peptídicas aisladas de *G. spatulata*, las cuales bloquean canales iónicos activados por tensión (SACs) (Suchyna *et al.*, 2000; Sachs *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2001; Oswald *et al.*, 2002). Por otra parte, ProTx-I y ProTx-II constituyen también otras dos nuevas toxinas aisladas a partir del veneno de la tarántula *Thrixopelma pruriens*, las cuales actúan inhibiendo reversiblemente las corrientes del canal de sodio tipo Na_v 1.8, resistente a tetrodotoxina. Estas dos toxinas también actúan a nivel los canales de sodio tipo Na_v 1.2, Na_v 1.5, Na_v 1.7 (Middleton *et al.*, 2002).

Un descubrimiento importante y novedoso, lo constituyó la toxina SNX482 aislada, del veneno de la tarántula *Hysteroecrate gigas*. Esta toxina, es el primer ligando para canales de calcio tipo E (Newcomb *et al.*, 1998). La función biológica de estas toxinas que actúan sobre canales de calcio, podría ser la de producir parálisis muscular de su presa por bloqueo de la entrada de calcio y el consecuente bloqueo de liberación de neurotransmisores.

Otras toxinas aisladas del veneno de arañas son: SNX325 de *Segestria florentina* (Newcomb, *et al.*, 1995); DW13.3 de *Filistata hibernalis*; Proteína-1 y Proteína-5, ambas de *Brachypelma smithii* (Kaiser *et al.*, 1994); Covalitoxina-II, de *Coremiocnemis validus*, la cual actúa sobre insectos (Ashok-Balaji *et al.*, 2000). Recientemente se ha descrito la SGTx-1, de *Scodra griseipes*, que posee la capacidad de formar poros en bicapas lipídicas más no presenta actividad antibacteriana (Marvin *et al.*, 1999); las cupieninas, una nueva familia de péptidos antimicrobianos altamente básicos, aislados del veneno de la araña *Cupiennius salei* (*Ctenidae*) (Nentwig *et al.*, 2002) y las oxyopininas, otra nueva familia de péptidos lineales y anfipáticos con actividad hemolítica y antimicrobiana aislados del veneno de la araña *Oxyopes kitabensis*. Igualmente, de este veneno se aisló la Oxytoxina 1, OxyTx1, una neurotoxina que actúa sobre insectos (Corzo *et al.*, 2002).

Como conclusión, los componentes polipeptídicos de los venenos de arañas muestran una acción específica sobre canales iónicos y receptores de membranas de células nerviosas y constituyen herramientas valiosas en investigaciones electrofisiológicas, farmacológicas y en estudios estructurales y funcionales de canales iónicos.

Ubicados en el contexto de lo que es este trabajo, la toxina nombrada como GrTx1 fue inicialmente identificada en el veneno de la tarántula chilena *Grammostola rosea* por el grupo de trabajo del Dr. Odell, un experto en el estudio del veneno de las arañas de la Universidad Estatal de Oklahoma, Stillwater, Ok. La pérdida de la información de esta toxina, conllevó a reiniciar los trabajos de su identificación, purificación y caracterización a partir del veneno crudo de la tarántula para posteriormente seguir con el trabajo del plegamiento *in vitro* de la secuencia sintética de dicha toxina; síntesis realizada por el estudiante de doctorado David Brighman.

GrTx1 es un péptido de 31 aminoácidos y masa molecular de 3979.6 Da. Su secuencia contiene un patrón de 6 cisteínas, con la cisteína 3 y la cisteína 4 continuas, semejante al patrón encontrado en las toxinas de los caracoles marinos y cuyo plegamiento se ha podido realizar *in vitro*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II.4.1.3 Proteínas.

El veneno de arañas contiene enzimas de alto peso molecular. Sin embargo, la presencia de enzimas debe ser considerada cuidadosamente ya que muchas veces puede ser el resultado de contaminación por saliva o fluidos digestivos, especialmente cuyo el veneno es obtenido por medio de estimulación eléctrica. Se ha detectado actividad de hialuronidasa tanto en *Mygalomorphaes* como en *Araneomorphaes*, ejemplo de ello son las especies *Phoneutria nigriventer*, *Lycosa raptoria* y la especie mexicana *Brachypelma vagans*, esta última estudiada en el laboratorio.

El sustrato para la hialuronidasa es el mucopolisacárido, ácido hialurónico, el cual es uno de los principales constituyentes de la matriz extracelular. (Kreill, 1995). Varios investigadores han probado que la presencia de hialuronidasa en los venenos de animales facilita la dispersión de otros componentes del veneno por la hidrólisis del tejido conectivo (Duran-Renals, 1936).

Otras actividades enzimáticas identificadas en estos venenos fueron la de fosfodiesterasa en el veneno de *A. robustus* y *A. cratus*; actividad de fosfolipasa A, en el veneno de *D. hentzie* y en la hembra de la especie *A. versutus*; actividad de péptido isomerasa en el veneno de *A. aperta*. Además de dos serina-proteasas de 85 y 95 kDa, identificadas recientemente en el veneno de *L. intermedia* (Veiga *et al.*, 2000). Dos toxinas de 22.85 y 27.704 kDa, fueron aisladas del veneno de *Filistata hibernalis* y otra toxina contra insectos, de masa molecular de 100 kDa, fue obtenida de *Phidippus audax*. En el género *Latrodectus* se han aislado una familia de neurotoxinas con masas moleculares alrededor de 130 kDa denominadas latrotoxinas, la más tóxica de ellas para vertebrados es la α -latrotoxina, cuyo efecto origina la liberación masiva de neurotransmisores causyo, a nivel somático, una rápida contractura muscular generalizada como resultado de la hiperestimulación de los receptores postsinápticos (Saibil, 2000; Henkel *et al.*, 1999; Sudhof, 2001). En insectos la más tóxica fue la α -lactroinsectotoxina y la α -lactrocrustaceotoxina que resultó toxica para el *Procambarus cubensis* o langostino de río (Grishin, E.V., 1998).

II.5 Estructura de las toxinas peptídicas de arañas.

Entre los pequeños polipéptidos entrecruzados por enlaces disulfuros se han reconocido varios plegamientos diferentes; uno que está identificado en un número creciente de toxinas e inhibidores de enzimas, es el nudo de cistina inhibitorio "ICK", siglas del nombre en inglés "Inhibitor Cystine Knot". Los polipéptidos que adoptan esta estructura provienen de diversas fuentes y presentan una variedad de funciones biológicas (Ménez *et al.*, 1992).

En términos de estructura primaria, la secuencia de aminoácidos no se relaciona más allá de un motivo común de cisteínas que satisface la secuencia concenso $CX_{3-7} CX_{3-6} CX_{0-5} CX_{1-4} CX_{4-13} C$, donde C es un residuo de cisteína y X puede ser cualquier otro aminoácido. Estas seis cisteínas forman tres enlaces disulfuros arreglados en una topología semejante a un nudo, en donde el enlace disulfuro establecido entre la cisteína tres y la cisteína seis, pasa a través de un anillo cerrado formado por los enlaces disulfuros entre C1-C4, C2-C5 y el segundo segmento del esqueleto carbonado $C_1 \dots X_n X_b C_2$ y $C_4 \dots X_c C_5$. El tamaño del anillo puede medirse de acuerdo al número residuos que forman el anillo y el cual difiere para cada molécula.

Las características estructurales claves del ICK son: una hoja β formada por tres hebras antiparalelas y el nudo de cistinas. Las tres hebras de la hoja β están formadas por un mínimo de diez residuos como sigue: $X_n X_b C_2, X_c C_5 X_d, X_e X_f C_6 X_g$. De los tres enlaces disulfuros que definen este motivo, el enlace entre la cisteína dos y cisteína cinco entrecruza la primera y segunda hebra de la hoja, confiriéndole una estabilidad adicional a la hoja (Pallaghy *et al.*, 1994). El otro enlace entre la cisteína tres y cisteína seis se extiende desde la tercera hebra, al asa que une la primera y segunda hebra, la cual se estructura en una vuelta hélice 3_{10} . Este enlace disulfuro, también contribuye a brindar estabilidad a la pequeña hoja β . El último enlace disulfuro une a la cisteína uno, que se halla en el extremo amino terminal, con la cisteína cuatro que también se encuentra en el asa que une la primera y segunda hebra y está adyacente a la cisteína tres. Adicionalmente, las dos última hebras de este motivo se encuentran unidas por una horquilla tipo β (Fig. 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

No obstante lo anterior, existen ejemplos que contienen cuatro puentes disulfuros y la topología del ICK (Norton y pallaghy, 1998). Sin embargo, este motivo es cualitativamente diferente al nudo de cistina identificado en la familia de los factores de crecimiento, el cual a pesar de tener la hoja β antiparalela y los enlaces disulfuros dispuestos en igual orden, la topología de las cisteínas difiere de la encontrada en el nudo de cistina inhibitorio y por ende, sus estructuras terciarias no pueden ser superpuestas (Isaacs, 1995; McDonald y Hendrickson, 1993).

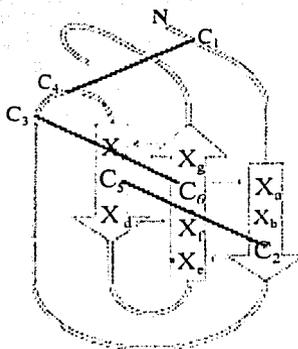


Figura 8. Diagrama esquemático del nudo de cistina inhibitorio, "ICK", donde se muestra el arreglo XXC, XCX, XXCX. Las flechas entre las hebras indican los puentes de hidrógeno que se establecen entre ellas, dirigidos desde el átomo donador al aceptor.

Además de la característica conferida por parte de los puentes disulfuros a la hoja β , se encuentra también el patrón de puentes de hidrógeno entre NH (C_6) y CO (X_a), NH (C_2) y CO (X_c), NH (X_g) y CO (X_e), y NH (X_d) y CO (X_f). Estos puentes de hidrógeno representan el patrón mínimo comúnmente hallado.

En la mayoría de los polipéptidos de araña y caracol, la cisteína tres (C3) y la cisteína cuatro (C4), están generalmente continuas. Hasta la fecha y como curiosidad, sólo la

gurmaína, un péptido del árbol *Gymnema sylvestre*, es el ejemplo perteneciente al reino vegetal que satisface este criterio (Fletcher *et al.*, 1999).

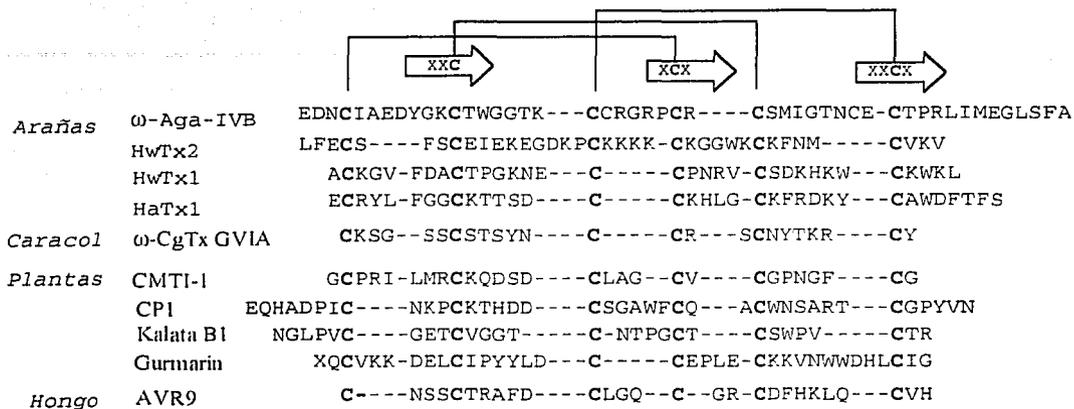


Figura 9. Alineamiento de varias secuencias polipeptídicas representativas provenientes de distintas fuentes biológicas y que adoptan la topología del motivo ICK.

Sobre las secuencias alineadas en la Figura 9, la ω CgTx GVIA es un polipéptido de 24 residuos, hallado en el veneno del caracol *Conus geographus*, el cual tiene efectos neurotóxicos como consecuencia de su alta afinidad al canal de calcio voltage dependiente tipo N. Kalata B1, es un péptido cíclico de 29 residuos que causa contracciones uterinas y es el principal componente activo de la planta tropical *Oldelyia affinis* DC. CMTI I, es otro polipéptido, constituido por 28 residuos, hallado en la semilla de la calabaza *Curcubita maxima* y actúa como inhibidor de tripsina. La ω Aga IVB, es un polipéptido tóxico del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* el cual se une a canales de calcio voltage dependiente tipo P. HaTx1 es un péptido aislado de la tarántula *G. spatulata*; AVR9 y CPI son dos péptidos aislados del hongo patógeno del tomate, *Cladosporium fulvum* y de la planta *Solanum tuberosum*, respectivamente.

Con la excepción de la ω Aga IVB, la cual tiene cuatro puentes disulfuros, el patrón de apareamiento de disulfuros en todas las secuencias de la Figura 9 es el mismo, junto con la similitud estructural evaluada por varios autores (Yu *et al.*, 1993; Narasimhan *et al.*, 1994). La ω Aga IVB se incluyó en la Figura 9 para mostrar que aún cuando esta toxina posee un cuarto puente disulfuro, se le puede considerar independiente de los otros tres, los cuales forman el nudo de cistina con igual topología a las otras moléculas. Por su parte, HaTX1, HwTX1 y ω -CgTx GVIA son ejemplos típicos de toxinas de araña y caracol marino en donde la cisteína tres y la cisteína cuatro están continuas. Por otra parte, la toxina HWTX II, del veneno de la tarántula *Selenocosmia huwena*, cuya estructura fue recientemente resuelta, presenta el arreglo de puentes disulfuros C1-C3, C2-C5, C4-C6, diferente al descrito para el inhibidor nudo de cistina (Shu *et al.*, 2002). Se puede apreciar que en general, las secuencias de la Figura 9 tienen baja homología a salvedad de los seis residuos de cisteína con el apareamiento C1-C4, C2-C5, C3-C6 y la secuencia GGT en kalata y ω Aga IVB.

La frecuencia del motivo inhibidor nudo de cistina en polipéptidos de diversos orígenes biológicos y con secuencia de aminoácidos no relacionada, sugiere que éste es un elemento estructural energéticamente favorable y estable, cuya marcada variabilidad en la secuencia de aminoácidos, refleja la tolerancia de éste plegamiento a los cambios de secuencia. Sin embargo, no todos los polipéptidos con el apareamiento disulfuro C1-C4, C2-C5, C3-C6, y similar hoja β de triples hebras, exhiben este motivo; un ejemplo es la Caribdotoxina del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Bontems *et al.*, 1991; Vita *et al.*, 1995)

II. 6 Plegamiento *in vitro* de proteínas.

Las proteínas son polímeros lineales con estructura covalente específica, determinada principalmente por la información genética, y la capacidad de adoptar conformaciones

tridimensionales relativamente fijas. La conformación de una proteína se encuentra especificada por los ángulos de torsión o ángulos de giro alrededor del enlace C α -N (Φ), del enlace C α -C (Ψ , ψ) y por los ángulos de las cadenas laterales (χ , χ) de cada uno de sus residuos de aminoácidos.

En la célula, como *in vitro*, la conformación plegada final de una proteína está determinada por la secuencia de aminoácidos, y a nivel celular, las proteínas se pliegan con una eficiencia mayor al 95%. Las agregaciones y/o proteína mal plegadas son problemas muy frecuente en el plegamiento de proteínas *in vitro*, el cual raramente ocurre *in vivo* excepto con proteínas mutantes, o durante la síntesis de proteínas a temperaturas elevadas (Gething y Sambrook, 1992)

"El problema del plegamiento" en las proteínas, es el mayor inconveniente para su producción a gran escala; este problema se refiere a la pregunta de cómo y porqué una proteína adopta una conformación nativa específica, ya que pueden adoptar un gran número de conformaciones posibles, para cuyo caso emplearía intervalos de tiempo enormes. Sin embargo, se observa que las proteínas se pliegan en minutos o segundos, lo cual implica que deben plegarse por alguna clase de ruta ordenada en la que la aproximación al estado nativo va acompañada de un incremento acentuado de la estabilidad de la conformación (Horowitz, 1999).

Para el proceso de plegamiento se han propuestos varios modelos, entre los cuales están el modelo secuencial, el modelo de nucleación, el modelo de difusión- colisión-adhesión y el modelo del colapso hidrofóbico, los cuales sólo se mencionarán aquí (Creighton, 1992; Baldwin, 1989). El esquema de la Figura 10 muestra la ruta del plegamiento a seguir en el modelo secuencial y otro modelo en el que se emplearían rutas alternativas para el plegamiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

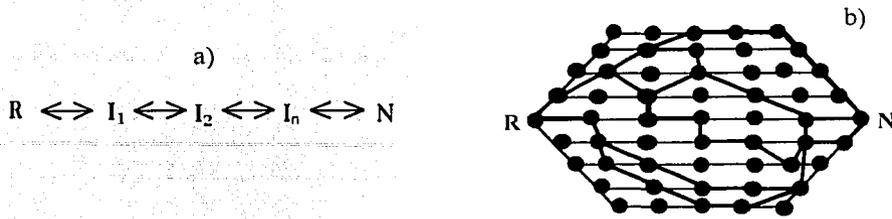


Figura 10. Representación de rutas de plegamiento desde un estado reducido (R) hasta el estado nativo (N). a) Modelo secuencial, en el cual el orden de las especies en la reacción está especificado y sólo existe una estructura identificable en cada paso. b) Modelo en el cual se emplearían simultáneamente rutas alternativas.

En general, se cree que el plegamiento de una proteína sucede en un proceso de etapas múltiples:

- 1) El plegamiento de un polipéptido enrollado al azar comienza con la formación aleatoria de segmentos cortos de estructura secundaria que pueden actuar como núcleos para estabilizar las regiones ordenadas adicionales de la proteína. 2) Núcleos con estructura apropiada, semejante a la nativa, crecen probablemente por la difusión, colisión y adhesión de dos o más de tales núcleos. Estos núcleos crecen de un modo cooperativo hasta que forman un dominio parecido al nativo. 3) En proteínas con múltiples dominios, éstos se juntan y forman un "glóbulo fundido" cuyas cadenas laterales hidrofóbicas permanecen expuestas al solvente. 4) A través de pequeños ajustes conformacionales, la cadena polipeptídica alcanza una estructura terciaria más compacta que corresponde a la conformación nativa de una subunidad aislada de la proteína. 5) Para proteínas con múltiples subunidades, el número requerido de estas entidades se asocian alcanzado una estructura cuaternaria semejante a la nativa. 6) Finalmente, una serie de ajustes conformacionale ligeros, conducen a la estructura nativa (Kim y Baldwin, 1990; Creighton, 1985)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estos estudios sobre el "problema del plegamiento" de las proteínas, iniciaron formalmente con los trabajos de Christian Anfinsen, el cual investigó el plegamiento *in vitro* de la ribonucleasa A reducida, demostrando que toda la información requerida para determinar la conformación de una proteína puede residir, por sí misma, en la cadena polipeptídica y que la formación de los enlaces disulfuro iguales a los establecidos en la estructura nativa de las proteínas ocurre espontáneamente *in vitro* a una velocidad más lenta que a nivel celular. El mínimo requerimiento para este plegamiento oxidativo *in vitro* es un buffer redox (Figura 11) el cual debe contener tanto equivalentes de agente reductor como agente oxidante (Fry *et al.*, 2000; Chatrenet y Chang, 1993).

Resultados similares a los obtenidos por Anfinsen se han logrado con otros polipéptidos pequeños de un sólo dominio y con proteínas más grandes. Tales estudios, han sugerido que el plegamiento *in vitro* puede iniciarse ya sea por un colapso de las regiones hidrofóbicas en el interior de la molécula, por la formación de una estructura secundaria estable que proporcione un plataforma para el plegamiento subsecuente o, también, por la formación de interacciones covalentes tales como enlaces disulfuro que estabilizan el polipéptido en una conformación particular (Chang *et al.*, 1994; Carter-Price *et al.*, 1996; Pigiet y Schuster, 1986). Sobre este último punto el requerimiento para la formación del enlace disulfuro entre dos cisteínas en una proteína es estrictamente estérico.

Muchos ensayos de plegamiento utilizan amortiguadores conteniendo glutatión el cual, suministra los equivalentes oxidantes necesarios para la formación del enlace disulfuro de la proteína. Dentro de estas condiciones el potencial redox del amortiguador, establecido por la relación $[GSH]^2/[GSSG]$, determina la velocidad del plegamiento oxidativo. El glutatión es la molécula pequeña más abundante del retículo endoplasmático y estudios de plegamiento oxidativo de proteínas *in vitro* han mostrado que tanto su forma reducida como su forma oxidada son necesarias para un eficiente plegamiento (Lyles y Gilber, 1991).

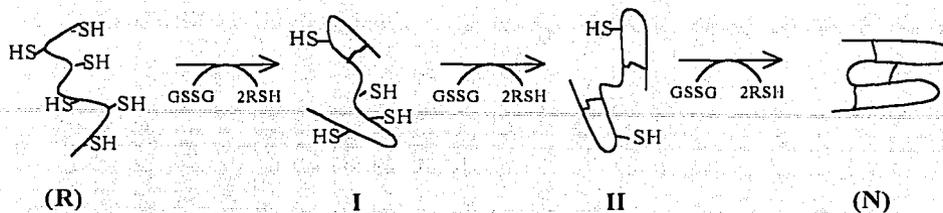


Figura 11. Ruta hipotética del plegamiento de una proteína con seis residuos de cisteína, usyo una reactivo con disulfuros intermolecular RSSR como el glutation, para formar los enlaces disulfuros.

En las proteínas, la formación o rompimiento de los enlaces disulfuros se lleva a cabo mediante dos reacciones secuenciales de intercambio tiol-disulfuro con el agente redox, pasyo a través de un intermediario, en el que se une la proteína con el gente redox mediante un enlace disulfuro (Figura 12). Estos enlaces disulfuros estabilizan la conformación plegada de las proteínas por la disminución de la entropía conformacional del estado no plegado y se cree, por varias razones, que el plegamiento de las proteínas es un proceso que está controlado termodinámicamente en el cual la etapa limitante de la velocidad sería la formación de especies cercanas al estado nativo, con menor energía libre de Gibbs con respecto a las demás especies formadas (Creighton, 1992; Chang, 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

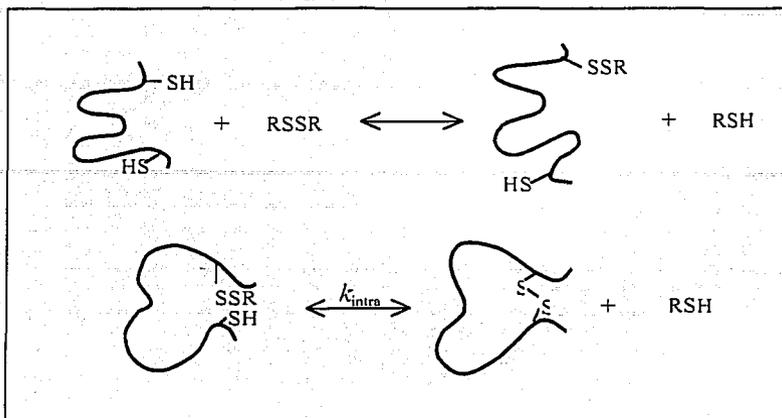


Figura 12. Etapas formación de un enlace disulfuro empleyo un agente redox con disulfuro intermolecular, RSSR. La primera etapa es la reacción química entre el grupo tiol de la proteína y el agente. La segunda etapa, de importancia para el plegamiento, ocurre cuyo un segundo grupo tiol de una cisteína de la proteína, dentro de estas vecindades desplaza, el disulfuro formado en el intermedio para formar el enlace disulfuro dentro de la misma proteína.

El proceso de plegamiento *in vitro* ha sido analizado para varias proteínas entre ellas, toxinas de venenos de animales, como una aproximación de lo que sucede *in vivo*. Las diferencias observadas entre el plegamiento *in vivo* e *in vitro*, tal como la escala de tiempo en que suceden ambos procesos, las enzimas involucradas en el plegamiento *in vivo* y las interacciones de la cadena polipeptídica naciente durante su biosíntesis, sugieren que este evento espontáneo es un fenómeno altamente complejo (Gethig, M-J y Sambrook, J., 1992; Freedman, R.B., 1984). Sin embargo, se ha obtenido suficiente evidencia a partir de los estudios llevados a cabo *in vitro* para emitir algunas generalizaciones acerca del proceso (Chatmet y Chang, 1993; Chang *et al.*, 1994).

III. ANTECEDENTES

Las proteínas son polímeros lineales de estructura covalente únicas, determinada principalmente por la información genética y la habilidad para adoptar conformaciones tridimensionales relativamente fijas. La información para esta conformación tridimensional, está contenida convenientemente en la secuencia de aminoácidos. Dentro de la célula las proteínas se pliegan con alta eficiencia. Sin embargo, el plegamiento de proteínas aisladas, expresadas o sintetizadas es un gran problema biotecnológico y a menudo es la limitante para su comercialización. El problema del plegamiento es básicamente un problema físicoquímico. No obstante, el plegamiento es un proceso que ocurre espontáneamente dentro de condiciones apropiadas, dirigidas por las interacciones entre las diferentes partes de la proteína y el solvente (Creighton, 1985; Baldwin, 1989).

En muchas proteínas la formación de enlaces disulfuros entre residuos de cisteínas es esencial para el plegamiento y estabilidad. Los trabajos pioneros de Anfinsen y colaboradores, sobre el plegamiento *in vitro* de ribonucleasa A reducida, demostraron que los enlaces disulfuros nativos se pueden formar espontáneamente en un amortiguador conteniendo tanto equivalentes de agente oxidante como agente reductor y/o enzimas que catalicen el intercambio tiol-disulfuro (Freedman, 1984).

Sobre el aspecto anterior, varias proteínas, incluyendo toxinas de animales venenosos, entre las cuales figuran varias toxinas de alacrán, caracol y arañas, han sido sintetizadas y plegadas *in vitro*. Todas ellas tienen la particularidad de contener en su secuencia residuos de cisteínas formo uno o más puentes disulfuros (Rochat *et al.*, 2000). Con estos antecedentes, y sin ánimo de esclarecer la ruta del plegamiento, nos propusimos plegar en su conformación nativa, la toxina sintética GrTx1 de la tarántula *Grammostola rosea*.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general.

Caracterizar la fracción péptidica del veneno de la especie *Grammastola rosea* y establecer condiciones para la generación de plegamiento *in vitro* de una toxina particular (GrTx1) de esta especie.

IV.2 Objetivos Específicos.

Purificar y caracterizar bioquímicamente las toxinas del veneno de la tarántula chilena *Grammastola rosea*, en particular la toxina GrTx1 nativa para fines comparativos.

Desarrollar las condiciones de plegamiento *in vitro* para la secuencia sintética de la toxina GrTx1 del veneno de *G.rosea* y comparar su actividad biológica con la toxina natural.

Establecer una relación de secuencia con las toxinas disponibles de la familia *Theraphosidae* y ubicar en él, a la toxina GrTx1 del veneno de la tarántula *G.rosea*.

Analizar a nivel de estructura primaria y terciaria, la homología de las secuencias de toxinas de la familia *Theraphosidae* disponible en la literatura y bases de datos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Caracterización del material de síntesis de la toxina GrTx1.

V.1.1 Reactivos.

En el desarrollo de este trabajo se emplearon reactivos grado analítico. La cromatografía de exclusión molecular se efectuó con Sephadex G-50, marca Sigma. Para la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa se usó la columna semi preparativa C4 (No.Cat. 214TP1010) y la columna analítica C18 (No.Cat. 218TP104) marca Vydac. Los disolventes empleados fueron de la marca Burdick & Jackson.

V.1.2 Reducción y purificación de la toxina sintética.

El precursor lineal de GrTx1 fue sintetizado por el Dr. David Brigham, utilizó la técnica *ter-Boc* de acuerdo a la secuencia determinada y no publicada por el Dr. Odell en la Universidad Estatal de Oklahoma (Dept. de Bioquímica), Stillwater, Ok. El material de síntesis de la toxina se disolvió a 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 0.01 M pH 7.4, 6M GuCl, 0.15 M NaCl, 15 mM DTT. Esta mezcla se mantuvo a 37 °C durante dos horas (Hermanson, G.T., 1996). Posteriormente, se purificó por rp-HPLC usó la columna C4 semipreparativa, se le determinó la secuencia de aminoácidos y su masa molecular por ES-MS y MALDI-TOF. La toxina natural también fue reducida mediante esta metodología, con la diferencia de que se usó mayor concentración de DTT (50 mM).

V.1.3 Determinación de grupos sulfhidrilos.

Para la determinación de los grupos sulfhidrilos presente en las muestras reducidas se empleó el método de Grossetti y Murray, el cual usa la 4,4'-ditiopiridina (4-DTDP) en una reacción de sustitución que bloquea o modifica reversiblemente los grupos -SH. El 4-DTDP forma un enlace disulfuro con los sulfhidrilos libres de la muestra y libera una molécula de 4-tiopiridona, la cual puede ser medida espectrofotométricamente a 324 nm ($\epsilon = 19,400$) (Hermanson, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El procedimiento experimental para esta determinación fue el siguiente: a 1 ml de una solución que contiene muestra con sulfhidrilos libres (0.05-0.5 micromol), se le agregó 20 µl de buffer conteniendo 50 mM EDTA y 100 µl de una solución de 4-DTDP. Simultáneamente, también se preparó una muestra blanco conteniendo sólo buffer y solución 4-DTDP. Esta mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 324 nm. La solución del 4-DTDP se preparó disolviendo 11mg del compuesto en 500 µl de metanol y se aforó con amortiguador de fosfato de sodio 100 mM pH 6.6 hasta un volumen final de 5 ml.

V. 2 Caracterización del veneno de *G. rosea* y purificación de la toxina Grtx1.

V.2.1 Obtención del veneno.

El veneno de la tarántula chilena *G. rosea* se obtuvo a partir de 36 especímenes mantenidas en el arcnario del Instituto de Biotecnología de la UNAM, las cuales fueron adquiridas comercialmente. Para la extracción del veneno los especímenes fueron anestesiados con dióxido de carbono y, posteriormente, se les estimuló eléctricamente con un voltaje de 15 V y una frecuencia de 2 pulsos por segundo, sobre la base de sus quelíceros. La colecta del veneno se realizó periódicamente cada mes, y el veneno se mantuvo a -20°C hasta su requerimiento.

V.2.2 Separación del veneno de *G. rosea* por cromatografía de exclusión molecular.

0.75 ml de veneno se diluyó hasta un volumen de 1.5 ml con amortiguador de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Esta solución se clarificó por centrifugación durante 2 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante se separó y se cargó en una columna empacada por gravedad con Sephadex G-50, de 162 cm de longitud y 1.6 cm de diámetro interno. Antes de cargar la muestra, la columna fue equilibrada con cinco volúmenes de columna del amortiguador. Las fracciones se colectaron automáticamente con un colector de la marca BioRad, modelo 2128. El volumen de las fracciones fue de 6 ml y la lectura de las

absorbancia a 260 y 280 nm se efectuaron manualmente en un espectrofotómetro Beckman modelo Du650i. Por último, la construcción del perfil cromatográfico se efectuó con el software Kaleidagraph.

V.2.3 Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida-SDS.

Se realizaron electroforesis discontinuas en geles de poliacrilamida-SDS al 15%, de acuerdo al método de Laemmli. Para las fracciones correspondientes a los péptidos se usó el método discontinuo propuesto por Hermann (Schagger y Von Jagow, 1987), el cual resuelve muy bien péptidos y proteínas con masas moleculares entre 5-30 kDa.

V.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (rp-HPLC).

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, se realizó en su mayor parte, en un cromatógrafo marca Waters, modelo 600E, equipado con un detector de onda variable y pantalla digital. Las condiciones de elución para todas las muestras se mantuvieron prácticamente constantes y los solventes empleados fueron:

Solvente A: Agua con 0.12% (v/v) de ácido trifluoroacético, F_3CCOOH .

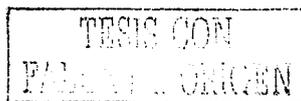
Solvente B: Acetonitrilo, $CNCH_3$ con 0.10% (v/v) de ácido trifluoroacético, F_3CCOOH .

V.2.5 Determinación de la estructura primaria.

La determinación de la secuencia de aminoácidos se realizó por medio de un secuenciador automático Beckman, "LF 3000 Sequencing Gold Micro HPLC", que usa la degradación de Edman. Los residuos amino terminales fueron detectados como derivados feniltiohidantoiados (PTH) en un HPLC dedicado para tal uso.

V.2.6 Determinación de la masa molecular.

La masa molecular de la toxina y de algunas otras fracciones, se determinó por medio de la técnica de "Electrospray Mass Spectrometry, ES-MS", en el Instituto de Biotecnología/UNAM y "Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight, MALDI-TOF", en la Universidad Estatal de Oklahoma, Stillwater, Ok.



V.2.7 Determinación del enlace disulfuro C2-C5 de la toxina GrTx1.

100 µg de péptido natural purificado, se resuspendieron en 100 µl de buffer 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 1mM EDTA. A esta solución se le agregó 10 µg de la enzima Glu-C (Proteasa V8) de *Staphylococcus aureus* y 10 µg de la enzima tripsina de páncreas bovino. Ambas enzimas fueron de la marca comercial Boehringer Mannheim. La digestión se incubó toda la noche a 30°C. Los productos generados de la digestión enzimática se purificaron por rp-HPLC y se secuenciaron seis de las fracciones obtenidas.

V.3 Plegamiento *in vitro*.

El material de síntesis fue reducido y purificado según el procedimiento descrito anteriormente. Para establecer las condiciones de plegamiento se probaron varias condiciones, entre ellas, diferentes concentraciones de péptido (5-50 µM), dos tipos de Amortiguadores (Tris y acetato de amonio) y variación en la relación molar de glutatión oxidado GSSG (0.2-2.0 mM) y glutatión reducido, GSH. En todos los casos el pH de la reacción se ajustó hasta 8.0 y la temperatura fue de 4 °C. La reacción de plegamiento se detuvo acidificando la mezcla con ácido acético hasta pH 3-4. Se tomaron y analizaron muestras a distintos tiempos para establecer la cinética de plegamiento.

Se realizaron también ensayos de plegamiento *in vitro* con la minichaperonina GroEL (191-345) (Buckle *et al*, 1997), clonada y producida por el Dr. Marcos Ramos del grupo de investigación del Dr. A. Alagón. Para estos experimentos se preparó una mezcla equimolar de enzima y péptido, en amortiguador MES 100 mM pH 6.3. El volumen final de la mezcla fue de 100 µl y se variaron tiempos y temperaturas de reacción (Perret *et al*, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V.4 Ensayos de Actividad

V.4.1 Ensayos *in vivo*.

La actividad *in vivo* de la toxina nativa y de la toxina plegada *in vitro*, se realizaron con grillos de la especie *Acheta domesticus*. Los grillos se inyectaron a nivel abdominal empleando microcapilares y se tomaron grupos de diez especímenes por cada dosis de toxina ensayada.

V.4.2 Ensayos electrofisiológicos.

Los ensayos electrofisiológicos fueron realizados con el Dr. Enzo Wanke del laboratorio del Dr. L.Possani, en el marco de un convenio de colaboración establecido con el grupo del Dr. A.Alagón.

Las corrientes entrantes de Na^+ y salientes de K^+ tipo erg, se registraron por medio de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana "*patch clamp*" en la configuración de célula completa. Los electrodos empleados fueron pipetas de borosilicato los cuales tuvieron una resistencia de 1-2 $\text{M}\Omega$. Las líneas celulares empleadas para evaluar las corrientes de sodio y de potasio tipo-Erg fueron la i-28, una línea de rabdomiosarcoma humano (Stratton *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1989) y la línea celular F-11, un hibridoma de neuroblastoma murino N18TG2 fusionado con células de ganglio dorsal de ratón (Platika *et al.*, 1985), respectivamente.

La aplicación de la toxina nativa y sintética plegada, se realizó mediante la perfusión continua por gravedad de la solución extracelular compuesta por 95 mM NaCl, 40 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes, 5 mM Glucosa, pH 7.29. El electrodo se llenó con la solución intracelular, la que contenía 10 mM NaCl, 1.3 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes, 130 mM K-Aspartato, 10 mM EGTA, pH 7.3.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

El protocolo de pulsos para el registro de las corrientes de Na^+ (I_{Na^+}) partió de un potencial de mantenimiento (V_H) de -60 mV, seguido de un prepulso a -90 mV de 500 ms de duración, después del cual se dió un pulso de prueba de 100 ms de duración que fue de -30 a $+20$ mV con intervalos de 10 mV. La amplitud máxima de la corriente de Na^+ se determinó en condiciones control (sólo solución extracelular) y en presencia de muestra.

Para el registro de las corrientes de K^+ (I_{K^+}) tipo erg, el protocolo de pulso partió de un potencial de mantenimiento (V_H) de -60 mV, seguido de un prepulso a $+60$ mV durante 520 ms, posteriormente se aplicó un pulso de prueba a -120 mV de 300 ms de duración en el cual se determinó el valor de corriente de K^+_{erg} remanente en ausencia y presencia de muestra.

V.5 Análisis de la Estructura primaria y terciaria de GrTx1.

V.5.1. Alineamiento de secuencias.

Para la generación de la relación de secuencias, se obtuvieron de la base de datos de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y de publicaciones disponibles, 36 secuencias polipeptídicas no redundantes de toxinas de arañas del orden *Mygalomorphae*. De éstas, 17 correspondieron a la familia *Theraphosidae*.

El alinmaineto múltiple se realizó con 15 de las 17 secuencias, debido a que dos secuencias se descartaron por corresponder a fragmentos de toxinas y, por ende, no contenían el motivo de cisteína definido por Pallaghy, el cual ha sido considerado en este estudio como uno de los criterios principales para la selección de las secuencias, ya que él define en buena medida, características estructurales.

El programa que se empleó para el alineamiento múltiple de las secuencias fue el CLUSTALX, con los siguientes parámetros de trabajo pre-establecidos: *gap opening*, 10;

gap extension, 0.2; delay divergent sequence, 30%; protein weight matrix, Gonnet series. Las distancias genéticas de los alineamientos se calcularon usyo la matrix Dayhoff PAM, del programa PROTDIST.

El árbol filogenético se construyó usyo el algoritmo de Neighbor-joining, el cual contuvo todas las secuencias consideradas en el alineamiento. El diagrama del árbol fue visualizado con el programa DRAWTREE, las estructuras tridimensionales se obtuvieron del Protein Data Bank y se editaron con el programa de despliegue y análisis de moléculas, SwissPDBViewer.

V.5.2. Construcción del modelo tridimensional de GrTx1.

Bajo los programas en línea con INSIGHT, se construyó el modelo tridimensional de la toxina GrTx1, tomyo como templado la estructura recién publicada de la toxina GMTx2, cuyo número de registro en el Protein Data Bank aparece como 1LUP. Se usó el Programa RESIDUE, para remplazar los aminoácidos en la secuencia y evaluar manualmente la energía de cada uno de los rotámeros. Con MODIFY, DISCOVER e INSIGHT se realizó la minimización automática del modelo, la dinámica y el alineamiento estructural, respectivamente.

La secuencia también se sometió a un *Threading* realizado a través de la red, por 3D-PSSM web server del grupo de bioinformática estructural del Imperial College of Science, Technology y Medicine (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Caracterización de la toxina GrTx1 sintética.

La síntesis del péptido YCQKWMWTCDEERKCCGLV CRLWCKKKIEW en fase sólida, fue realizada por el Dr. David Brigham, de quien se obtuvo 53.6 mg del material de síntesis. Una solución de este material en amortiguador acetato de amonio 20 mM pH4.7 y absorbancia a 280 nm de 0.63 se corrió en un gel 15 % de poliacrilamida-SDS, con y sin 2-Mercaptoetanol para ver el estado del material. La fotografía del gel de la Figura 13, presenta el patrón electroforético de este material en condiciones reductoras y sin reducir. Se observa para todas las muestras, una banda ancha que migró a nivel de masas moleculares pequeñas.

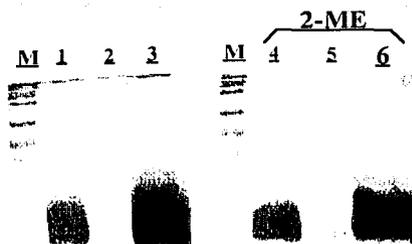


Figura 13. Material de síntesis de la toxina GrTx1 corrido un gel de poliacrilamida-SDS al 15 %: (1) 10 μ l solución de material sintético. (2) 1 μ l 1 solución de material sintético. (3) 10 μ l del precipitado, resuspendido en buffer de carga. (4), (5) y (6) son las mismas muestras bajo condiciones reductoras. El marcador de peso molecular (M) empleado, fue el P7708S de BioLabs el cual contiene 8 bandas resueltas con masas moleculares desde 175 a 6.5 kDa, y que en este gel no se resolvieron muy bien.

La determinación de grupos tioles por el procedimiento de Grossetti y Murray, especificado en la metodología de este trabajo, dió como resultado una relación de 2.63 mol de tioles (o sulfhidrilos) por mol de péptido. Este valor nos indicó que grupos tioles en el material se encontraban parcialmente oxidados, ya que se esperaba un valor de 6, correspondientes a los tioles de las seis cisteínas presentes en el péptido.

V.1.1 Reducción y purificación de la toxina sintética.

La reducción del material de síntesis, según el procedimiento descrito en la metodología, produjo una relación mol -SH/mol de péptido de 6.2. Un mg de este material en un ml buffer de reducción, se separó rp-HPLC. El perfil de elución se observa en la Figura 14; la toxina sintética GrTx1 eluyó con un tiempo de retención de 46.48 min. y representó el 10% del material obtenido de la síntesis.

El pico de elución de la toxina sintética, obtenido en la separación del material reducido, se repurificó y se secuenció hasta el aminoácido número 26, los cuales correspondieron exactamente con la secuencia esperada. La determinación posterior de la masa molecular por ESI-MS, dió la masa esperada con lo que se corroboró la secuencia. La Figura 15 muestra el espectro de masa de la toxina GrTx1 sintética reducida y la Tabla IV, muestra constantes calculadas para la toxina a partir de la secuencia.

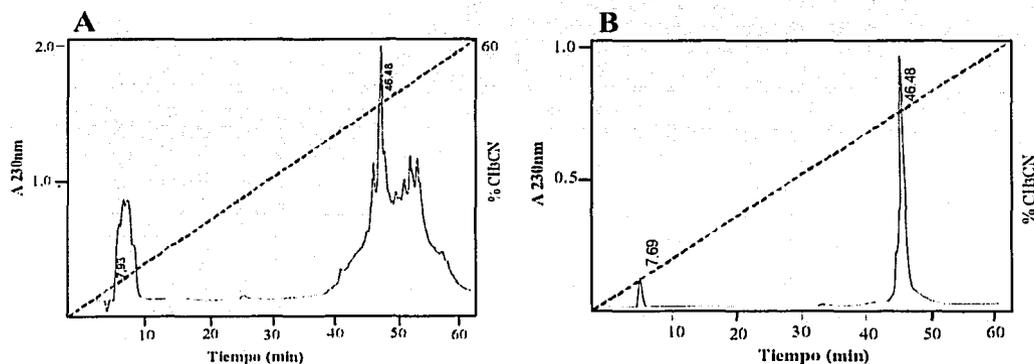


Figura 14. Rp-HPLC de (A) material de síntesis de GrTx1. La toxina eluyó en un tiempo de retención de 46.48 (B) Repurificación de la toxina GrTx1 sintética. Las condiciones de elución fueron 0-60 % CH₃CN con 0.10 % F₃CCOOH, flujo de 2 ml/min. y la columna usada fue una C4, marca Vydac. La línea a trazos representa el incremento gradual en porcentaje de CH₃CN.

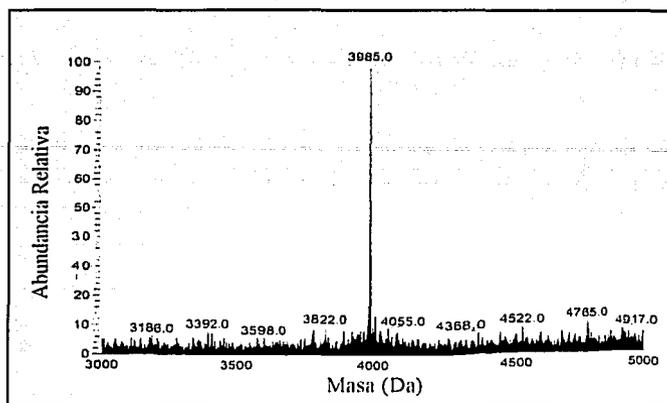


Figura 15. Espectro de masas de la toxina sintética GrTx1 reducida

Tabla I. Constantes físicas de la GrTx1 determinadas a partir de su secuencia de aminoácidos, usando el programa ProtParam tool (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>).

Masa Molecular Teórica (-SH)	Punto Isoelectrico	ϵ (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹ (-SH)	ϵ (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹ (S-S)
3985.7	8.31	6.03	6.12

V.2 Caracterización del veneno de *G. rosea* y purificación de la toxina nativa Grtx1

V.2.1 Obtención del veneno.

El volúmen promedio de veneno obtenido de los 36 especímenes por medio del procedimiento de estimulación eléctrica fue de 400 μ l, con un promedio de 10-15 μ l de veneno por tarántula. El veneno de *G. rosea* tiene la apariencia de un líquido un poco viscoso, incoloro e inodoro. Su valor de pH medido inmediatamente después de la colecta,

y después de varias semanas almacenado a -20°C fue de 5.5, este valor es muy cercano al reportado por Geren y Odell para las especies *D. hentzie* (pH 5.44) y *A. robustus*. (pH 4.5-5.0). Savel-Niumann reportó para el veneno de la tarántula *E. californicum* un valor de pH de 5.3.

El espectro de absorción en el rango del Uv-Vis del veneno diluido en acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 exhibe un máximo de absorción alrededor de los 260 nm, con una relación $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ igual a 1.76 y no muestra absorbancia en el intervalo del visible.

V.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del veneno de *G. rosea*

La Figura 16, muestra los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida-SDS al 15 % del veneno de la tarántula *G. rosea*, al igual que la fracción precipitada al diluir el veneno en buffer acetato de amonio 20 mM, pH 4.7.

En las fracciones de veneno crudo y veneno acidificado, se observan tres bandas principales; una banda débil que migró a nivel de la fusión MBP- β -galactosidasa de *E. coli* en 175 kDa, otra banda que migró por debajo de los 47.5 kDa, la cual presenta actividad de hialuronidasa y ha sido ampliamente estudiada en el veneno de *B. vagans* por otro proyecto de este grupo. La última banda de mayor intensidad, que migra por debajo de los 16 kDa, corresponde a los componentes peptídicos, los cuales constituyen la fracción más abundante del veneno. Por otra parte, el precipitado obtenido de la acidificación del veneno, correspondió principalmente a componentes peptídicos, los cuales se oligomerizan en condiciones no reductoras tanto en el material precipitado como el veneno crudo. Este material precipitado, se identificó posteriormente estar constituido principalmente por un péptido cuya secuencia no se determinó completamente.

Los patrones electroforéticos de venenos de *B. vagans*, *B. smithi* y *A. runahui*, exhiben igual disposición de bandas que el observado con el veneno de *G. rosea* (datos no mostrados). Así mismo, el patrón electroforético del veneno de *E. californicum* reportado por Savel-Nieman presenta tres bandas principales que migran a masas moleculares

aparente de 40, 4.3 y 1.3 kDa. La última banda correspondió a los acilpoliaminas del veneno.

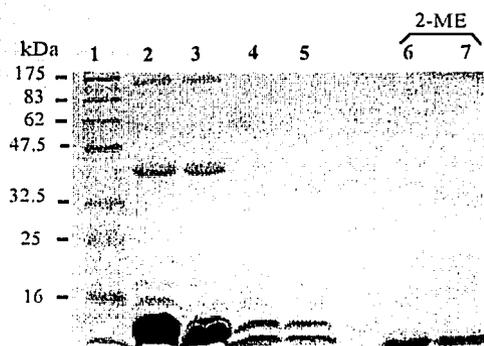


Figura 16. Gel de poliacrilamida-SDS al 15 % de veneno crudo de la tarántula *G. rosea* y de la fracción precipitada al acidificar el veneno con acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. 1) Marcador de peso molecular P7708S de BioLabs. 2) veneno crudo en condiciones no reductoras. 3) Sobrenadante obtenido al diluir el veneno en acetato de amonio y clarificado por centrifugación. 4) y 5) precipitado obtenido al diluir el veneno y resuspendido en buffer de carga para geles de proteína, en condiciones no reductoras. 6) y 7) precipitado en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol.

V.2.3 Separación del veneno por Cromatografía de Exclusión Molecular.

La elución cromatográfica por exclusión molecular de 1.5 ml ($A_{280 \text{ nm}} 354.$) de veneno diluido en buffer acetato de amonio 20 mM pH 4.7 produjo el perfil de la Figura 17, en el cual se distinguen tres picos principales y cuyo máximo eluye entre las fracciones 45 y 56. Las seis fracciones colectadas por separado, se enumeraron con números romanos desde I hasta VI y el porcentaje obtenido de cada una de ellas, con respecto a la cantidad de veneno inicial cargado en la columna, se muestra en la Tabla II.

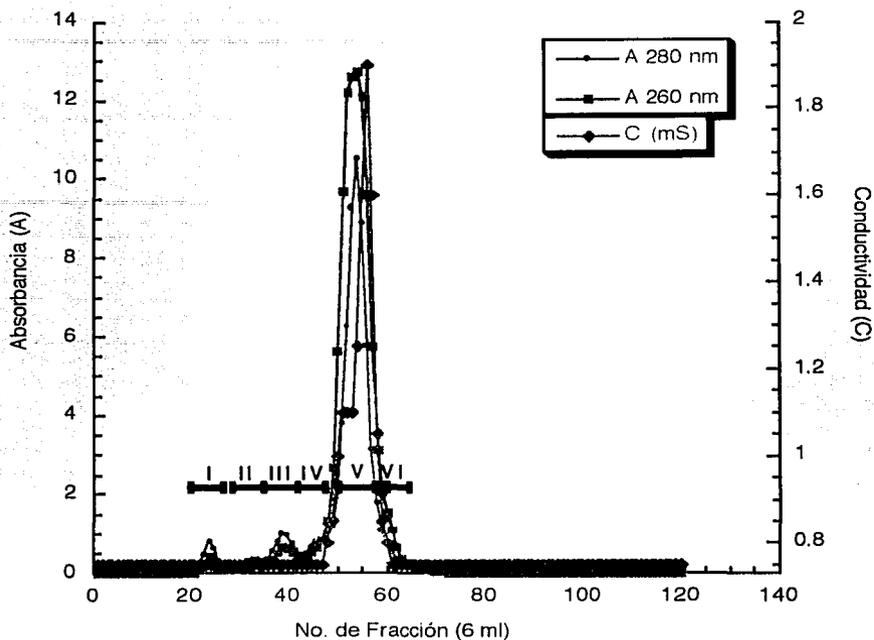


Figura 17. Perfil cromatográfico de la elución por exclusión molecular de 535 unidades de absorbancia del veneno de *G.rosea*. El tamaño de las fracciones fue de 6 ml.

En la fracción I migraron los dos componentes principales de alto peso molecular del veneno, los cuales se identificaron por SDS-PAGE (Figura 18). Estos son: el componente que migra a 175 kDa y el componente con actividad de hialuronidasa, cuya migración se da por debajo de los 47.5 kDa. Esta fracción I es motivo de estudio por parte de otro proyecto del grupo, por tanto, no se analizará más allá de lo aquí mencionado. Las fracciones II y III correspondieron principalmente a componentes de bajo peso molecular, los cuales migraron por debajo de los 25 kDa; aunque también se encuentra en menor proporción la banda con actividad de hialuronidasa; en la fracción IV, se encontró componentes que migraron principalmente por debajo de los 6.5 kDa en el gel de SDS-PAGE. Esta fracción contuvo una mezcla de péptidos, al igual que la fracción III, como se observó posteriormente por rHPLC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 18. Gel de poliacrilamida-SDS (15%) de las fracciones obtenidas en la cromatografía por exclusión molecular del veneno de *G. rosea*. 1) Marcador de peso molecular P7708S de BioLabs. 2) Veneno crudo. 3) Material de síntesis de GrTx1. Los números en romano I, II, III, IV, V y VI ubicados en el gel, corresponden a las respectivas fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular.

La fracción V, cuyo máximo de absorbancia es a 260nm, y en menor grado a 280 nm, se debe al contenido de acilpoliaminas y según Geren and Odell, al contenido de ATP que también se encuentra en esta fracción. Esta fracción, migró a nivel de los componentes de bajo peso molecular y mantuvo su tinción con azul de Coomassie. Posteriormente se comprobó que tanto la fracción V como la fracción VI además de las acilpoliaminas, contienen también péptidos de bajo peso molecular.

La determinación de la conductividad para cada una de las fracciones colectadas durante la cromatografía, dió un pico máximo de conductivada de 1.68 mS, solapado dentro de la fracción enumerada como V. Esta conductividad es atribuida por varios autores a iones citrato, no obstante, por el pH en el cual trabajamos, no se descarta que las acilpoliaminas se encuentren cargadas y la conductividad que se observa se deba a este factor.

TESIS CON
FALLA DA ORIGEN

Tabla II. Recuperación para cada una de las fracciones obtenida en la separación cromatográfica del veneno, después de liofilizar y resuspender en 1.5 ml buffer acetato de amonio 20mM pH 4.7.

Fracción	Vol (ml)	A ₂₆₀	UA ₂₆₀	A ₂₈₀	UA ₂₈₀
Sobrenadante Veneno acidificado pH 4.7. Fracción cargada en la C. Sephadex G-50	1.5	627	940	357	535
P U R I F I C A C I O N					
Fracción I Sephadex/Liofilizada	1.5	3.6	5.5	6.5	9.7
Fracción II Sephadex/Liofilizada	1.5	1.8	2.6	2.6	4.0
Fracción III Sephadex/Liofilizada	1.5	7.5	11.2	9.9	14.9
Fracción IV Sephadex/Liofilizada	1.5	8.1	12.2	8.6	12.9
Fracción V Sephadex/Liofilizada	1.5	335.4	503.2	165.7	248.6
Fracción VI Sephadex/Liofilizada	1.5	9.0	13.6	3.2	4.7
Suma de las Fracciones	9.0	365.4	548.3	196.5	294.8

VI.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (rp-HPLC).

El perfil de la cromatografía de 20 µl de las fracciones III y IV por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (rpHPLC) se observa en las Figuras 16a y 16b, respectivamente. La separación se efectuó empleando una columna C18 de la marca Vydac. El cromatograma de la fracción III presentó el mayor número de picos, los cuales eluyen dentro de un gradiente lineal del 28 al 49% de acetonitrilo y corresponden principalmente a componentes peptídicos (Figura 19a). En la fracción IV, por otra parte, los picos eluyen principalmente en el intervalo lineal del 32 al 42% de acetonitrilo. Se observa en esta fracción, la elución de un(os) componente(s) hidrofílico(s) con un tiempo de retención de 10.95 minutos dentro del gradiente lineal de acetonitrilo (Figura 19b).

En la fracción V (Figura 20), para la cual se esperaban sólo componentes con características hidrofílicas como las acilpoliaminas, se observaron además componentes con características hidrofóbicas, los cuales eluyeron entre el 35 y 50% de acetonitrilo. El componente mayoritario, con un tiempo de retención de 42.06, representó un 41.6 % del

área del cromatograma y eluyó en 42. % de acetonitrilo. Posteriormente, este componente se identificó por secuenciación y por espectrometría de masas, como la toxina nativa GrTx1. Esta toxina representa el 31.5 % del área bajo la curva del cromatograma obtenido para la elución del veneno total por rp-HPLC. Por otra parte, los componentes con tiempos de retención cortos, aparecen también en la fracción VI y se discuten adelante.

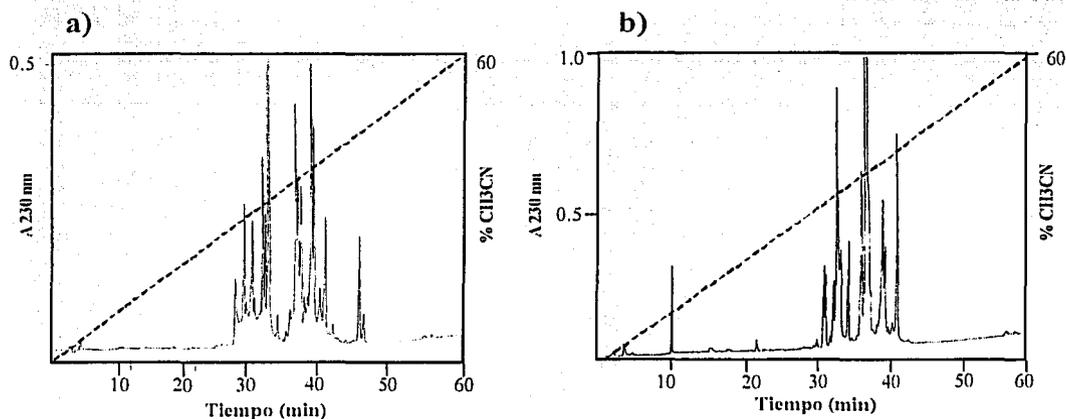


Figura 19. Perfil cromatográfico a 230 nm de las fracciones a) III y b) IV por rp-HPLC. Se inyectaron 20 μ l de muestra en una columna C18. El gradiente usado fue de 0-60% $\text{CH}_3\text{CN}/0,10\%$ F_3CCOOH , con flujo de 1 ml/min y la línea a trazos lo representa.

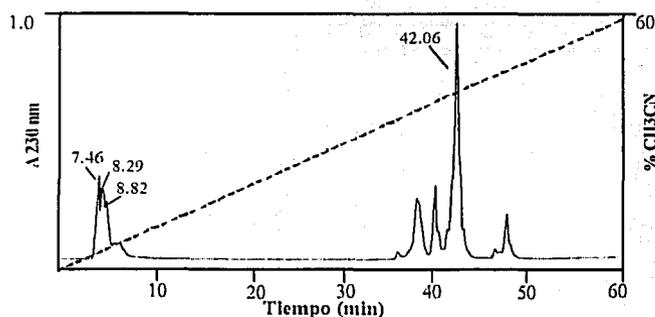


Figura 20. Perfil cromatográfico a 230 nm de la fracción V por rp-HPLC. Se inyectaron 100 μ l de muestra en una columna C4. El gradiente usado fue de 0-60% $\text{CH}_3\text{CN}/0,10\%$ F_3CCOOH y el flujo fue de 2 ml/min y la línea a trazos lo representa.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

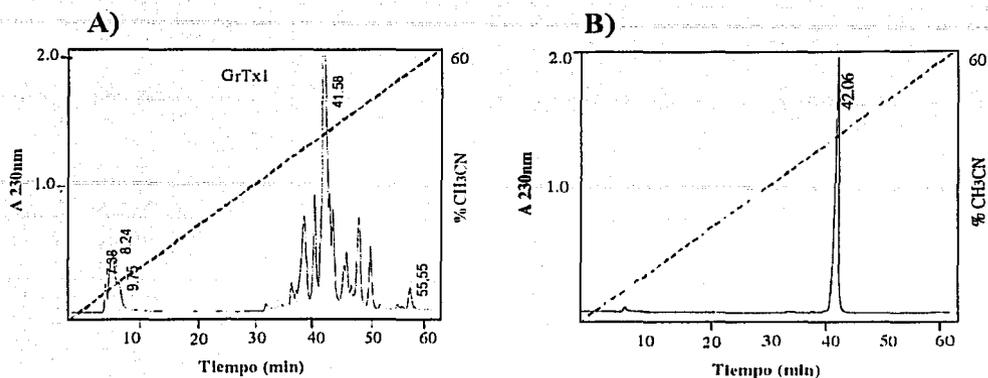


Figura 21. Perfil de la elución cromatográfica por rp-HPLC a 230 nm de A) 10 μ l de veneno crudo y B) repurificación de la toxina GrTx1. Se usó una columna C4, un gradiente lineal de 0-60% CH₃CN/0,10% F₃CCOOH y flujo de 2 ml/min.

La fracción VI se separó bajo las mismas condiciones de elución que las anteriores fracciones, con la salvedad que se realizaron registros simultáneos a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. Se escogieron estas longitudes de onda con el fin de discriminar la absorción debida a las acilpoliaminas, de la absorción debida a componentes nucleotídicos que pudieran estar presentes, como ATP, ADP y AMP, los cuales han sido reportados en los venenos de las tarántulas *D. hentzie*, una *Aphonopelma sp.* de Arizona y en la especie *E. californicum* (Geren and Odell, 1992; Savel-Niemann, 1989).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

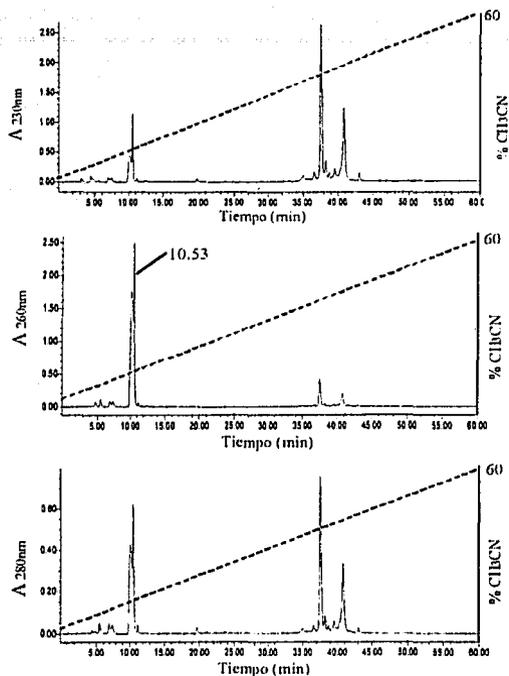


Figura 22. Perfil rp-HPLC de la fracción VI con registros simultáneos a 230 nm, 260 nm y 280 nm. El volumen de muestra cargado fue de 50 μ l, se usó una columna C18 un gradiente lineal de 0-60% $\text{CH}_3\text{CN}/0.10\% \text{F}_3\text{CCOOH}$ (línea a trazos) y flujo de 1 ml/min.

La longitud de onda de 230 nm, es a la cual registramos comúnmente las separaciones de péptidos y proteínas por HPLC, este valor está más cercano al máximo de absorción (214 nm), debida a la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ del grupo amida presente en las proteínas y es más sensible que la absorción por parte de estos componentes que a 280 nm, longitud con la cual trabajamos comúnmente en el espectrofotómetro para estimar las concentraciones de las muestras con proteínas; por otra parte alrededor de los 260 nm absorben las bases nitrogenadas purínicas y pirimidínicas.

La Figura 22 muestra los cromatogramas de la fracción VI, obtenidos por rp-HPLC a las tres longitudes de onda. En cada uno de ellos se puede observar dos zonas ampliamente separadas en las cuales migran los componentes. La zona donde eluyen los componentes con menor tiempo de retención y la cual se encuentra poco resuelta, presenta mayor absorción a 260 nm que a las demás longitudes de onda. La absorción a 260 nm, teniendo en cuenta algunos reportes, se debería a la presencia de componentes nucleotídicos y la absorción a 230, nm sería a causa de las acilpoliaminas (Escoubas, et.al., 2002). Un análisis de las masas moleculares de algunos de los picos que eluyen en esta zona, arrojó por MALDI-TOF, masas entre los 400 y 800 Da. (Tabla III). Estas muestras no se consideraron en este trabajo, más allá del análisis de algunas masas obtenidas. Los componentes peptídicos, como es de esperarse, presentan su mayor absorción a la longitud de onda de 230 nm.

<i>Muestra</i> Masa Obs.	<i>V-7.46</i>	<i>V-8.29</i>	<i>V-8.82</i>	<i>VI-10.53</i>
	845	688	768	
	672	672	721	
	656	656	672	
	445	461	656	
	437	428	488	
	255	303	461	
	250	265	445	
			428	417
			339	268

Tabla III. Tabulación de masas moleculares observadas por MALDI-TOF para algunos picos de la fracción V, con tiempos de retención de 7.46, 8.29, 8.82 min y el pico con tiempo de retención de 10.53 minutos de la fracción VI (Fig. 22). Los componentes mayoritarios encontrados en cada una de estas fracciones se muestran en negrilla.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.2.5 Determinación de la estructura primaria y peso molecular de la toxina nativa GrTx1.

La toxina nativa GrTx1A, se identificó en el veneno en la fracción que eluyó con un tiempo de retención de 42.06 min sobre una columna C4 (Figura 21a y 21b); su secuencia determinada directamente hasta el aminoácido 19 fue: YCQKWMWTCDEERKCCEGL, los cuales correspondieron con los primeros aminoácidos de la secuencia sintética. La determinación de la masa molecular de la toxina nativa reducida y sin reducir fue de 3979.6 ± 0.4 Da. y 3985.7 ± 0.4 Da. La diferencia de 6 unidades de masa atómica de la toxina nativa sin reducir con respecto a la toxina reducida, indicó que los seis residuos de cisteínas en la secuencia están formando tres puentes disulfuros, como era lo esperado. Además, los valores de las masas moleculares experimentales y teóricas, coinciden muy bien, teniendo en cuenta un error experimental del 0,02% que presenta la determinación de la masa por MALDI-TOF.

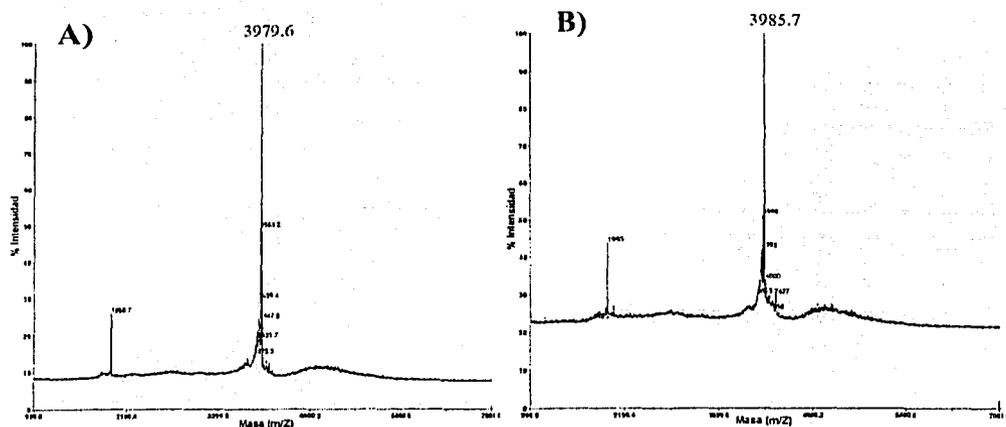


Figura 23. Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF de A) la toxina nativa GrTx1 y B) de la toxina GrTx1 completamente reducida con DTT. En ambos espectros se observa un pico minoritario correspondiente a la segunda ionización de la molécula.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.2.6 Determinación del enlace disulfuro C2-C5 de la toxina nativa GrTx1.

Basados en el conocimiento de la secuencia de la toxina GrTx1 y asumiendo el patrón de disulfuros del ICK se digirió el péptido con la enzimas tripsina, que corta el extremo carboxilo terminal de los aminoácidos lisina y arginina, y la enzima Glu C, que corta el extremo carboxilo terminal de los aminoácidos aspártico y glutámico (Fig. 24A). El perfil cromatográfico de la purificación se muestra en la Figura 24B, junto a la cual aparecen tabulados los picos a los que se les determinó la secuencia (Fig. 24C). Ellos se escogieron con tiempos de retención corto ya que se esperaban obtener péptidos cortos con poca interacción hidrofóbica.

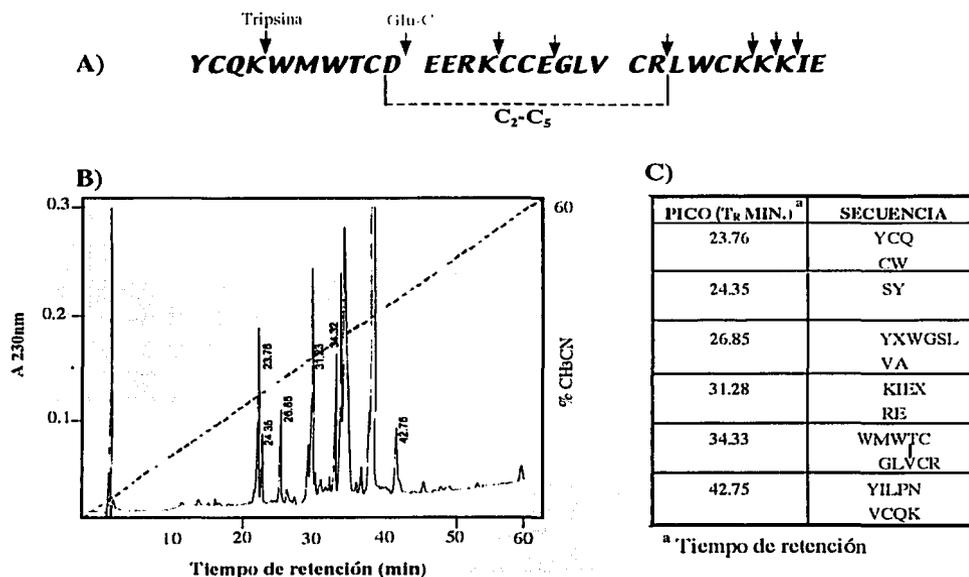


Figura 24. Determinación enzimática del enlace disulfuro entre la cisteína 2 y la cistina 5. En el panel A se muestra la secuencia de GrTx y sobre ella, los sitios de corte de las enzimas empleadas en la digestión, tripsina de páncreas de bovino (Azul) y proteasa V8 o Glu- de *Staphylococcus aureus* (rojo). B) rp-HPLC de la digestión enzimática de 91 µg de toxina nativa. C) Tabulación de los picos del cromatograma a los cuales se les determinó la secuencia.

De los picos seleccionados para secuenciar, el pico que eluyó con un tiempo de retención de 34.33 minutos, dió la secuencia esperada para los peptidos unidos por el enlace disulfuro establecido entre las cisteínas dos y cinco (CII-CV), los cuales fueron WMWTC(II), GLVC(V)R. Los demás enlaces disulfuros presentes en el péptido no se pudieron determinar por digestión enzimática, debido a que no existe un método para romper entre las dos las cisteínas adyacentes en las posiciones 15 y 16.

V.3 Plegamiento *in vitro* de GrTx1

El péptido reducido y purificado por rpHPLC se sometió a una reacción de plegamiento oxidativo en amortiguador redox de glutatión, el cual promueve la oxidación y rearrreglo de enlaces disulfuro. Se ensayó también la oxidación del péptido lineal burbujeando directamente oxígeno en la muestra.

Para optimizar la reacción de plegamiento de la toxina, se examinaron varias condiciones de oxidación las cuales aparecen listadas en la tabla IV.

Tabla IV. Condiciones para la optimización de enlaces disulfuro en GrTx1

Condición	Amortiguador	pH	GSH(mM)	GSSG (mM)	GrTx1 (mM)	Rto. (%)
1	NH ₄ OOCCH ₃	7.8		-	50 mM	0
2	NH ₄ OOCCH ₃	7.8	5 mM	0.5 mM	5 mM	2.7%
3	NH ₄ OOCCH ₃	7.8	5 mM	0.5 mM	25 mM	20 %
4	NH ₄ OOCCH ₃	7.8	5 mM	0.5 mM	50	15 %
5	Tris-HCl	7.8		-	25 mM	0
6	Tris-HCl	7.8	5 mM	0.2 mM	25 mM	19%
7	Tris-HCl	7.8	5 mM	0.5 mM	25 mM	32%
8	Tris-HCl	7.8	5 mM	2.0 mM	25 mM	45 %
9	Tris-HCl/ O ₂	7.8		-	50 mM	0

El buffer acetato de amonio 1 M, pH7.8 conteniendo GSSG 0.5 mM y GSH 5mM (condición 4) y el cual fue usado en el plegamiento de ω -conotoxina MVIIA y MVIIC, produjo un rendimiento del 15 %, obteniéndose además, gran cantidad de precipitado durante la oxidación, producto de la agregación y polimerización del péptido el cual posteriormente se redujo y purificó por rpHPLC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La reacción de plegamiento se monitoreó por rpHPLC cada 24 h hasta un tiempo de 72 h. El mayor pico visible en 72h, correspondió al tiempo retención en cual eluye la toxina GrTx1 nativa (Figura 25A)

Manteniendo un tiempo de 72h, se ensayó la reacción con buffer Tris-HCl y se examinó posteriormente, el efecto de variar la concentración de GSSG. Se encontró que el incremento de GSSG, hasta una concentración de 2mM produjo un aumento en el rendimiento de la reacciónplegamiento del 45 % con respecto a la concentración inicial del péptido reducido en la reacción de plegamiento (Figura 25B).

La temperatura de reacción, la cual ha sido reportada no ser crucial para el plegamiento de ω -conotoxina TxVII (entre 20°C y 37°C), se mantuvo a 4°C. Sin embargo, en el plegamiento de las toxinas ω -conotoxina MVIIA y MVI este parámetro fué crucial.

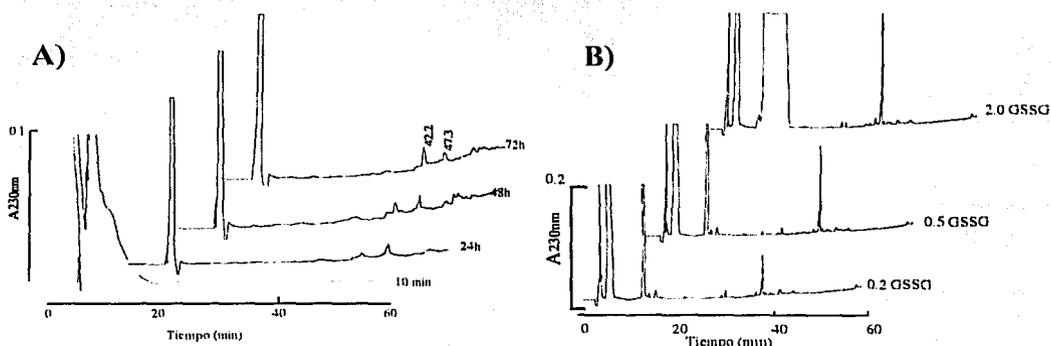


Figura 25. A) Cinética de plegamiento de la condición 2. B) Plegamiento de GrTx1 a diferentes concentraciones de GSSG.

La determinación de la masa molecular de la toxina plegada, produjo el valor de la toxina oxidada con tres enlaces disulfuros (Masa teórica = 3979.7 Da, Masa experimental 3979.8 Da) (Figura 26B).

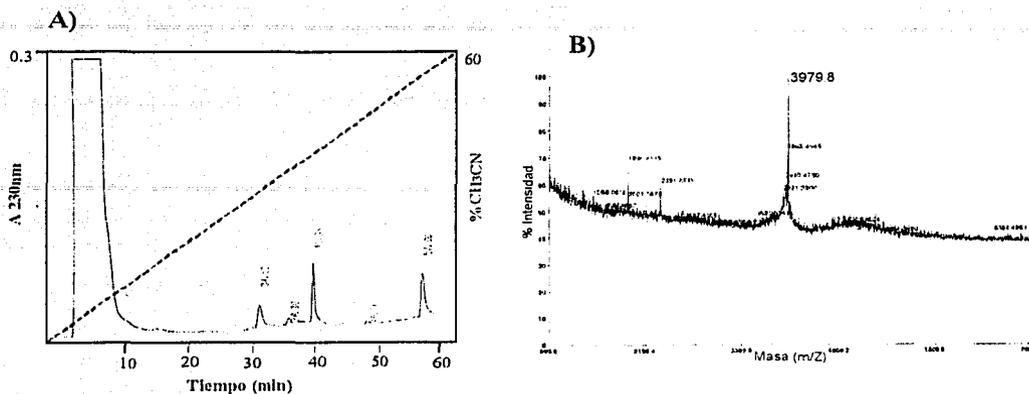


Figura 26. A) Reacción de plegamiento (Condición 3). B) Espectro de masas de la toxina sintética plegada.

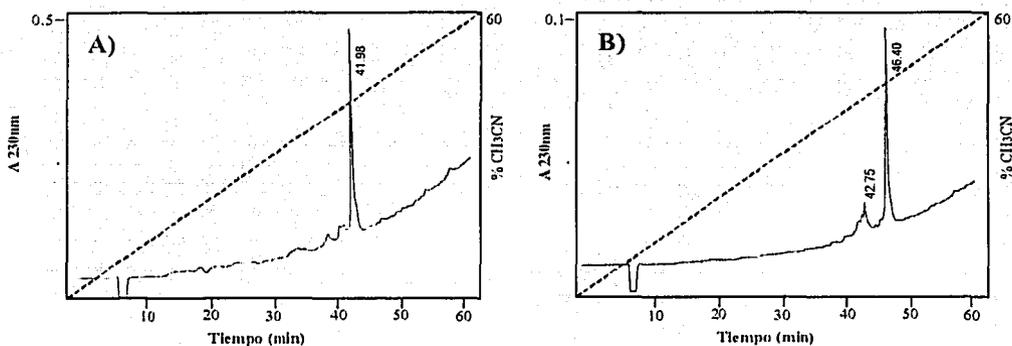


Figura 27. A) Coelución de las formas plegadas de la toxina sintética y la toxina nativa. B) Coelución de la toxina sintética y nativa, en forma reducida. La línea a trazos representa el gradiente lineal de CH_3CN empleado.

El cromatograma de la coelución de una mezcla equimolar de toxina sintética plegada y toxina nativa (Figura 27A y 27B), mostró la migración de un pico, lo cual refleja una misma conformación para las dos especies. Los ensayos de actividad para la toxina sintética plegada mostraron los mismos efectos que la toxina nativa.

La condición óptima de plegamiento obtenida para ω -conotoxina MVIIA y MVIIC no fué las más adecuadas para el plegamiento de GrTx1, la cual formó en su mayor parte precipitado. Este resultado muestra que la molécula lineal de GrTx1 tiende agregarse en un ambiente hidrofílico. Por otra parte, efecto favorable del buffer Tris-HCl para el plegamiento de GrTx1 podría atribuirse a su relativa hidrofobicidad la cual interacciona apropiadamente con la toxina, rica en residuos hidrofóbicos. Otro factor que podría contribuir a éste efecto favorable por parte del Tris, se debería al ion tris-hidroximetilamina, el cual resulta mejor contra-cación para los aniones del péptido representados por los residuos ácidos, lo cual podría implicar que las repulsiones intramoleculares entre los residuos ácidos serían la fuerza electrostática causantes de obstruir el correcto plegamiento en GrTx1.

El efecto favorable de GSSG en el plegamiento de GrTx1, estaría justificado en virtud del aumento de especies oxidadas, las cuales en el modelo de plegamiento de dos etapas, conllevarían a producir la conformación nativa.

Las ensayos de plegamiento asistido con la minichaperonina GroEl, aislada de *Entamoeba histolytica*, no produjeron estados plegados del péptido los cuales fueran detectables como cambios en el perfil de elución cromatográfica de la toxina reducida. No obstante los anteriores resultados, no se asevera la ineficacia de GroEl, ya que algunos factores como la pérdida de actividad por desnaturalización de la chaperona y/o condiciones de reacción desfavorables, estarían implicados en estos resultados. Se requerirían otros ensayos para verificar a GroEl y las condiciones favorables para que ella asistiera el plegamiento de GrTx1.

V.4 Ensayos de Actividad

V.4.1 Ensayos de actividad *in vivo*.

Los estudios preliminares de la actividad biológica de la toxina nativa GrTx1, así como los de la toxina sintética plegada *in vitro*, se realizaron en grillos de la especie *Acheta domestica*. Las dosis ensayadas y el efecto causado se resumen en la tabla V, en la cual se observa un efecto dosis-dependiente. Dosis de 10 a 63 μg GrTx1 nativa/g de grillo, causaron parálisis de los especímenes después de los 10 minutos de haber sido inyectados: iniciando ésta, con la parálisis de las patas traseras seguida de las patas delanteras y cese del canto. La recuperación de la movilidad normal fue gradual. Dosis de 180 $\mu\text{g/g}$ causaron la muerte dentro de 24 h. Algunas toxinas reportadas con efecto paralizante sobre insectos son HwTx-II y CvTx-II. HwTx-II de *S.hirsuta*, tiene una dosis media paralizante (ED_{50}) de $127 \pm 54 \mu\text{g/g}$ ($0.03 \mu\text{mol/g}$) y una dosis letal de 200 μg HwTx-II /g ($0.05 \mu\text{mol/g}$) en cucaracha, mientras que para la toxina insecticida especie-específica de *C.validus*, CvTx-II, la ED_{50} fue de $0.2 \mu\text{mol/g}$.

El efecto de la toxina sintética reducida y la plegada *in vitro* se ensayó por separado. Con la toxina sintética reducida no se observó ningún efecto diferente al de los grillos control, mientras que la toxina sintética plegada, a dosis de 10 $\mu\text{g/g}$ de grillo, causó parálisis con menor tiempo de recuperación que el observado para la toxina nativa a esta misma dosis. Estos datos nos indican que la toxina sintética requiere estar plegada correctamente para mostrar efecto, ya que la sintética reducida no lo tuvo.

Con el propósito de evaluar mejor un efecto cualitativo y cuantitativo de la toxinas, se realizaron también ensayos de la actividad en sistemas aislados para algunos canales iónicos que participan en la generación del potencial de acción

Tabla IV. Efecto dosis-repuesta de la toxina GrTx1 nativa y sintética plegada sobre grillos.

MUESTRA	DOSIS ($\mu\text{g/g}$ de grillo)	EFEECTO
Control	Agua (10 μl .)	No se observa parálisis
Toxina nativa	180 (0.045 $\mu\text{mol/g}$)	Muerte antes de 24 h.
Toxina nativa	65 (0.016 $\mu\text{mol/g}$)	Parálisis con recuperación de la movilidad después de 8h.
Toxina nativa	20 (0.005 $\mu\text{mol/g}$)	Parálisis con recuperación de la movilidad después de 5h.
Toxina nativa	10 (0.0025 $\mu\text{mol/g}$)	Parálisis con recuperación de la movilidad después de 3h.
Toxina Sint.Reducida	15 (0.004 $\mu\text{mol/g}$)	No se observa parálisis
Toxina Sint.Plegada	10 (0.0025 $\mu\text{mol/g}$)	Parálisis con recuperación de la movilidad después de 1h.

V.4.2 Efecto de la toxina plegada sobre canales de sodio y canales de potasio tipo ERG.

La toxina sintética plegada *in vitro*, se ensayó sobre las corrientes de sodio y potasio tipo ERG, siguiendo los protocolos de estimulación descrito en los métodos. El control positivo del ensayo fue la toxina nativa purificada a partir del veneno de la tarántula.

La dosis empleada para evaluar el efecto causado por la toxina sintética sobre éstas corrientes fue de 4 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para evaluar los efectos sobre las corrientes de sodio y potasio con la toxina nativa, se usarón dosis de 10 (2.5nM) y 5 (1.25nM) $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

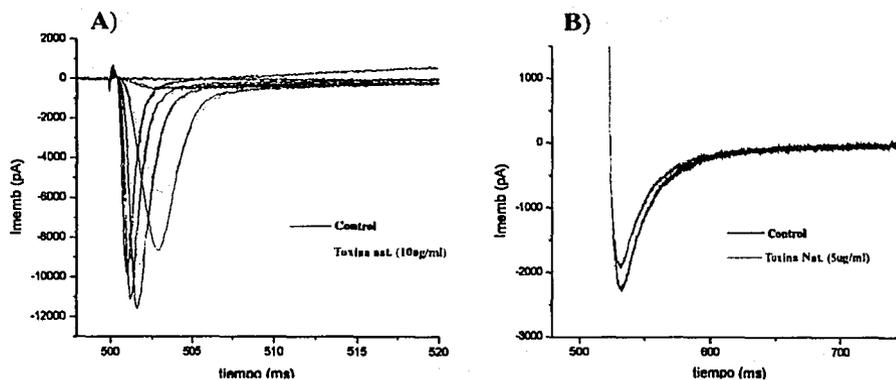


Figura 28. Registros de las corrientes de sodio A) y potasio tipo ERG B), de la toxina nativa GrTx1 del veneno de *G. rosea*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los registros de la corriente de sodio obtenidos sin toxina fueron corrientes entrantes muy rápidas, las cuales en presencia de la toxina nativa a 10 $\mu\text{g/ml}$ (2.5 nM) produjo una inhibición del 10% en la amplitud de la corriente, mientras que para las corrientes de potasio se observó una inhibición en la amplitud de la corriente del 20%. Estos datos indican la funcionalidad de la toxina sintética plegada *in vitro*, hecho que refleja que su estructura tridimensional se encuentra en una conformación igual a la nativa.

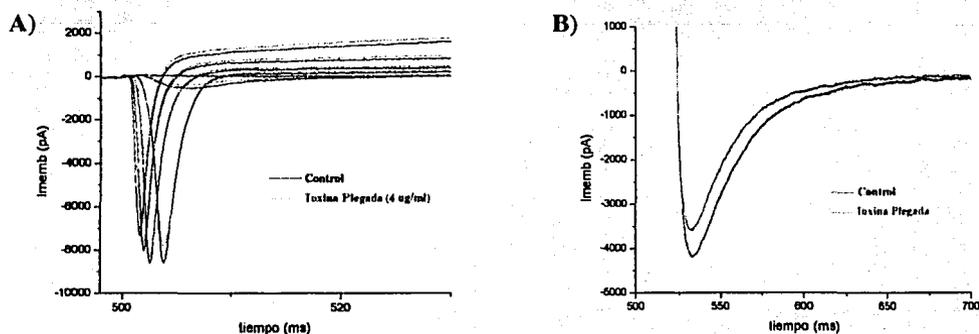


Figura 29. Registros de las corrientes de sodio (A) y potasio tipo ERG (B), de la toxina sintética GrTx1 plegada *in vitro*.

La actividad sobre canales de potasio ha sido hallada en numerosas toxinas aisladas de venenos de araña, ejemplo de ello son HaTx1 y HaTx2, aisladas de la especie *G. spatulata* (Takahashi et al., 2000), SGTx1 aislada de *S. griseipes* (Marvi et al., 1999) y las toxinas HmTx1 y HmTx2 de *H. maculata* (Escoubas et al., 2002^c), todas ellas actúan sobre canales de potasio voltaje dependiente.

V.4.3 Efecto de las fracciones I-VI del veneno de *G. rosea* sobre canales de sodio y canales de potasio tipo ERG.

Mediante la técnica de "Patch clamp" y empleando células tipo F11, se registraron las corrientes de sodio y potasio tipo ERG; el protocolo de estimulación se especificó en métodos. Sobre estas corrientes se ensayaron las fracciones II a la VI, obtenidas de la filtración en gel del veneno. El porcentaje de inhibición causado por cada una de ellas sobre las corrientes de sodio y potasio tipo ERG, se muestra en el histograma de la Figura 30. Estas fracciones se ensayaron a una dosis de 180 $\mu\text{g/ml}$.

La fracción que causó un mayor bloqueo en las corrientes de las corrientes de sodio fue la fracción IV, cuyo inhibición fue aproximadamente del 62 %, mientras que fracción II causó el mayor bloqueo de las corrientes de potasio, con una inhibición aproximada del 85 %. Esta fracciones serán objeto de estudio en futuros trabajos.

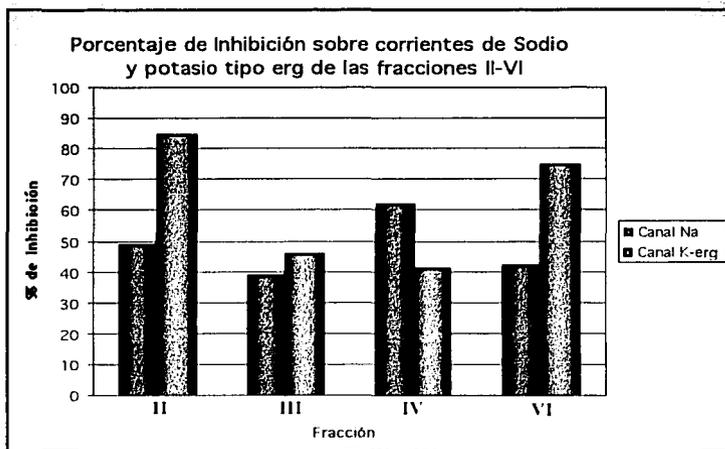


Figura 30. Histograma del porcentaje de inhibición sobre corrientes de sodio y potasio de las fracciones II, III, IV y VI del veneno de *G. rosea*.

V.5 Análisis de la estructura primaria y terciaria de GrTx.

V.5.1 Homología de secuencia de toxinas de la familia *Theraphosidae*.

De las 40 secuencias de toxinas de tarántulas obtenidas de la base de datos del NCBI y de algunas publicaciones, se seleccionaron 18 secuencias, las cuales cumplían con la característica de pertenecer a la familia de arañas *Theraphosidae*, su secuencia estaba completa y los enlaces disulfuros debían ser los establecidos para el ICK. La Figura 31 presenta el alineamiento de las 18 secuencia de toxinas peptídicas no redundantes, pertenecientes a tarántulas de la familia *Theraphosidae* reportadas hasta la fecha. En la parte superior se halla la secuencia de la toxina GrTx1, la cual es un péptido de 31 aminoácidos y constituye la toxina más abundante del veneno. A nivel de secuencia, GrTx1 presenta baja homología con las secuencias consideradas en el alineamiento, con la excepción de las toxinas GsMTX2, ProTx2y Gs-Seq-1, cuya identidad de secuencia fue del 90.0, 87.1 y 79.3 % respectivamente.

Oswald y colaboradores (2002) encontraron que GsMTX2 bloquea en un 45 % la corriente de canales de potasio mecanosensible, con una constante de asociación de $1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que Gs-Seq-1, se encontró que bloquea las corrientes en canales de potasio sensibles a voltage y ProTx2 bloquea canales de sodio (Middleton et al., 2002). Resultados arrojados por este trabajo, señalan a GrTx1 como una toxina que actúa bloqueando tanto corrientes sodio como corrientes de potasio tipo ERG.

A nivel de estructura primaria, este grupo en particular, satisface el motivo $C_1X_{3-7} C_{II}X_{3-9} C_{III}X_{0-7} C_{IV}X_{1-5} C_{V}X_{4-13}C_{VI}$, donde X es cualquier aminoácido y C son residuos de cisteínas, las cuales forman tres enlaces disulfuro ordenados como sigue: C_I-C_{IV} , $C_{II}-C_V$ y $C_{III}-C_{VI}$. El motivo $C_1X_{3-7} C_{II}X_{3-9} C_{III}X_{0-7} C_{IV}X_{1-4} C_{V}X_{4-13}C_{VI}$, es una versión más extendida del motivo $C_1X_{3-7} C_{II}X_{3-6} C_{III}X_{0-5} C_{IV}X_{1-5} C_{V}X_{4-13}C_{VI}$, propuesto por Pallaghy para toxinas peptídicas con la topología del ICK. En el motivo extendido, las cisteínas II y III pueden estar espaciadas de 3 a 9 residuos, mientras que el espaciamiento entre las cisteínas III y IV puede ser de 0 a 7 aminoácidos y entre las cisteínas IV y V puede estar comprendido entre 1 y 5 aminoácidos.

Aún cuando pocas toxinas de la Figura 31 tienen más del 50 % de homología a nivel de secuencia, la mayoría presentan las siguientes características:

1) El espaciamiento entre las cisteínas requiere de pocas sustituciones para un alineamiento idóneo y 2) La mayor parte de los péptidos tienen la CIII y CIV continuas, formando un doblete central.

Otro arreglo del motivo de cisteínas se encuentra en la toxina ESTX de *E. californicum* (Savel-Niemann, 1989), TXP1 de *B. smithii* (Kaiser et al., 1994) y en las dos isoformas de la toxina HwTX II de *S. huvena* (Shu and Liang, 1998), las cuales no presentan el doblete central conformado por las cisteínas III y IV. Se conoce por la estructura HwTX II, resuelta hace poco tiempo (Shu et al., 2002), que esta toxina presenta el arreglo de puentes disulfuro CI-CIII, CII-CV y CIV-CVI, diferente del patrón de puentes disulfuros hallados para el ICK, lo que establece otra topología diferente en estas toxinas y que probablemente sería la topología presente para las secuencias mostradas en la Figura 31 que no contienen el doblete central de cisteínas.

V.5.2 Análisis de Secuencia.

Las Figura 32 muestra el árbol filogenético construido con el algoritmo Neighbor-joining correspondiente a la 18 toxinas consideradas en el alineamiento múltiple de la Figura 31 el cual resultó idéntico a los obtenidos con los algoritmos Kitsh y Fitch, y debido a que no se conoce una secuencia ancestral que indique los estados de carácter de los cuales divergieron las secuencias consideradas, no se pudo enraizar. En él, se diferencian siete grupos principales, especificados de G1 hasta G7. Estos grupos en general, contienen toxinas que actúan a nivel de canales iónicos, como a nivel del receptor nicotínico de acetilcolina. El grupo 1, contiene tres toxinas del género *Grammostola*, las cuales actúan a nivel de canales de potasio: Gs-Seq-1, la cual actúa sobre canales de potasio sensible al voltaje, GsMTx2, que actúa a nivel de canales de potasio mecanosensible y GrTx1, actúa en canales de potasio tipo ERG y sobre canales de sodio. También se encuentra en este grupo la toxina ProTx2 de *Thrixopelma pruriens* que actúa a nivel de los canales de sodio tipo

<u>Especie</u>	<u>Toxina</u>	<u>Alineamiento de secuencia</u>	<u>% Id^a</u>	<u>% Hom^b</u>	<u>Actividad</u>
<i>Grammostola rosea</i>	GrTX1YCDWMWTC.....CC..GLVCA.....LWCAIIVW...	---	---	Canal Na ⁺ , K ⁺
<i>Grammostola spatulata</i>	GsMTX2YCDWMWTC.....CC..GLVCA.....LWCAIIVM...	87.1	90.3	Canal K ⁺ -MCS
<i>Grammostola spatulata</i>	Gs Seq1YCDWLWTC.....CC..GMVCA.....LWCAIX.....	79.3	89.6	Canal K ⁺
<i>Thrixopelma pruriens</i>	ProTX2YCDWMWTC.....CC..GMVCA.....LWCAIILW...	90.0	96.6	Canal Na ⁺
<i>Brachypelma smithii</i>	Tx2-9CVFQTC.....CCG..LVCSSRW..WCVYV..F..	29.6	40.7	Canal K ⁺
<i>Grammostola spatulata</i>	GsMTX4GCLFWWC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	32.1	39.3	Canal K ⁺ -MCS
<i>Grammostola cala</i>	HaTx1CYLFGGC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	26.7	30.0	Canal K ⁺
<i>Grammostola cala</i>	HaTx2CYLFGGC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	26.7	30.0	Canal K ⁺
<i>Scodra griseipes</i>	SgTx1TCYLFGGC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	30.0	30.0	Canal K ⁺
<i>Hysteroocrates gigas</i>	SNX-482	GVKAGCNYMFGGC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	22.6	29.0	Canal Ca ²⁺
<i>Grammostola spatulata</i>	ωGrTx1S1ACVFWGC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	25.8	38.7	Canal Ca ²⁺
<i>Thrixopelma pruriens</i>	ProTx1CYWLGGSAG.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	40.7	44.4	Canal Na ⁺
<i>Selenoscomia huwena</i>	HWTX1XCGVFACTEG.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	34.5	37.9	R. Nic.AcC
<i>Selenoscomia huwena</i>	HWTX-II2	...LFCSFSC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	23.3	36.7	R. Nic.AcC
<i>Selenoscomia huwena</i>	HWTX-III1	...LFCSFSC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	23.3	33.3	R. Nic.AcC
<i>Brachypelma smithii</i>	TXP1	...IFCVFSC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	33.3	40.7	R. Nic.AcC
<i>Euripelma californicum</i>	EsTx-4.3	...IFCVFSC.....CC..LVCCLF..LVCFF..A..	31.0	44.0	R. Nic.AcC
<i>Coremiocnemis validus</i>	CvTX2ACSRAGCYR..GRCC..GLYCAAYV..VTCYR.....	32.1	50.0	Insecto

Paul K. Phallaghy: CX_{3,7} CX_{3,6} CX_{0,5} CX_{1,4} CX_{4,13} C
Theraphosidae: CX_{3,7} CX_{3,6} CX_{0,5} CX_{1,4} CX_{4,13} C

FIGURA 31. Alineamiento de secuencia de toxinas pertenecientes a tarántulas de la familia *Theraphosidae* con similar estructura y modo de acción conocida. En la parte derecha al alineamiento se colocó el el porcentaje de identidad y homología de las secuencias respecto a la toxina GrTx1.

^a Porcentaje de Identidad.

^b Porcentaje de Homología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Na_v1.2, Na_v1.5, Na_v1.7 y Na_v1.8. Todas estas toxinas tienen la característica de presentar las cisteínas III y IV continuas en un doblete central, además de tener alta identidad de secuencia entre ellas. El grupo 2 lo conforma sólo la toxina HwTx-I de *Selenocosmia huwena*, la cual tiene las cisteínas III y IV continuas y se halla menos relacionada por secuencia con HwTx-II pero actúa igualmente, sobre el receptor nicotínico de acetilcolina. Por su parte, el grupo 3 lo conforman las toxinas ω -GsTx-SIA, HaTx-I y HaTx-II de *Grammostola spatulata*, SNX-482 de *Hysteroocrates gigas* y la toxina SgTx-1 de *Scodra griseipes*. HaTx-I, HaTx-II y SgTx-1 bloquean canales de potasio. GsTx-SIA y SNX-482 bloquean canales de calcio pero guardan poca similitud de secuencia entre ellas. SNX-482 se observa más emparentada con las toxinas HaTx-I, HaTx-II y SgTx-1, que actúan a nivel de canales de potasio, por lo que se esperaría que la toxina de *H. gigas*, tuviera también acción sobre estos canales. El grupo 4 contiene sólo a la toxina ProTx1 de *Thrixopelma pruriens*, la cual al igual que ProTx2, agrupada en G1, actúa sobre los canales de sodio tipo Na_v1.2, Na_v1.5, Na_v1.7 y Na_v1.8 pero su secuencia se encuentra poco emparentada con ProTx2. En el grupo 5 se agrupan la toxina mecanosensible GsMTx-4 de la especie *G. rosea* y la toxina voltaje dependiente Tx2.9 de *B. smithi*. Debido a que GsMTx-4 actúa también en canales de potasio mecanosensible como lo hace GsMTx-2, se pensaría que existe una relación más cercana con el grupo 1, sin embargo, sus posiciones en el árbol no los relaciona directamente y podría especularse cierta convergencia funcional por parte de estas toxinas. El grupo 6, contiene bifurcada su rama y en una de ellas se agrupan dos toxinas correspondientes a las isoformas de HwTx-II de la especie *Selenocosmia huwena* y en la otra rama se encuentran las otras dos toxinas, la TXP-1 y ESTX-4.3 de *Brachypelma smithi* y *Euripelma californicum* respectivamente. Estas cuatro toxinas se presentan como grupos emparentados, debido a que tienen alta identidad de secuencia, aún cuando provienen de especies diferentes; presentan además, la particularidad de no tener las cisteínas III y IV continuas y se conoce recientemente que HwTx-II no presentan el patrón de enlaces disulfuro del ICK, por tanto se esperaría que todas estas cuatro toxinas presentaran igual topología. Todo el grupo 6, integra toxinas que actúan a nivel del receptor nicotínico de acetilcolina. Por último, el grupo 7 está

conformado por CvTx-II, la cual actúa sobre insectos, pero su acción específica sobre blancos moleculares se desconoce y por inferencia filogenética resulta difícil asignarle algún tipo de función, debido a que su secuencia está muy poco relacionada con las demás toxinas en general

La amplitud en el conocimiento actual de las toxinas de araña, no permite definir claramente una relación estructura-función similar al trabajo hecho con las toxinas de escorpión o caracol.

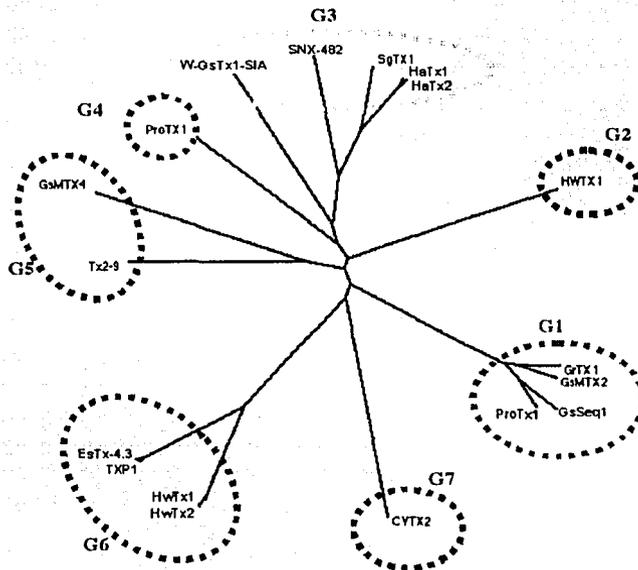


Figura 32. Arbol filogenético de las toxinas de la familia *Theraphosidae*, basado en el alineamiento múltiple del Clustal X. En el árbol se hace la distinción arbitraria de siete grupos, en uno de los cuales (G1), se encuentra agrupada la toxina GrTx1 de la tarántula *Grammostola rosea*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V.4.3 Modelo estructural de la toxina GrTx1

GrTx1 es un péptido de 31 aminoácidos, el cual constituye el componente mayoritario del veneno de *G. rosea*. El alineamiento de su secuencia contra otros péptidos de tarántulas de la familia *Theraphosidae* se muestra en la Figura 31, donde se observa que esta toxina presenta una identidad de secuencia alrededor de un 90% con las toxinas GsMTx2 y GSSeq-1, de las cuales, sólo GsMTx2 tiene su estructura tridimensional resuelta (Id PDB: 1LUP).

Debido a que GrTx1 presenta una alta identidad con GsMTx2, se asumió una homología estructural entre estas dos toxinas y se tomó a GsMTx2 como templado para realizar el modelo estructural de GrTx1. Estas toxinas difieren entre ellas sólo en tres de sus residuos localizados en el extremo carboxilo terminal.

HaTx1	ECRYLFWGGCKTTSDCCKHLGCKFRDKYCAWDFTF	
GsMTx2	YCQKWMWTCDEERKCEGLVC	RLWCKRIINM
GrTx1	YCQKWMWTCDEERKCEGLVC	RLWCKKKIEW

Figura 33. Secuencias de toxinas homologas a GrTx1 que actúa sobre canales de potasio.

La estructura secundaria de GrTx1 está compuesta de tres hebras β , formadas por los residuos W17 a C9 (hebra β 1), L19 a R22 (hebra β 2) y W24 a R27 (hebra β 3). Las hebras β 2 y β 3 forman una hoja antiparalela y la hebra β 1 cruza sobre las dos primeras. Como es típico del ICK (o más ampliamente, el motivo alfa/beta estabilizado por cisteína, "Cs $\alpha\beta$ ") el enlace disulfuro establecido entre la cisteína tres y seis penetra el anillo de 14 miembros formado por los enlaces disulfuro CI-CIV y CII-CV, que unen los péptidos CII-Q3-K4-W5-M6-W7-T8-CIII y C16-E17-G18-L19-V20-C21.

La traza del plegamiento y los tres enlaces disulfuros de los dos péptidos se superpone exactamente, permitiendo una predicción espacial real de los residuos conservados (Figura 34b). La diferencia entre GsTx1 y GsMTx2 se dió claramente a nivel de superficie y distribución de cargas del extremo carboxilo terminal en donde las cadenas laterales de Lys26, Lys27 y Lys 28 se encuentran opuestas, confiriéndole al extremo carboxilo terminal una forma ramificada y positiva, mientras que en GsMTx2 el extremo carboxilo terminal se halla en una forma más compacta y principalmente hidrofóbica debido a los residuos no polares de isoleucina, ocasionando claramente diferencias en el potencial electrostático sobre esta región en cada molécula.

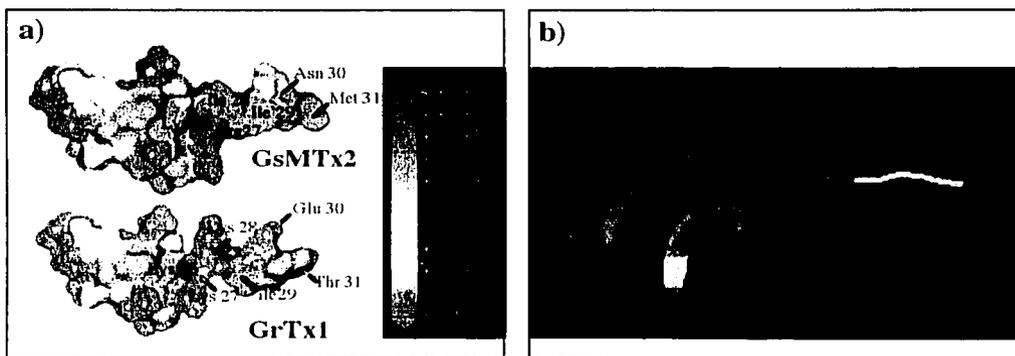


Figura 34. a) Comparación de la superficie del modelo estructural de GrTx1 con GsMTx2. b) Superposición de las estructuras en forma de trazas de GrTx1 (Azul) y GMTx2 (Rojo).

En GsMTx2, Oswald y colaboradores han identificado una microárea hidrofóbica (residuos en verde de la Figura 33) rodeado por residuos cargados ubicada hacia el extremo amino terminal, la cual es común en toxinas como HaTx1 y se ha relacionado con el sitio de unión directa a canales de potasio. Además una leucina conserva en varias secuencias de

toxinas con esta topología y localizada dos residuos antes de la cisteína cinco la cual, podría estabilizar la microárea hidrofóbica y/o facilitar el plegamiento y formación de disulfuros. Estas características analizadas para GsMTx2 también son extrapolables a la toxina GrTx1.

Una evaluación de la homología estructural de GrTx1 con GsMTx2 por el servidor de reconocimiento de plegamientos del "Imperial College of Science, Technology and Medicine" (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk>) arrojó un valor del 87% y un 53% de homología estructural con Heteropodatoxina 2 (HpTx2), un péptido de 30 residuos (Id PDB:1EMX) de *Heteropda venatoria*, una araña del suborden *araneomorphae*, que actúa también en sobre canales de potasio (Figura 35).



Figura 35. Comparación de la estructura de GrTx1 con estructuras que adoptan la topología del ICK. Huwetoxtin-1 (HwTx-1), Hanatoxina-1 (HaTx1), y Heteropodatoxian-2 (HpTx2). Huwetoxtin-II (HwTx-II) presentó una topología diferente.

En la Figura 35 se muestran Algunas estructuras con la topología del ICK para las cuales el patrón de enlaces disulfuro entre las cisteínas I-IV, II-V y III-VI es común. No obstante Huwetoxin-II, un péptido insecticida aislado de la tarántula *S. huvenca* no presenta el arreglo típico de enlaces disulfuros hallados para el ICK. La resolución de la estructura de este péptido, considerado en el alineamiento de la Figura 31, mostró el arreglo de disulfuros entre las cisteínas I-III, II-V y IV-VI. Su alta homología a nivel de estructura primaria con las toxinas EsTx-4.3 y TxP1 (ver Figura 31) sugiere que el plegamiento y su patrón de puentes disulfuros de estas moléculas podría ser muy similar, aunque para ellas hallan sido reportado los enlaces entre las cisteínas I-IV, II-V y II-VI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. CONCLUSIONES

A partir del veneno de la especie *G. rosea*, se logró identificar y aislar la toxina GrTx1 la cual tuvo actividad sobre canales de potasio tipo erg y sobre canales de sodio. Estos canales son los responsables en en gran medida de la generación del potencial de acción. Las fracciones II a la VI, obtenidas de la filtración en gel, presentaron también actividad sobre los canales de sodio y potasio. Además, la fracción III presentó actividad sobre canales de calcio, éstas fracciones actualmente se están estudiando y caracterizando algunos de sus componentes

La diversidad de actividades sobre canales iónicos observadas en el veneno de *G. rosea* convierte a este veneno en un material de interés de estudio.

Se obtuvo en condiciones *in vitro* el plegamiento de la conformación nativa de GrTx1 a partir de un péptido sintético y totalmente reducido, empleando buffer Tris pH 7.8 y una mezcla de GSH[0.5 mM]/GSSG[2 mM], con una eficiencia en la reacción de plegamiento del 45 %.

De los 138 registros de toxinas de arañas depositadas en la base de datos el National Center of Biological Information, NCBI (<http://www.ncbi.nih.nlm.gov>), 16 secuencias de toxinas pertenecen a la familia *Theraphosidae* o tarántulas. Esta estrecha disposición del número de éstas toxinas, impidió establecer un criterio de la relación estructura-función, semejante al trabajo realizado con las toxinas de alacrán o caracol de mar.

TESIS CON
PANEL DE CALIFICACION

ESTA TESIS
DE LA BIBLIOTECA

No obstante lo anterior, con el número de toxinas disponibles, se observó a nivel de estructura primaria que, en general, las toxinas de la familia *Theraphosidae* presenta un patrón de cisteínas como en las toxinas de escorpión o caracol. Mas allá de este patrón conservado, la similitud entre las secuencias es baja. A nivel de estructura terciaria, los pocos ejemplos a los que se les ha resuelto la estructura tridimensional presentan la topología de un nudo estabilizado por enlaces disulfuros entre las cisteínas.

La relación establecida a partir del alineamiento de secuencia agrupó a la toxina GrTx1 dentro del grupo de toxinas que actúan sobre canales de potasio.

La construcción de un modelo estructural mostró unas diferencias en el extremo carboxilo terminal con respecto al templado, además de microáreas características comunes con otras toxinas que actúan sobre canales de potasio, las cuales estarían involucradas en la unión al canal.

VII. REFERENCIAS

- ADAMS, M.E., Bindokas, V.P., Hasegawa, L., venema, V.J. (1990). ω -Agatoxins: Novel Calcium Channel Antagonists of Two Subtypes from Funnel Web Spider (*Agelenopsis aperta*). *J. Biol. Chem.* **265**: 861-867.
- ASHOK-BALAJI, R., Sasaki, T., Gopalakrishnakone, P., Sato, K., Manjunatha Kini And Boon-Huat Bay. (2000). Purification, structure determination and synthesis of covalintoxin-II, a short insect-specific neurotoxic peptide from the venom os the *Coremiocnemis validus* (Singapore tarantula). *FEBS Letters.* **474**: 208-212
- BALDWIN, R.L. (1989). How does protein folding get started?. *Trends Biochem.* 291-294.
- BERNARD, C., Legros, C., Ferrat, G., Bischof, U., Marquardt, A., Pongs, O., Darbon, H. (2000). Solution structure of HpTX2, a toxin from *Heteropoda venatoria* spider that blocks Kv4.2 potassium channel. *Prot. Sci.* **9**: 2059-2067.
- BRISTOWE, W.S. : Phylogeny and Systematicscapitlo. Biology of spiders, second edition. Edit. Rainer F. Foelix, pp.265. Oxford University Press. N.Y., USA, 1996.
- BODE, F., Sachs, F., Franz, M.R., 2001. Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature.* **409**: 35-36.
- BOTEMS, F., Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljanski, Y., M nez, A. and Toma, F. (1991). Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by ¹H NMR. Charybdotoxin possesses a structural motif found in other scorpion toxins. *Eur.J.Biochem.* **196**: 19-28.
- BUCKLE, A.M., Zahn, R. and Fersht, A.R. (1997). A structural model for GroEl-polypeptide recognition. *Biochemistry.* **94**: 3571-3575.
- CABBINES, S.G., Gehrke, C.w., Kuo, K.C., Chan, T.K., Hall, J.E., Hediburg, S.A., Odell, G.V. (1980) Polyamines in some tarantula venoms. *Toxicon.* **18**: 681-683.
- CHANG, Jui-Yoa. (1993). Identification of Productive Folding Intermediates Wich Account for the Flow of Protein Folding Pathway. *J. Biol. Chem.* **268**: 4043-4049.
- CHANG, J.Y., Canals, F., Schindler, P., Quero, E., Aviles, F.X. (1994). The Disulfide Folding Pathway of Potato Carboxypeptidase Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **269**: 22087-22094
- CHATRENET, B., Chang, J-Y. (1993) The Disulfide Folding Pathway of Hirudin Elucidated by Stop/Go Folding Experiments. *J. Biol. Chem.* **268**: 20988-20996.
- CHEN, T.R., Dorotinsky, C., Macy, M., Hay.R. (1989). Cell identity resolved. *Nature.* **340**: 106.
- CORZO, G., Villegas, E., G mez-Lagunas, F., Possani, L.D., Belokoneva, O.S. and Nakajima, T. (2002) Oxyopinins. Large Amphiphatic Peptides Isolated from the Venom of the Wolf Spider *Oxyopes kitabensis* with Cytolytic Properties and Positive Insecticidal Cooperativity with Spider Neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **277**: 23627-23637.
- CREIGHTON, T. E. (1985). The Problem of How and Why Proieins Adopt Folded conformations. *J. Phys. Chem.* **89**: 2452-2459.

- CREIGHTON, T. E.**, Protein Folding. Edited by Tomas Creighton. N.Y., USA. 1992.
- DURAN-RENALS, F.** (1936). The invasion of body by animal poisons. *Science*, N.Y. **83**: 286.
- ERTEL, E.A.**, Warrant, V.A., Adams, M.E., Griffin, P.R., Cohen, C.J., Smith, M.M. (1994). Type III ω -Agatoxins: A Family of Probes for Similar Binding Sites on L- and N-Type Calcium Channels. *Biochemistry*. **33**: 5098-5108.
- ESCOUBAS, P.**, Diochot. S., Corzo, G. (2000^a). Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*. **82**: 893-907.
- ESCOUBAS, P.**, Corzo, G., Whiteley, B.J., Cel rier, M.L., Nakajima, T. (2000^b) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and High-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Biochimie*. **82**: 893-907.
- ESCOUBAS, P.**, Diochot, S., C l rier, M.-L., Nakajima. T. and Lazdunski, M. (2002^c). Novel Tarantula Toxins for Subtypes of Voltage-Dependent Potassium Channels in the Kv2 and Kv4 Subfamilies. *Mol. Pharmacol.* **62**: 48-57.
- FENTON, A.W.**, West. P.R., Odell, G.V., Hudiburg, S.M., Owny, C.L., Mills, J.N., Scroggins, B.T., Shannon, S.B. (1995). Arthropod venom citrate inhibits phospholipase A₂. *Toxicon*. **33**: 763-770.
- FLETCHER, J.I.**, Dingley, A.J., Smith, R., Connor, M., Christie, M.J., King, G.F. (1999). High-resolution solution structure of gurmarin, a sweet-taste-suppressing plant polypeptide. *Eur. J. Biochem.* **264**: 525-533.
- FOELIX, Rainer F.**, Phylogeny and Systematic. Biology of spiders, second edition. Edit. Rainer F. Foelix., Oxford University Press. N.Y., USA. 1996.
- FRAND, A.R.**, Cuozzo, J.W. and Kaiser, C.A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *trends in CELL BIOLOGY*. **10**: 203-210.
- FREEDMAN, Robert B.** (1984). Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. *Trends Biochem. Sci.* **9**,438-441.
- GARCÇA L.M.**, Hanner, M., Knaus, H-G., Koch, R., Shmalhofer, W., Slaughter, R.S., Kaczorowski, G.J. (1977). Pharmacology of Potassium Channels. *Advances in Pharmacology*. **39**: 425-471.
- GEREN, C.R.**, Odell, G.V., The Biochemistry of spideer venoms. In Handbook of Natural Toxins, Vol. 2. Edited by A.T.Tu., pp. 441. Marcell Dekker, Inc. N.Y., USA, 1984.
- GETHING, Mary-Jane.**, Sambrook. Joseph. (1992). Protein folding in cell. *Nature*. **355**: 33-45
- GRISHIN, Eugene.** (1998). Black widow spidertoxins: The present and the future. *Toxicon*. **36**: 1693-1701.
- GRISHIN, Eugene.** (1999). Polypeptide neurotoxins from spider venoms. *Eur. J. Biochem.* **264**: 276-280.
- HENKEL, Andreas.W.**, Sankaranarayanan, Sethuraman. (1999). Mechanisms of α -latrotoxin action. *Cell Tissue Res.* **296**: 229-233.
- HERMANSON, G.T.** Bioconjugate Techniques. Pp. 133. Academic press, Inc. USA, 1996.

- HISADA, M., Fujita, T., Naoki, H., Itagaki, Y., Irie, H., Miyashita, M., Nakajima, T. (1998) Structures of spider toxins: Hydroxyindole-3-acetyl polyamines and a new generalized structure of type-E compounds obtained from the venom of the Joro spider. *Nephila clavata*. *Toxicon*. **36**: 1115-1125.
- HOROWITZ, P.M. (1999) Ironing out the protein folding problem. *Nature*. **17**: 136-137.
- ISAACS, N.W. (1995) Cystine Knots. *Current Opinion in Structural Biology*. **5**: 391-395.
- KAISER, I.I., Griffin, P.R., Aird, S.D., Hudiburg, S., Shabanowitz, J., Francis, B., John, T.R., Hunt, D.F., Odell, G.V. (1994). Primary structures of two proteins from the venom of the mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). *Toxicon*. **32**: 1083-1093.
- KEITH, R.A., Mangano, T.J., Lampe, R.A., DeFeo, P.A., Hyde, M.J., Danzanti, B.A. (1995) Comparative Actions of Synthetic ω -Grammotoxin SIA and Synthetic ω -Aga-IVA on Neuronal Calcium Entry and Evoked Release of Neurotransmitters *In Vitro* and *In Vivo*. *Neuropharmacology*. **34**: 1515-1528.
- KIM, P.S. and Baldwin, R.L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 631-660.
- KIM, J.II., Konishi, S., Iwai, H., Kohno, T., Gauda, H., Shimada, I., Sato, K., Arata, Y. (1995). Three-dimensional Solution Structure of the Calcium Channel Antagonist ω -Agatoxin IVA: Consensus Molecular Folding of Calcium Channel Blockers. *J. Mol. Biol.* **250**: 659-671.
- KUHN-NENTWIG, L., Muller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M., Nentwig, W. (2002). Cupiennin 1, a New Family of Highly Basic Antimicrobial Peptides in the Venom of Spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *J. Biol. Chem.* **277**: 11208-11216.
- LAMPE, R.A., DeFeo, P.A., Davison, M.D., Young, J., Herman, J.L., Spreen, R.C., Horn, M.B., Mangano, T.J., Keith, R.A. (1993). Isolation and Pharmacological Characterization of ω -Grammotoxin SIA, a Novel peptide Inhibitor of Neural Voltage-Sensitive Calcium Channel Responses. *Mol. Pharmacol.* **44**: 451-460.
- LIANG, S.P., Zhang, D.Y., Pan, X., Chen, Q., Zhou, P.A. (1993). Properties and amino acid sequence of Huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom of the chinese bird spider *Selenocosmia huvenana*. *Toxicon*. **31**: 969-978.
- LYLES, M.M. and Gilbert, H.F. (1991). Catalysis of the Oxidative Folding of Ribonuclease A by Protein Disulfide Isomerase: Dependence of the Rate on the Composition of the Redox Buffer. *Biochemistry*. **30**: 613-619.
- MARVI, L., De, Emmanuelle., Cosette, P., cagnon, J., Molle, G., Lange, C. (1999). Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1. The first toxin purified from the venom of the spider *Scodra griseipes*. *Eur. J. Biochem.* **265**: 572-579.
- MASIAC, Yves., Las Ara as., Editorial Vecchi, S.A. 1996
- MCCORMICK, K.D., Meinwald, J. (1993) Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. *J. Chem. Ecol.* **19**: 2411-2451.

- McDONALD, N.Q., Hendrickson, W.A. (1993). A Structural Superfamily of Growth Factors Containing a Cystine Knot Motif. *Cell*. **73**: 421-424.
- MEN Z. A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Toma, F. (1992). Structural basis for functional diversity of animal toxins. *Agredings of the Royal Society of Edinburgh*, **99B** (1/2), 83-103.
- MIDDLETON, R.E., Warren, V.A., Kraus, R.L., Hwang, J.C., Liu, C.J., Dai, G., Brochu, R.M., Kohler, M.G., Gao, Y.-D., Garsky, V.M., Bogusky, M.J., Mehl, J.T., Cohen, C.J. and Smith, M.M. (2002). *Biochemistry*. **41**: 14734-14747.
- NARASIMHAN, L., Singh, J., Humblet, C., Guruprasad, K. and Blundell, T. (1994). Snail and spider toxins share a similar tertiary structure and Cystine motif. *Struct. Biol.* **1**: 850-852.
- NEWCOMB, R., Palma, A., Fox, J., Gaur, S., Lou, K., Chung, D., Cong, R., Bell, J.R., Horne, B., Nadasdi, L., Ramachandra, J. (1995). SNX-325, A Novel Calcium Antagonist from the Spider *Segestria florentina*. *Biochemistry*. **34**: 8341-8347.
- NEWCOMB, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J.A., Dooley, D.J., Nadasdi, L., Tsien, R.W., Lemos, J., Miljanich, G. (1998) Selective Peptide Antagonist of the Class E Calcium Channel from the Venom of the Tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry*. **37**: 15353-15362
- NORTON, R.S., Pallaghy, P.K. (1998). The Cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptide. *Toxicon*. **36**: 1573-1583.
- ODELL, G.V., Fenton, A.W., Ownby, C.L., Doss, M.P., Schmidt, J.O. (1999). The Role of Venom Citrate. *Toxicon*. **37**: 407-409.
- OLIVER, D., Baukowitz, T., Fakler, B. (2000) Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem*. **267**: 5824-58-29.
- OMECINSKY, D.D., Holub, K.E., Adams, M.E., Reily, M.D. (1996). Three-Dimensional Structure Analysis of μ -Agatoxins: Further Evidence for Common Motifs among Neurotoxins with Diverse Ion Channel Specificities. *Biochemistry*. **35**: 2836-2844.
- ORI, Masahisa., Ikeda, Hiroyoshi. (1998). Spider Venoms and Spider Toxins. *Journal of toxicology*. **17**: 405-426.
- OSWALD, R.E., Suchyna, T.M., McFeeters, R., Gottlieb, P., Sachs, F. (2002). Solution Structure of Peptide Toxins that Block Mechanosensitive Ion Channels. *J. Biol. Chem*. **277**: 34443-34450.
- PALLAGHY, P.K., Nielsen, K.J., Craik, D.J., Norton, R.S. (1994) A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded β -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci*. **3**: 1833-1839.
- PALLAGHY, P.K., Alewood, D., Alewood, P.F., Norton, R.S. (1997) Solution structure of robustoxin from the funnel-web spider *Atrax robustus*. *FEBS Letters*. **419**: 191-196.
- PIGIET, V.P. and Schuster, B.J. (1986). Thioredoxin-catalyzed refolding of disulfide-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **83**: 7643-7647.

- PLATIKA, D., Boulos, M.H., Baizer, L., Fishman, M.C. (1985) Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *PNAS*. **82**: 3499-3505.
- PLATNICK, N.I. 2000 The World of Spider Catalog. The American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/entomology/spiders>.
- PERRETT, S., Zahn, R., Stenberg, G. and Fersht, A. (1997). Importance of Electrostatic in the Rapid Binding of Polypeptides to GroEL. *J. Mol. Biol.* **269**: 892-901.
- PRICE-CARTER, M., Gray, W.R. and Goldenberg, D.P. (1996). Folding of ω -Conotoxins. I. Efficient Disulfide-Couple Folding of Mature sequence *in Vitro*. *Biochemistry*. **35**: 15537-15546.
- QU, Youxing, Liang, S., Ding, J., Liu, X., Zhang, R. and Gu, X. (1997). Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies on Huwetoxin-I from the Venom of the Spider *Selenocosmia huwena*: 2. Three-Dimensional Structure in Solution. *J. Protein. Chem.* **16**: 565-574.
- RANKIN, Wayne and Walls, Jerry G., The Guide to Owning Tarantulas and scorpions (2000). TFH Publications, Inc. N.J. USA.
- RASH, L.D., Hodgson, W.C. (2000) Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, **40**: 225-254.
- REILY, M.D., Holub, K.E., Gray, W.R., Norris, T.M., Adams, M.E. (1994). Structure-activity relationships for P-type calcium channel-selective ω -agatoxins. *Struc. Biol.* **1**: 853-856.
- SABATIER, J.M. Chemical Synthesis and Characterization of Small Protein. Animal Toxins Facts and Protocols., Edited by Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.F., Germany, 2000.
- SAIBIL, H.R. (2000). The black widow's versatile venom. *Nature Struct. Biol* **7**: 3-8.
- SAVEL-NIEMANN, Anette. (1989) Tarantula (*Eurypelma californicum*) Venom, a Multicomponent System. *Biol.Chem.* **370**: 485-489.
- SCHGGER, Hermann and Gebhard, Von Jagow. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of Protein in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- SHU, Q. and Liang, S.P. (1999) Purification and characterization of huwetoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J. Peptide Res.* **53**: 486-491.
- SCHULTZ, Stanley A., Schultz, Marguerita J. The Tarantula Keeper's Guide. Edit. Schultz, Stanley A. Schultz and Marguerita J. Schultz. Hong-Kong, 1998.
- SHU, Qin and Liang, Song-Ping. (1998). Purification and characterization of huwetoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J. Peptide Res.* **53**: 486-491.
- SHU, Qin., Lu, Shan-Yun., Gu, Xiao-Cheng., Liang, Song-Ping. (2002). The structure of spider toxin huwetoxin-II with unique disulfide linkage: Evidence for structural evolution. *Protein science.* **11**: 245-252.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- SHEUMACK**, D. D., Carroll, P. R., Hamoson, F., Howden, M. E. H., Inglis, A. S., Roxburgh, C. M., Skorulis, A. and Strike, P. M. (1983). The isolation and N-terminal sequence of the lethal neurotoxin from the venom of the male Sydney funnel web spider, *Atrax robustus*. *Toxicon, Supplement 3*: 397-400.
- STRATTON**, M.R., Reeves, B.R., Cooper, C.S. (1989). Misidentified cell. *Nature*. **337**: 311-312.
- SUCHYNA**, T.M., Johnsson, J.H., Hamer, K., Leykam, J.F., Gage, D.A., Clemo, H.F., Baumgarten, C.M., Sachs, F. (2000). Identification of Peptide Toxin from Grammostola spatulata Spider venom that Blocks Cation-selective Stretch-activated Channels. *J. Gen. Physiol.* **53**: 583-598.
- SUDHOF**, T.C. (2001). α -Latrotoxin and Its Receptors: Neurexins and C1RL/Latrophilins. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 933-962.
- SWARTZ**, K.J., MacKinnon, R. (1995). An Inhibitor of the Kv2.1 Potassium Channel Isolated from the Venom of a Chilean Tarantula. *Neuron*. **15**: 941-949.
- TAKAHASHI**, H., Kim, J.I., Min, H.J., Saato, K., Swartz, K.J., Shimada, J. (2000). Solution Structure of Hanatoxin1, a Gating Modifier of Voltage-dependent K⁺ Channels: Common Surface Features of Gating Modifier Toxins. *J. Mol. Biol.* **297**: 771-780.
- USHERWOOD**, P.N.R., Blagbrough, I.S. (1991). Spider toxins affecting glutamate receptors. *Pharmacol. Ther.* **52**: 245-286.
- VEIGA**, S.S., da Silveira, R.B., Dreyfuss, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C., Gremski, W. (2000). Identification of high molecular weight serine-protease in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*. **38**: 825-839.
- VITA**, C., Roumestand, C., Toma, F., Ménez, A. (1995). Scorpion toxins as natural scaffolds for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 6404-6408.
- WILLIAMS**, Keith. (1997) Interactions of polyamines ion channels. *Biochem. J.* **325**: 289-297.
- YU**, H., Rosen, M.K., saccomano, N.A., Phillip, D., Volkmann, R.A., Schreiber, S.L. (1993). Sequential Assignment and Structure Determination of Spider Toxin ω -Aga-IVB. *Biochemistry*. **32**: 13123-13129.
- ZHANG**, Dongyi and Liang, Songping., (1993). Assignment of the Three Disulfide Bridges of Huwetoxin-I, a Neurotoxin from the Spider Selenocosmia huwena. *J. Protein. Chem.* **12**: 735-740.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN