



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

**Análisis bioquímico de componentes
del veneno del alacrán mexicano *Vaejovis
mexicanus smithi***

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

(a) L. Q. F. B. Saida Patricia Salas Castillo

Director de tesis: Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista

CUERNAVACA, MORELOS



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.

Esta tesis de maestría se realizó en el laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos y en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista. Este proyecto fue financiado por: CONACYT 47879-Q, DGAPA 214705 concedidos al Dr. Cesar Batista y al CONACYT-Fondo Salud 2005-01-14109 al Dr. Possani. Se contó con el apoyo de beca de postgrado otorgada por CONACYT No. 189543

Asesor del proyecto**Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista****Comité Tutorial****Dr. María Brenda Valderrama Blanco****Dr. Sergio Encarnación Contreras****Invitado Dr. Lourival Domingos Possani Postay****Comité examen de grado****Presidente: Dr. Baltazar Becerril Luján****Secretario: Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista****Vocal: Dr. Jesús Martínez Barnetche****Suplente: Dr. Ernesto Méndez Salinas****Suplente: Dr. Enrique Rudiño Piñera**

Agradecimientos

Al Dr. Cesar Ferreira y al Dr. Possani por la aceptación al laboratorio y por sus enseñanzas y apoyo durante la realización del proyecto de maestría.

A mi Comité Tutoral y jurado de examen por el tiempo y dedicación al tema.

Al Dr. Becerril y a cada uno de los integrantes del laboratorio del grupo Becerril/Possani: Corzo, Gina Gurrola, Fernanado Zamudio, Fredy Coronas, Timo Olamendi, Blanca gracias por sus orientaciones y consejos.

A Linda, Polo, Lidia R., Christian, Chano, Verna, Cinthia, Rita, Citlali, Rivelino, Rosalba, Ernesto, Verónica, Luis, Oscar, Miriam, Maria, Camen y Marisol. A Elia, Ricardo, Lidia G., Juana María, Brenda L., Itzel, Gina E., Pavel, Oscar, Martha y Sergio por su amistad, cariño y apoyo en los buenos momentos pero especialmente en los momentos difíciles.

A la unidad de proteómica: Oscar y Lorena, gracias por todas las facilidades.

A mis compañeros y amigos de “la comunidad de la casita”, por todos los momentos que pasamos juntos.

A Erika Berman, Paty Montoto, Mara, las comadres, Luis Fernando, Luis Alberto, Carlos, July y a todos los amigos que han estado, están y seguirán conmigo. Gracias.

A todos aquellos que colectando alacranes ayudaron para la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A mis hermanos por toda su confianza.

A mis padres, gracias por tener siempre fe en mí, por ser mi guía, mi apoyo y mis amigos, por ese amor que siempre me brindan.

A mi “peke” David por tu amor y por estar conmigo incondicionalmente.

Indice	Página
Lista de aminoácidos	6
Lista de abreviaturas	6
Lista de tablas	8
Lista de figuras	8
Resumen	9
I. Introducción	10
II. Antecedentes	14
III. Hipótesis	16
IV. Objetivos	16
V. Materiales y métodos	17
V.1 Fuente del veneno	17
V.2 Extracción del veneno	17
V.3 Aislamiento de los componentes del veneno	17
V.4 Reacciones de reducción y alquilación	18
V.5 Secuenciación de las toxinas	18
V.6 Técnicas aplicadas para el análisis por espectrometría de masas	
MALDI-TOF	19
LC/ESI-IT/MS	19
QStarPulsar	20
V.7 Programas computacionales y banco de datos	20
V.8 Ensayos de toxicidad	20
V.9 Ensayos de unión a Rianodina	21
V.10 Ensayos antibacterianos	21
V.11 Ensayos de actividad fosfolipásica	22
VI. Resultados	22
VI.1 Análisis de veneno total: lista de masas moleculares de los componentes del veneno	23
VI.2 Ensayos de toxicidad	27
VI.3 Análisis de los componentes	
a) Vm21	28
b) Vm32	31
c) Secuenciación de N terminales de otros componentes del veneno <i>V. mexicanus</i>	33
VI.4 Ensayos de actividad enzimática	
a) Ensayos de actividad de fosfolipasas	35
VI.5 Ensayos antimicrobianos	42
VII. Discusión	50
VIII. Conclusiones	58
IX. Perspectivas	59
X. Bibliografía	60

Lista de aminoácidos

Ácido Aspártico (Asp)	D
Ácido Glutámico (Glu)	E
Alanina (Ala)	A
Arginina (Arg)	R
Asparagina (Asn)	N
Cisteína (Cys)	C
Fenilalanina (Phe)	F
Glicina (Gly)	G
Glutamina (Gln)	Q
Histidina (His)	H
Isoleucina (Ile)	I
Leucina (Leu)	L
Lisina (Lys)	K
Metionina (Met)	M
Prolina (Pro)	P
Serina (Ser)	S
Tirosina (Tyr)	Y
Treonina (Thr)	T
Triptófano (Trp)	W
Valina (Val)	V

Lista de abreviaturas

CHC	Ácido α -hidroxi cinámico
CID	Collisional Induced Dissociation (Disociación inducida por colisión)
Cl ⁻	Ion cloro
DHB	Ácido dihidroxibenzoico
D.O.	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitol
G ⁺	Gram Positivo
G ⁻	Gram Negativo
HPLC	High Performance Liquid Cromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
ICAT	Isotope Coded Affinity Tag (marcación por afinidad a isótopos)
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography (Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados)
K ⁺	Ion potasio
Kd	Constante de disociación
KTx	Toxinas específicas para canales de Potasio
kDa	Kilo Daltones
LB	Luria Bertani
LC/ES-IT/MS	Liquid Chromatography/Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry
MALDI TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of Flight (Disociación de matrices obtenidas por láser con tiempo de vuelo)

mg	Miligramo
ml	Mililitro
MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas)
MS/MS	Espectros secuenciales
MudPit	Multidimensional Protein identification technology (Tecnología multidimensional para la identificación de proteínas)
mV	Milivoltios
nm	Nanómetros
PIPES	Acido 1,4-Piperazinedietanosulfónico
PTM	Modificaciones post-traduccionales
pmol	picomol
TR	Tiempo de Retención
TFA.	Acido Trifluoroacético
u.m.a.	unidad de masa atómica

Abreviatura de Alacranes y toxinas

<i>V. mexicanus</i>	<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>
<i>C. noxius</i>	<i>Centruroides noxius</i>
<i>T. sp</i>	<i>Tityus sp</i>
<i>AaH</i>	<i>Androctonus australis Hector</i>

AgTx	Agitoxina
PA2Bomp	Fosfolipasa A2 de <i>Bombus pensylvanicus</i>
PLABompt	Fosfolipasa A2 de <i>Bombus terrestris</i>
PLAApid	Fosfolipasa A2 de <i>Apis dorsata</i>
PLAApic	Fosfolipasa A2 de <i>Apis cerana cerana</i>
PA2_RHONO	Fosfolipasa A2 de <i>Rhopilema nomadica</i>
PA22_HELSEU	Fosfolipasa A2 de <i>Heloderma suspectum</i>
PA23_HELSEU	Fosfolipasa A2 de <i>Heloderma suspectum</i>
PA2_HELHO	Fosfolipasa A 2 de <i>Heloderma horridum horridum</i>
IPTXI	Imperatoxina. Fosfolipasa A2 de <i>Pandinus imperator</i>
PHILIP	Phaiodactiliphin. Fosfolipasa A2 de <i>Anuroctonus phaiodactylus</i>
OcTx1	Toxina 1 de <i>Opistocampus carinatus</i>
OcTx2	Toxina 2 de <i>Opistocampus carinatus</i>
OcTx3	Toxina 3 de <i>Opistocampus carinatus</i>
HsTx1	Toxina 1 de <i>Heterometrus spinnifer</i>
Pi1	Toxina 1 de <i>Pandinus impertor</i>
Mtx	Maurotoxina
Pi7	Toxina 7 de <i>Pandinus imperator</i>
Pi4	Toxina 4 de <i>Pandinus Imperator</i>
OcTx4	Toxina 4 de <i>Opistocampus carinatus</i>
OcTx5	Toxina 5 de <i>Opistacampus carinatus</i>

Lista de tablas

- Tabla 1. Masas moleculares de los componentes del veneno del alacrán *V. mexicanus smithi* separadas por HPLC.
- Tabla 2. Secuencias N-terminal y masas moleculares de otros componentes del veneno de *V. mexicanus smithi*.
- Tabla 3. Fracciones colectadas cada 5-10 min de veneno separado por HPLC para pruebas de actividad de fosfolipasa.
- Tabla 4. Fracciones colectadas para ensayos de actividad antimicrobiana de la separación por HPLC del veneno del alacrán *V. mexicanus smithi*.
- Tabla 5. Fracciones colectadas de veneno total para la realización de ensayos de actividad antimicrobiana en *E. coli*.
- Tabla 6. Secuencias totales y parciales de componentes del veneno del alacrán *V. mexicanus smithi*.

Lista de figuras.

- Fig. 1. Estructuras tridimensionales de toxinas de Na⁺ y K⁺.**
- Fig. 2. Estrategias analíticas para el estudio de proteomas.**
- Fig. 3. Separación del veneno *V. mexicanus smithi* por HPLC.**
- Fig. 4. Distribución de la frecuencia de los componentes del alacrán *V. mexicanus smithi* en base a sus masas moleculares.**
- Fig. 5. Recromatografía del componente Vm21.**
- Fig. 6. Estrategia usada para la determinación de la estructura primaria de la Vm21.**
- Fig. 7. Comparación estructural de la toxina Vm21 con otras proteínas.**
- Fig. 8. Curva Dosis Respuesta de la Vm21 (Vejovicalcina).**
- Fig. 9. Recromatografía del componente Vm32.**
- Fig. 10. Estrategia analítica adoptada para la secuenciación del heterodímero Vm32.**
- Fig. 11. Recromatografías de algunos componentes del veneno del alacrán *V. mexicanus smithi*.**
- Fig. 12. Prueba de actividad de fosfolipasa de veneno total.**
- Fig. 13. Ensayos de actividad de fosfolipasa.**
- Fig. 14. Ensayos de actividad de fosfolipasa en cada una de las fracciones del veneno.**
- Fig. 15. Espectro de masas de la fosfolipasa PLP1_Vm obtenido por ESI-MS.**
- Fig. 16. Comparación de secuencia de la fosfolipasa del *V. mexicanus smithi* (PLP1Vm) con otras proteínas.**
- Fig. 17. Ensayos de actividad antimicrobiana en *E. coli*.**
- Fig. 18. Ensayos de actividad antimicrobiana en *M. luteus*.**
- Fig. 19. Ensayos de actividad antimicrobiana del veneno total en *Enterococcus faecalis*.**
- Fig. 20. Ensayos de actividad antimicrobiana del veneno total en *Bacillus subtilis*.**
- Fig. 21. Recromatografía del componente Vm41.**
- Fig. 22. Ensayo de actividad antimicrobiana del péptido Vm41 en *E. coli*.**
- Fig. 23. Comparación estructural del péptido Vm41 con otras proteínas.**
- Fig. 24. Posible ubicación del péptido antimicrobiano entre las subfamilias de antimicrobianos reportados.**

RESUMEN

El presente estudio consistió en la caracterización bioquímica del veneno del alacrán endémico del estado de Morelos, México, *Vaejovis mexicanus smithi* y sobre el cual no existen reportes en la literatura científica sobre su composición química.

Estudios previos realizados por el grupo de investigación del Dr. Possani han revelado que la toxicidad del veneno de los alacranes es producida por péptidos capaces de interaccionar selectivamente con el mecanismo de apertura y cierre de canales iónicos. Estos péptidos (toxinas) de alacrán han sido clasificados en cuatro familias, las cuales interaccionan específicamente con canales iónicos de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} . Así también se ha reportado la presencia de algunas enzimas como fosfolipasas, hialuronidasas y actividad antimicrobiana en el veneno de algunos alacranes.

Para la ejecución del análisis, el veneno total obtenido de alacranes colectados en la zona Norte de la ciudad de Cuernavaca, Morelos, se fraccionó utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, obteniendo 83 fracciones. Al realizar un mapeo de las masas moleculares de todos los componentes del veneno utilizando un espectrómetro MALDI-TOF, se encontraron componentes de diversas masas moleculares que van desde 200 Da a mayores de 40 kDa, distribuyéndose mayoritariamente los componentes en un rango de masas de entre 1 y 5 kDa. Se realizaron estudios de toxicidad del veneno en insectos y mamíferos pequeños así como procesos de purificación de algunos componentes para poder caracterizarlos funcional y estructuralmente

Entre los estudios realizados al veneno y/o sus fracciones se encuentran actividades de fosfolipasas y de péptidos con acción antimicrobiana; así como el análisis de secuencias y su comparación en la base de datos para predecir la posible función de los péptidos que actúen sobre canales iónicos. Se reportan los primeros 13 péptidos aislados y caracterizados del veneno del alacrán *V. mexicanus smithi* con actividad biológica. Se presenta la secuencia completa de un péptido llamado Vejovicalcina que presentó actividad sobre canales de calcio sensibles a la Rianodina, presentando una K_d de 91 nM. Este péptido cuenta con 33 aminoácidos y está plegado por tres puentes disulfuro, con una masa de 3775 u.m.a. Se encontró que las fracciones con tiempo de retención* de entre 35 y 50 min presentan actividad de fosfolipasa, de estas, se aisló y caracterizó parcialmente la fosfolipasa con TR 36.51. Un nuevo péptido antimicrobiano de masa molecular de 4354

*Para detalles ver sección V.3 Aislamiento de los componentes del veneno.

u.m.a. fue secuenciado. Este mostró actividad contra *E. coli*. Finalmente, se encontraron tres fracciones del veneno que presentaron actividad antimicrobiana en *M. luteus*, así como del veneno total en *B. subtilis*.

Análisis bioquímico de componentes del veneno del alacrán mexicano *Vaejovis mexicanus smithi*

I. INTRODUCCION

Los animales venenosos están distribuidos en todo el mundo y pertenecen a diferentes *phyla*, incluyendo celenterados, equinodermos, moluscos, artrópodos y cordados. El veneno contiene un gran número de componentes tóxicos que inmovilizan a diferentes tipos de animales que incluyen peces, artrópodos, anfibios y mamíferos. El veneno es empleado por los animales que lo poseen como mecanismo de defensa y/o sometimiento de sus presas.

El alacrán es un artrópodo que puede ser considerado un fósil viviente. Con 400 millones de años de evolución, ha sufrido pocos cambios morfológicos (Froy O et al., 1999). Pertenecen al *phylum* Arthropoda, clase Arácnida, orden Scorpiones, identificándose hasta la fecha 19 familias (revisado en Possani et al., 1999). Todas las variedades de estos artrópodos son depredadores, especialmente de arácnidos e insectos, aunque algunas especies pueden alimentarse de presas más grandes. Los alacranes son de hábitos nocturnos y viven la mayor parte del tiempo en lugares escondidos generalmente bajo la corteza de árboles caídos, troncos huecos o pedregales. Pueden habitar desde zonas boscosas, regiones selváticas hasta zonas urbanizadas, donde suelen realizar guaridas subterráneas.

Los alacranes clasificados como peligrosos para el humano pertenecen a la familia Buthidae, con aproximadamente 500 especies. En esta familia se incluyen los géneros: *Androctonus*, *Leirus*, *Buthus*, *Buthotus*, *Tityus*, *Parabuthus*, *Centruroides*. Este último está distribuido desde la parte sur de Estados Unidos de América, México y América Central, en tanto que el género *Tityus* se encuentra en Trinidad y Tobago y en países de Sudamérica (Possani et al., 1999a). Una familia que no representa alto grado de peligrosidad para los humanos localizada en América, esencialmente México es la *Vaejovidae*. En esta familia se

agrupan, entre otros, el género *Smeringurus*, *Paruroctonus*, *Pseudouroctonus*, *Serradigitus*, *Smeringus* y *Vaejovis*. Este último género, el *Vaejovis*, posee entre otras especies: *V. spicatus* Haradon, 1974, *V. spinigerus* Word, 1863, *V. mexicanus* C. L. Koch, 1836, *Vaejovis punctatus* Karsch, 1879, *Vaejovis nigrescens* Pocock, 1898, *Vaejovis hoffmanni* Williams, 1970, *Vaejovis insularis* Williams, 1971 y *Vaejovis intermedius* Borelli, 1915 (Fet V. 2000).

Se ha reportado que en general los alacranes son capaces de producir en sus glándulas venenosas cientos de diferentes moléculas, entre las que se encuentran, aminas bioactivas, lípidos, biopolímeros no proteicos (como mucopolisacáridos y ARN), péptidos, proteínas y enzimas de alto peso molecular. El veneno de los alacranes son ricos en péptidos con una variedad de funciones farmacológicas (Batista C. V. et al., 2000). Entre las actividades farmacológicas conocidas se encuentran la antimicrobiana (Torres-Larios et al., 2000, Conde et al 2000), antiepiléptica (Wang et al., 2001, Corona et al., 2003), insecticida (Zslotkin et al., 2000; Selisko et al., 1996; Wudayagiri et al., 2001), fosfolipásica (Valdez-Cruz et al., 2004) y tóxica (Cestele y Catterall, 2000; Gurrola y Possani, 1995; Corona et al., 2002; Rodríguez de la Vega y Possani, 2006). La toxicidad de los venenos es producida por péptidos capaces de unirse selectivamente con canales iónicos inhibiendo así el mecanismo de cierre y apertura. Las toxinas de alacrán son divididas en cuatro familias (Miller, 1995) dependiendo del tipo de canal que afectan, reconociéndose aquellos que son específicos para canales de Sodio (Jover et al., 1980), Potasio (Carbone et al., 1982), Cloro (DeBin et al., 1993) y Calcio (Valdivia et al., 1992). Las toxinas específicas para canales de sodio están compuestas de 58-76 residuos de amino ácidos, con masas moleculares que varían de 6.5 a 7.5 kDa. La estructura tridimensional ha mostrado un núcleo estructural común con una topología $\beta\alpha\beta\beta$ siendo estabilizadas por cuatro puentes disulfuros (revisado en Rodríguez de la Vega y Possani, 2005) (Fig. 1). Son raras las excepciones, como la Birtoxina, que poseen solamente tres puentes de disulfuro (Inceoglu et al., 2001). Las toxinas específicas para canales de potasio están compuestas de 23-43 residuos de aminoácidos. La estructura tridimensional se encuentra estabilizada por cisteínas presentando un plegamiento α/β , que comprende a una α -hélice conectada a una doble o triple hoja β por puentes disulfuro (Rodríguez de la Vega et al., 2003) (Fig. 1). De acuerdo a las características tridimensionales y funcionales de cada toxina, puede incluirse

en subfamilias o incluso como miembros de una nueva subfamilia de toxinas bloqueadoras de canales (revisado en Possani et al 1999b, Rodríguez de la Vega y Possani, 2004). Estas toxinas son auténticas bloqueadoras de canales ya que se pegan a la cara extracelular del canal impidiendo el paso de iones.

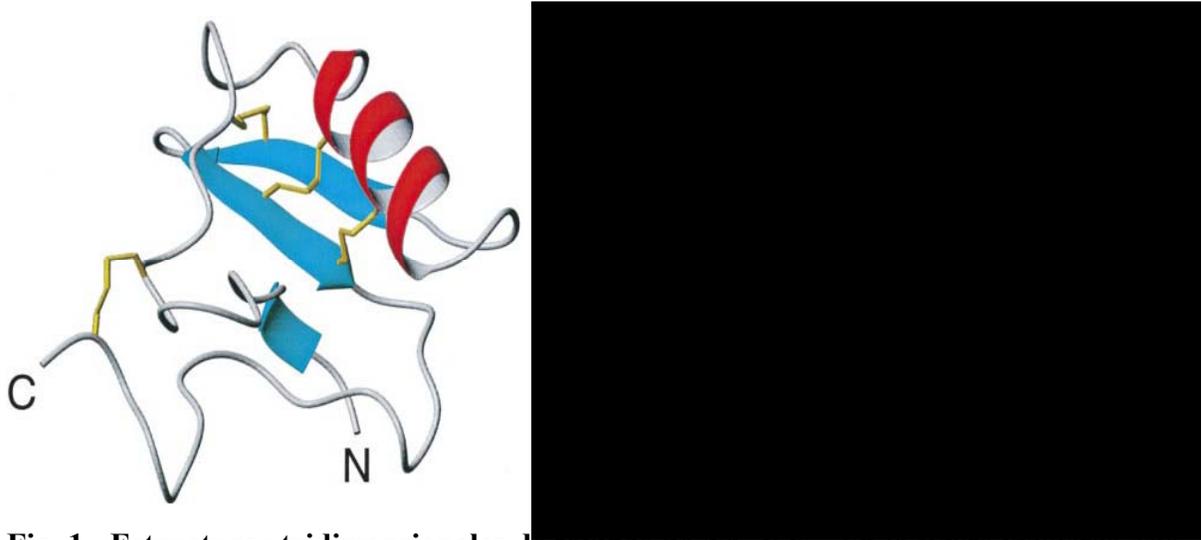


Fig. 1. Estructuras tridimensionales de toxinas de Na^+ y K^+ . En la figura izquierda esta representada una toxina beta (Cn2), moduladora de canales de Na^+ . En la figura derecha se encuentra la Ergtoxina, bloqueadora de canales de K^+ . En azul se encuentran representadas las hojas β , en rojo las α hélices y en amarillo los puentes disulfuro.

El surgimiento de la proteómica también llamada química de proteínas, cuyo objetivo es la identificación de todos los productos del genoma es decir, la totalidad de proteínas expresadas por un organismo particular bajo ciertas condiciones, impulsó el estudio de la función y estructura proteica, incluyendo también las isoformas producidas por empalme o “splicing” alternativo (en eucariontes), modificaciones post-traduccionales, mapeo de interacciones y perfiles de expresión. Se ha utilizado a la espectrometría de masas como la mejor herramienta para el análisis de proteínas a gran escala, con la realización del mapeo de las masas moleculares de péptidos y por el análisis de la fragmentación de los mismos. El veneno de algunos artrópodos (alacranes y arañas) al poseer una gran cantidad de componentes, son candidatos idóneos para ser analizados rápidamente a través de esta tecnología (Escoubas et al., 1999, Pimenta et al., 2001).

En las últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas para el estudio del proteoma de los organismos como lo son la utilización de geles bidimensionales (2DE) acoplados a IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) y su análisis por espectrometría de masa, y la utilización de MudPit (multidimensional protein identification technology) y/o ICAT (isotope-coded affinity tagging) asociados a un espectrómetro. La implementación de tales técnicas, ha facilitado los procesos de purificación y caracterización de las proteínas; así como el entendimiento de las interacciones que se presentan entre diversas proteínas al formar un complejo y el análisis de las modificaciones que puedan presentar estructuralmente. Algunas estrategias se muestran en la Fig. 2.

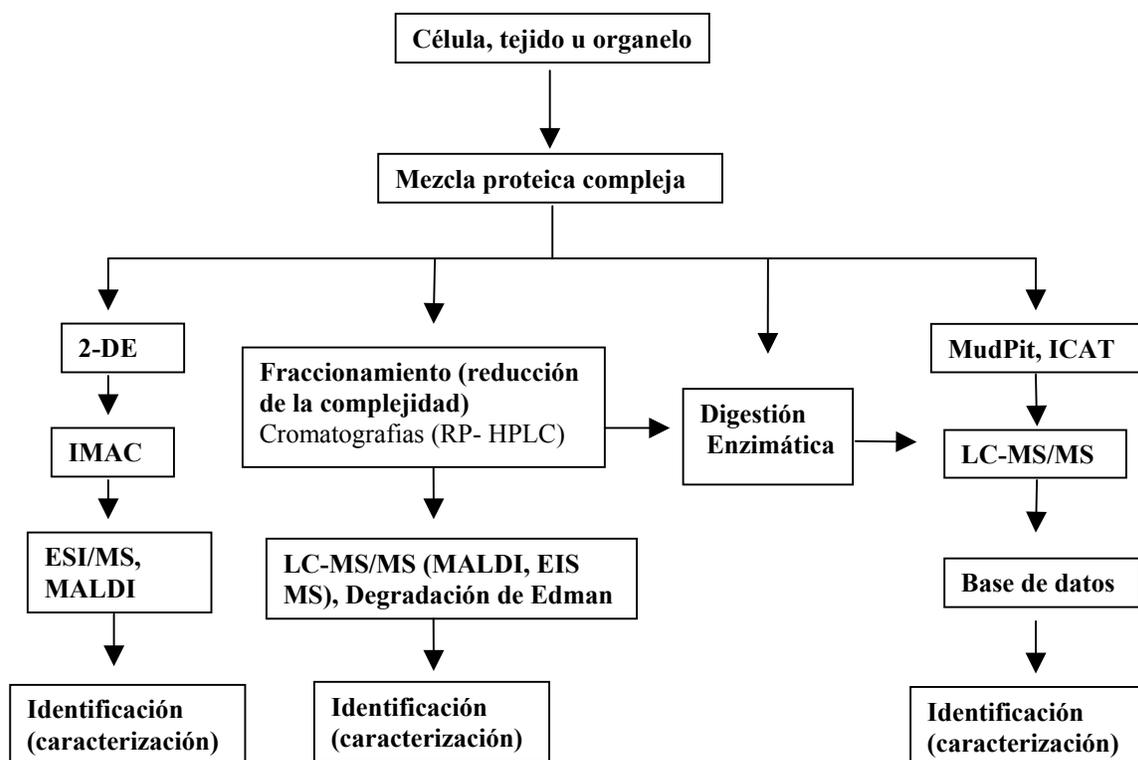


Fig. 2. Estrategias analíticas para el estudio de proteomas. Posibles rutas a seguir para analizar el proteoma y subproteomas de un organismo.

Recientemente fueron detectados cientos de diferentes compuestos en el veneno total de los alacranes *T. cambridgei* (Batista et al., 2004), *T. serrulatus* (Pimenta et al.,

2001), *T. costatus* (Diego-García et al., 2005) y *T. pachyurus* (Barona et al., 2005) entre los cuales se encontraron docenas de toxinas desconocidas, además de que otras presentaban modificaciones post-traduccionales, sitios de oxidación, inestabilidad térmica en los N-terminales de residuos de prolina. Lo anterior gracias a la espectrometría de masas que fue una herramienta importante para llevar a cabo este tipo de análisis.

II. ANTECEDENTES

El análisis proteómico del veneno de diferentes especies pertenecientes a los géneros *Tityus* y *Centruroides* ha sido realizado por el grupo del Dr. Lourival Possani, encontrando que existe en promedio ciento cincuenta formas moleculares distintas en el veneno de cada especie. Tomando en consideración lo anterior y que tan solo en México existen aproximadamente 221 especies de alacranes catalogados, podríamos calcular que existen aproximadamente 33,000 moléculas distintas, de las cuales apenas dos centenares de estas han sido caracterizadas parcial o totalmente.

Se han reportado en el banco de datos proteico UniProtKB/Swiss-Prot, 1692 toxinas provenientes de distintos organismos y de las cuales 433 pertenecen a diferentes especies de alacranes, ocupando así el segundo lugar en abundancia.

Un ejemplo de estas moléculas, son las toxinas denominadas ErgTx, ErgTx2, CIIErg1 y CIIErg2 aisladas de los venenos de los alacranes *C. noxius* y *C. limpidus limpidus* que actúan específicamente sobre canales de potasio de la superfamilia de genes ether-a-go-go (eag) (Corona et al., 2002).

Actualmente, además del interés médico, se incrementó la inquietud por el descubrimiento de nuevas herramientas bioquímicas que ayuden al esclarecimiento del funcionamiento del sistema nervioso y de las membranas celulares. Es decir, la investigación de los venenos no solo se centra en el conocimiento de los componentes directamente relacionados con los efectos letales para el hombre, sino también en muchas sustancias que poseen un amplio espectro de acciones biológicas. Una familia de componentes aún poco estudiados en los venenos de alacranes, son las defensinas, péptidos antimicrobianos de amplio espectro con tres puentes disulfuro intramoleculares y una larga hoja β en su estructura. Una contribución importante al estudio de estos péptidos fue el

descubrimiento de la Escorpina en el veneno del alacrán africano *Pandinus imperator*. Este péptido posee actividad antibacteriana y una potente actividad antiparasitaria contra las fases de desarrollo del oocineto (ED50 0.7 μM) y del gameto (ED50 10 μM) de *Plasmodium berghei* (Conde et al., 2000). También se ha reportado en la literatura la existencia de un péptido tipo defensina en el veneno del alacrán chino *Buthus martensii* denominado BmTxKS2 (Zhu et al., 2000).

Existen péptidos antimicrobianos que son relativamente pequeños, que van de 2-5 kDa, son de naturaleza anfipática, de longitud, secuencia y estructura variable. Se han encontrado en una gran variedad de especies (vertebrados e invertebrados) presentando un amplio intervalo de inhibición de crecimiento de microorganismos como bacterias Gram positivas y Gram negativas, protozoarios, levaduras y hongos. (Torres-Larios et al., 2000, Conde et al 2000, Salzet, 2002, Ganz y Lehrer, 1998). De acuerdo a la estructura tridimensional presentada por estos péptidos, se estudian sus interacciones con la membrana celular (por medio de dinámicas moleculares) y su participación en la generación de una respuesta inmune (Hwang y Vogel, 1998). Por su amplio espectro antimicrobiano, estos péptidos son fármacos potenciales para el tratamiento de las infecciones de la piel (Moerman et al., 2002, Ulvatne 2003). Se han encontrado una variedad de estos péptidos en veneno y hemolinfa de varias especies de alacranes, presentando actividad tanto antimicrobiana como hemolítica y moduladora de la respuesta inmune (Torres-Larios et al., 2000, Moerman et al., 2002, Corzo et al., 2001, Rodriguez de la Vega et al., 2004).

Los receptores de Rianodina son una familia de canales de Ca^{2+} que participan en la liberación de Ca^{2+} intracelular. En el veneno del alacrán *P. imperator* se aislaron dos componentes que actúan sobre estos canales (Zamudio et al., 1997): la Imperatoxina inhibitoria (Imperatoxina I) y la Imperatoxina activadora (Imperatoxina A). La Imperatoxina I es una proteína heterodimérica que consiste de una subunidad larga (104 residuos de aminoácidos) y una subunidad pequeña de 17 aminoácidos mantenida de forma covalente por un puente disulfuro. El heterodímero manifiesta una actividad fosfolipásica de tipo A2. Esta proteína tiene un efecto inhibitorio en el pegado de la Rianodina al canal

de calcio. La imperatoxina A es un péptido de 33 aminoácidos que activa la liberación de calcio para el pegado de la Rianodina al canal.

Recientemente se realizó la caracterización química y biológica de una nueva fosfolipasa aislada del veneno del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus*, la Phaiodactylipina. Esta enzima es un heterodímero glicosilado que, además de la actividad fosfolipásica, presentó una fuerte actividad insecticida, que la califica como un potencial producto biotecnológico para aplicación en la agricultura (Valdez-Cruz et al., 1999).

En el estado de Morelos uno de los alacranes endémicos en la zona urbana es el *Vaejovis mexicanus* (el *C. limpidus limpidus* también es endémico en la zona urbana además de ser de interés médico), del cual nada se conoce sobre la composición química de su veneno. Este alacrán no representa un problema de salud pública, ya que no se ha reportado casos de envenenamiento severo, ni de casos fatales, sin embargo, análisis preliminares del veneno total revelaron una impresionante complejidad de componentes moleculares, lo que lo transforma en un interesante blanco para la búsqueda sistemática de nuevas moléculas bioactivas.

III. HIPOTESIS

Con base en estudios previos en alacranes pertenecientes a diferentes familias, se espera encontrar en el alacrán *Vaejovis mexicanus smithi* componentes o péptidos que presenten afinidad por canales iónicos u otras actividades específicas como antimicrobiana, enzimática (fosfolipasa, hialuronidasa), insecticida, entre otras.

IV. OBJETIVOS

General:

Caracterizar bioquímica y farmacológicamente los componentes del veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus smithi*.

Específicos

1. Obtener la huella digital de las masas moleculares de los componentes del veneno (mass fingerprint).
2. Determinar la estructura primaria de las toxinas, total o parcialmente.
3. Caracterizar modificaciones post-traduccionales.
4. Determinar la actividad farmacológica específica de los componentes del veneno realizando diversos ensayos como electrofisiológicos, antimicrobianos y enzimáticos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. *Fuente del veneno.* Los alacranes de la especie *V mexicanus smithi*, que fueron utilizados en este trabajo, se obtuvieron en el estado de Morelos, los cuales fueron colectados en la zona norte de la ciudad de Cuernavaca, específicamente, en los alrededores del Instituto de Biotecnología de la UNAM. De esta manera se dispusieron de docenas de especímenes mantenidos en cautiverio en el alacranario del Instituto de Biotecnología bajo condiciones adecuadas para su sobrevivencia.

V.2. *Extracción del veneno.* La extracción del veneno total fue realizada a través de estimulación eléctrica de bajo voltaje con los animales previamente anestesiados usando Bióxido de Carbono. El veneno colectado se solubilizó en agua destilada, fue centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos (centrifuga Beckman J2-21 equipada con un rotor JA-20), liofilizado y mantenido a -20 °C hasta su procesamiento.

V.3. *Aislamiento de los componentes del veneno.* Alícuotas de 1 - 2 mg de veneno total fueron sometidos a separación por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography- HPLC), a través de una columna analítica C18 VYDAC (Hisperia-CA, USA) y de una columna analítica semipreparativa C18 VYDAC (Hisperia-CA, USA), ambas de fase reversa. Se usó el método de gradiente lineal de 0-60% de acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) por 60 min. La detección fue realizada por absorción en UV a una longitud de onda de 230 nm, donde el sistema fue

previamente estabilizado con agua tetradesilada con 0.12% de TFA. Las fracciones colectadas manualmente se secaron en un aparato speed vac SAVANT (Albertville-MN, USA). Todas las fracciones colectadas, incluso aquellas no detectadas por la sensibilidad utilizada en el detector de luz ultra-violeta (0.5 AUFS), fueron sometidas a análisis por espectrometría de masas.

La purificación de las fracciones obtenidas se realizó a través de una columna analítica C18 VYDAC (Hisperia-CA, USA) de fase reversa. Se uso el método de gradiente lineal a diferentes porcentajes de acetonitrilo con 0.1% de ácido trifloroacético (TFA) por 60 min y detectándose la absorción por UV a una λ 230 nm, el sistema fue previamente estabilizado con agua tetradesilada con 0.12% de TFA.

V.4. *Reacciones de reducción y alquilación.* Para las reacciones de alquilación y reducción se utilizaron dos protocolos diferentes:

1.- Las fracciones fueron resuspendidas en 30 μ l de Cloruro de Guanidinio 8M, 10 μ l de DTT 20 mM en 50 mM de carbonato de amonio a 56 °C durante una hora. Para la alquilación de la muestra se utilizó una solución 10 μ l de Iodoacetamida (IAM) 45 mM durante 1.5 h protegida de la luz.

2.- Solubilización de las fracciones en Bicarbonato de amonio 100mM agregando DTT 10 mM, dejándolas a 56°C durante 30 min. Para la alquilación se agregó IAM 50 mM, incubando a temperatura ambiente y protegida de la luz.

En ambos casos se concentró la muestra en el Speed vac y se desaló la muestra usando Zip tip C18, o separándola directamente por HPLC a través de una columna C18 analítica, o analizándolas directamente en el espectrómetro de masas.

V.5. *Secuenciación de las toxinas.* Los péptidos que presentaron toxicidad para insectos o mamíferos y/o actúan específicamente con canales iónicos fueron secuenciados usando degradación automática de Edman y fragmentación por espectrometría de masas utilizando el método de Disociación Inducida por Colisión (CID - Collisional Induced Dissociation). El secuenciador de proteínas y péptidos utilizado, es un Beckman LF 3000 (Palo Alto-CA, USA) acoplado al sistema de cromatografía líquida 125S y detector 168 también de

Beckman. Se trabajó con muestras a nivel de nanomoles, permitiendo reducciones y alquilaciones *in situ*, alcanzando en promedio 20-30 residuos de aminoácidos por análisis. Para secuencias no resueltas por MS/MS o secuenciación por Edman se utilizó el Beckman 6300 Aminoacid Analyzers (Palo Alto, California); realizando una reacción de hidrólisis ácida con 6M de HCl. Esto permitió discernir aminoácidos que no se pueden identificar por MS, por poseer la misma masa.

V.6. *Técnicas aplicadas para el análisis por espectrometría de masas*

MALDI-TOF - La determinación de las masas moleculares exactas de los péptidos puros y semi-puros, así como la determinación del número total de compuestos presentes en el veneno, fueron realizadas en el espectrómetro de masas Ettan MALDI TOF/Pro de la Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia) con analizador iónico de tiempo de vuelo linear y con reflectrón cuadrático. Las fracciones fueron reconstituidas con una solución de Agua: Acetonitrilo: Acido Fórmico (50:50:0.1) a concentraciones en el orden de nano a femtomolares. Para la formación de los cristales, 0.5 μ l de la muestra se mezcló con 1.0 μ l de la matriz en concentración femtomolar y depositadas en placas de acero inoxidable a temperatura ambiente hasta la evaporación completa y simultanea formación de los cristales. Se usaron como matrices el ácido di-hidroxibenzoico (DHB) y α -ciano hidroxicinámico (CHC) dependiendo del intervalo de masa molecular del péptido sometido a análisis. Para la ionización de la muestra se utilizaron pulsos de láser con fuente de nitrógeno y longitud de onda de 337 nm. La duración, la intensidad y el número de pulsos fueron ajustados dependiendo de la matriz utilizada y de la facilidad de ionización de la muestra, la cual está directamente relacionada con la estructura química de las moléculas.

LC/ESI-IT/MS - El equipo utilizado fue un espectrómetro LC/ESI-IT de la Thermo Electron/Finnigan (San Jose, CA, USA). Para los análisis realizados a través del sistema nano-LC/ESI-IT/MS los parámetros de elución cromatográfica (gradientes, tipos de columnas, flujo), fuente de ionización (disponibilidad del vacío, voltaje de la aguja, densidad de los solventes, distancia y posición de los ejes direccionales z y x), electromagnéticos (Voltaje de los octapolos, trampa de iones, etc.) fueron determinados para cada tipo de análisis o más específicamente para cada tipo de muestra o experimento

realizado. Básicamente, las muestras fueron diluidas (aproximadamente 500 pmoles/5 μ l), según la intensidad de área bajo el pico (HPLC-UV230 nm) en el caso de los análisis realizados off-line, con 50% de acetonitrilo y 1% de ácido acético e inyectadas directamente al espectrómetro. Para los análisis a través del sistema LC-MS (on-line) se usaron las columnas capilares, Pico-Frit C-18 (New Objective).

LC/QTOF - Todas las fracciones fueron separadas en un columna C-18 fase reversa de 75 μ m x 15 cm, acoplado a un HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies) equipado con toma de muestra automática usando un gradiente de 3-32% de acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico. El eluyente del LC fue acoplado a un micro ionspray unido a un QSTAR Pulsar mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX). Los péptidos fueron analizados en modo de detección positivo.

V.7. *Programas computacionales y Banco de datos.* Los programas de computación que se usaron para la adquisición, almacenamiento y procesamiento de los datos generados por medio del espectrómetro de masas son *Xcalibur* y *Sequest* para el ESI-IT/MS, *Ettan Maldi Control* y *Ettan Maldi Evaluation* para el espectrómetro MALDI-TOF. Para el análisis de datos generados por el espectrómetro de masas QStarPulsar se usó el programa *Analyst QS*. Para el análisis de proteínas de los datos generados a través de los espectrómetros de masas se utilizó el Protein Prospector, Mascot, ProFound y los links disponibles en EXPASY Proteomics Server, además del CLUSTALW (el programa escogido para las alineaciones múltiples de las secuencias obtenidas y las ya conocidas). Como banco de datos, Swiss-Prot, TrEMBL, PIR fueron los usados para la comparación de la estructura primaria de las toxinas caracterizadas.

V.8. *Ensayos de toxicidad.*

Mamíferos pequeños. El veneno total fue probado en ratones (cepa CD-1) suministrados por el Bioterio del Instituto de Biotecnología –UNAM con un peso aproximado de 18-20 g. Se inyectaron 100 μ g del veneno total por vía intramuscular en cada uno de los ratones. Los animales se mantuvieron en observación por lo menos durante 12 horas para ver un posible efecto tardío.

Insectos. Se inyectó 30 µg del veneno total en grillos (*Acheta domestica*). La inyección se realizó entre el tercer y cuarto segmento abdominal. Se mantuvieron en observación por lo menos durante 12 horas.

V.9 *Ensayos de unión de Rianodina a Retículo Sarcoplásmico.* El retículo sarcoplásmico rugoso (SR) fue preparado de la espalda y músculo de la pierna de un conejo usando el procedimiento de Meissner (Meissner G, 1984). Brevemente, se incubó [³H]Rianodina, retículo sarcoplásmico y la toxina en un medio estándar que contiene KCl 0.2 M, Na₂EGTA 1mM, Na-PIPES 10 mM, pH 7.2, y CaCl₂, el necesario para anexarse en un intervalo de 1 nM a 100 µM. La relación Ca₂/EGTA fue calculada usando las constantes de Fabiato. [³H]Rianodina (68.4 Ci/mmol, Dupont NEN) fue diluida directamente en el medio de incubación a una concentración final de 7 nM. La concentración de proteína usada fue en un intervalo de 0.2-0.4 mg/mL y determinada por el método Bradford. La incubación fue de 90 min a 36° C. Las muestras fueron hechas por duplicado, y filtradas en papel Whatman GF/B y lavadas dos veces con 5 ml de agua destilada usando un Brandel M24-R cell harvester (Gaithersburg, MD). La unión inespecífica fue determinada en presencia de 10 µM de rianodina no marcada. Los datos de la gráfica fueron realizados por análisis de regresión no lineal usando el programa computacional Origin 4.0 (Microcal Inc., Northampton, MA) (Zamudio et al., 1997).

V.10. *Ensayos Antibacterianos.* Los microorganismos *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, fueron cultivados con medio YT2X o LB (Luria Bertani) a 37°C con agitación a 40 rpm. Para el ensayo antibacteriano (H. Steiner et al 1981), se adicionaron diferentes cantidades de las fracciones de veneno en filtros de papel Whitman estériles, o colocadas directamente, sobre placas de 20 ml con agar LB, las cuales contienen 1 ml de 10⁶ bacterias por ml de un cultivo crecido a una densidad optica de 0.08-0.10 (λ 625 nm) de acuerdo a la escala de McFarland (equivalente a 1.5x10⁸ células/ml). Las placas fueron incubadas por entre 8 y 12 horas a 37°C para posteriormente observar los halos de inhibición. Para la preparación de 100 ml del reactivo de McFarland fueron adicionados 99.5 ml de H₂SO₄ 0.18 M y 0.5 ml de BaCl₂ 0.48 M, manteniéndose en tubos ámbar a 25 °C.

La monocapa fue hecha también por conteo de bacterias usando dilución en placa, las lecturas de la DO se realizaron a una longitud de onda 600nm.

El medio líquido LB, por cada litro contiene: 10 g de Bacto triptona (Difco TM), 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura (Difco TM), el pH se ajusta a 7 con NaOH 5 N. El medio agar LB posee además de lo anterior, 15 g de Bacto agar (Difco TM). El medio YT2X por litro contiene: 16 g de de Bacto triptona (Difco TM), 10 g de extracto de levadura (Difco TM) y 10 g de NaCl. El pH se ajusta a 7 con NaOH 5 N.

V.11. *Ensayos de Actividad Fosfolipásica*. Los ensayos para verificar la actividad de fosfolipasa de los componentes del veneno fueron realizados según la metodología previamente reportada (Habermann y Hardt, 1972). Básicamente, se utiliza yema de huevo en 0.86% de NaCl, CaCl₂ 10 mM y agarosa para la preparación de las placas de Petri (2.0 mm de espesor). Las muestras se adicionaron en pozos de 1-2 mm de diámetro y las placas incubadas por 1.0 h a 37°C. La actividad fosfolipásica fue determinada visualmente a través de la formación de halos y de sus respectivos diámetros. Se utilizó como control negativo agua y como positivo la fracción I del veneno del monstruo de cuentas (*Heloderma horridum*; Alagón et al., 1982).

VI RESULTADOS

Para la separación y caracterización de los componentes del veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus smithi*, se realizaron tres estrategias.

- 1) Cada uno de los componentes del veneno separados por HPLC fueron colectados individualmente para obtener el mapa de sus masas moleculares.
- 2) Varios componentes del veneno total separados por HPLC se purificaron para determinar su estructura primaria.
- 3) Los ensayos de actividad de fosfolipasa y antimicrobiana se realizaron con cada una de las fracciones colectadas por HPLC. Sin embargo, debido a la limitante en cantidad de veneno colectado, varios ensayos se llevaron a cabo con fracciones colectadas cada 5-10 min.

VI.1 Analisis del veneno total.

Lista de masas moleculares de los componentes del veneno.

Alícuotas de 1-2 mg de veneno total del alacrán *V. mexicanus smithi* fueron fraccionados a través de cromatografía líquida de alta resolución bajo las condiciones escritas previamente en la sección de Materiales y Métodos. En la figura 3 se muestra la separación realizada, señalándose las fracciones analizadas en este trabajo. Se colectaron 85 fracciones y con ellas se realizó el mapeo de las masas moleculares de los componentes del veneno o “mass finger print” (MFP). Para realizar el mass fingerprint por MALDI TOF, se prepararon todas las fracciones de una corrida por HPLC diluyéndose aproximadamente 500 fmoles/2 μ l según la intensidad del área bajo el pico obtenido en el cromatograma de veneno total.

Las masas moleculares obtenidas se muestran en la Tabla 1. También se enlistan varias fracciones las cuales no fue posible determinar las masas moleculares de los componentes y que se marcan como Indeterminada*, así como varias masas moleculares en el mismo tiempo de retención debido al solapamiento de componentes presentes en las fracciones. Se realizó una depuración de las masas moleculares obtenidas en el MFP en el cual se eliminaron las correspondientes a contaminaciones de los péptidos generadas en las fracciones contiguas en la cual el área del pico presente en el espectro de masas era pequeña o no significativa. Se obtuvieron un total de 342 componentes presentes en el veneno de acuerdo a las masas moleculares. En la figura 4 se muestra la distribución de la depuración de las masas moleculares de los componentes del veneno en diferentes intervalos en base a la frecuencia presentada. La gráfica muestra que la mayor distribución se encontró en los rangos de 1-6 kDa y en menor proporción los péptidos con mayor peso molecular.

Los péptidos analizados fueron nombrados utilizando en tiempo de retención en el cual eluyeron a momento de separar el veneno por HPLC.

*Para detalles ver sección IX. Discusión.

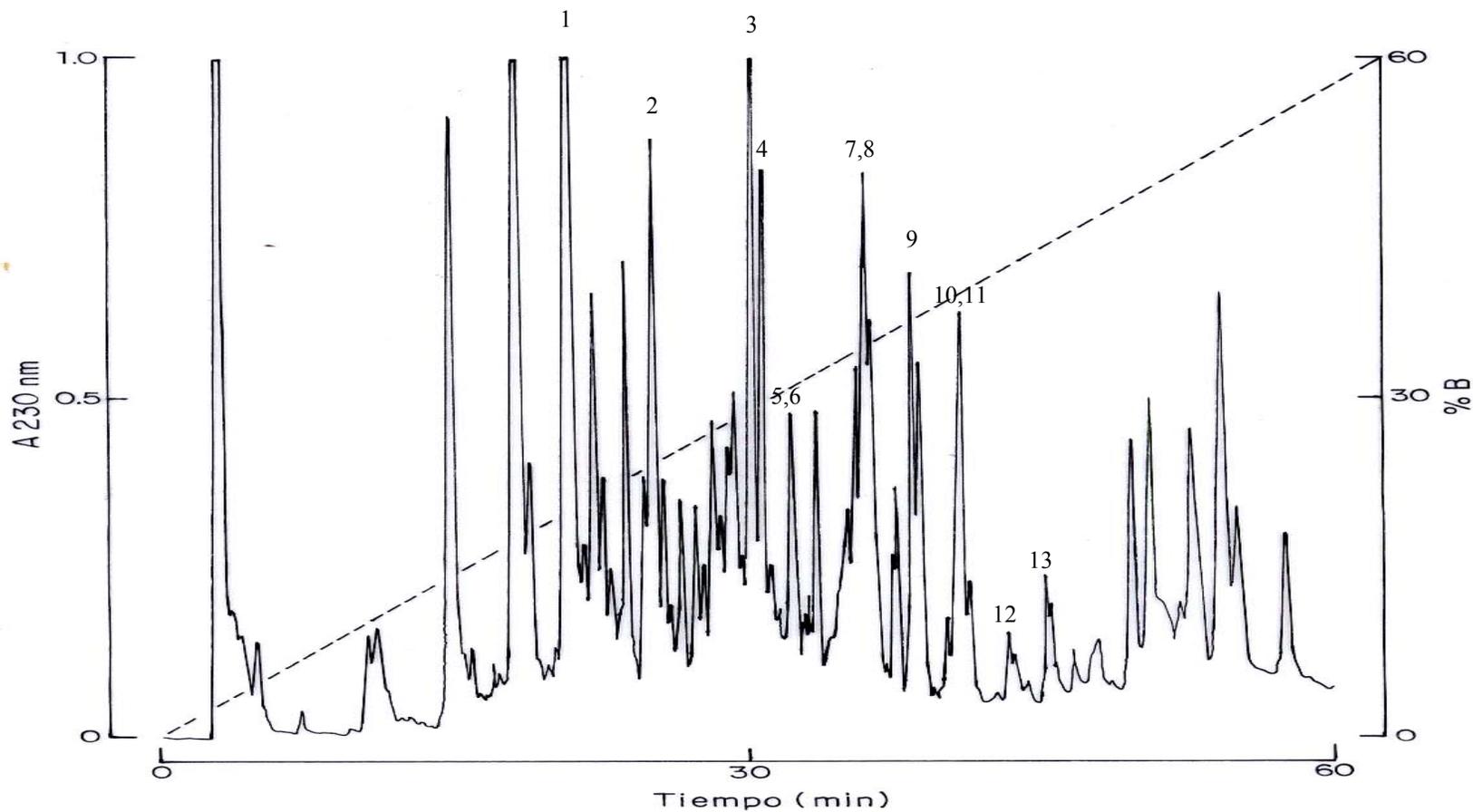


Fig. 3. Separación del veneno *V. mexicanus* por HPLC. Veneno solubilizado (1.5 mg de proteína) del alacrán *V. mexicanus* fue separado en una columna C 18 fase reversa, fluyendo con un gradiente de la solución A (0.12% TFA en agua) a 60% de solución B (0.10% TFA en acetonitrilo) con un flujo de 1 ml/min. Los números indican las fracciones de las cuales se obtuvo su secuencia parcial o total. Los números sobre los picos indican las fracciones caracterizadas.

Tabla 1. Masas moleculares de los componentes del veneno del alacrán *V. mexicanus* separadas por HPLC*

<i>TR</i>	<i>Masa Promedio (u.m.a.)</i>	<i>TR</i>	<i>Masa Promedio (u.m.a.)</i>
2.92	222.334, 260.168, 372.815	S 24.11	1048.604, 1657.949, 2310.809
5.06	272.055	24.11	1952.328, 2166.86, 5338.229
B 5.06	429.1	B 24.11	253.04, 875.42, 1398.661, 1948.124, 2436.139, 2679.346, 5336.308
7.40	Indeterminado	25.10	1489.6, 1511.315, 1617.7, 2529.512, 3864.577
9.84	1235.349	25.10.2	253.073, 590.4, 1194.739, 1511.312, 1985.92, 2075.691
10.78	994.899, 1047.829, 1234.056	25.52	1485.399, 1728.229, 2258.489 , 2387.001
11.28	117.063 , 1234.349	26.10	422.3, 462.4, 1327.008, 1495.436, 2258.772, 2620.03 , 3870.226, 3917.489
B 11.28	Indeterminado	26.51	1234.369, 2621.099 , 3871.574
13.07	300.703	27.12	1340.203 , 1642.177, 2620.029
14	1466.168, 1960.937 , 2363.969, 2441.293, 3091.036	28.24	2084.938, 2883.506 , 3770.697
14.96	Indeterminado	28.72	222.295, 373.089, 4037.264, 4062.469 , 4860.475
15	272.091 , 334.602, 427.197 , 1086.902, 1689.2	29.12	2028.249, 4044.625, 4743.102
16.22	Indeterminado	S 29.82	1989.272, 2117.962 , 3770.356, 3828.061, 4048.342, 5125.488
16.70	324.238, 418.72, 501.4, 834.6, 1049.296, 1877.397	29.82	2368.289, 2514.764 , 3772.141, 4131.437, 4196.231, 5612.061, 5684.0
17.34	261.344, 1205.752, 1274.737 , 1876.767, 1886.725	30.62	1219.7, 2029.978, 2756.56, 4051.043 , 5487.234
17.66	261.283, 1243.892	31.20	1894.409, 2288.761, 3544, 3695.567, 3873, 4053.615, 4623.314 , 5309.113, 5468.43 , 8340.499
18.35	208.909 , 223.509, 373.827, 1436.27, 1652.505	31.71	2526.804, 4053.34, 4256.777 , 4623.389, 8184.727
19.10	1148.738, 2096.296, 2297.193, 2318.577, 2353.524	32.22	2610.12 , 3068.716, 4050.544, 4251.603 , 4616.633, 8157.368
B 19.10	2377.208 , 2593.419, 2610.334	32.78	1727.988, 3115.418, 3838.78 , 6231.008
20.14.	2593.88	33.47	1288.661, 1630.123, 1856.102, 2076.866, 2116.85, 2306.616, 3302.189, 4160.467, 4322.925 , 5434.357, 6514.206, 7937.084 , 8364.316, 9125.702, 15373.608
20.14.2	1464.42, 2098.654, 2594.163 , 2610.477	34.11	1811.589, 2792.828 , 2890.806, 3272.21, 4008.728 , 4044.677
20.23	Indeterminado	S1 35.79	3032.485, 3862.668 , 7469.49
20.96	1866.081, 3777.92	S2 35.72	2558.149, 3032.024 , 3987.629, 4232.375, 8260.244
21.98	431.4, 714.7, 1259.696 , 3777.049	S3 35.79	3037.876 , 3058.507, 3738.686, 4027.624
22.40	533.5, 788.5, 2286.744, 4024.456 , 4980.605	35.79	3038.075 , 3738.649, 4027.696, 8269.386
23.39	1014.47, 1129.8, 1390.042, 1527.099, 1902.299, 2111.018, 2228.143, 2311.791, 4025.1	36.19	2814.497, 3038.868 , 3564.677, 3721.56, 3807.978 , 3878.666, 4027.936, 8267.094, 13944.696
S 24.11	1048.604, 1657.949, 2310.809	36.72	3588.529 , 3610.297, 3625.895, 3983.521, 4020.726, 4223.762

<i>TR</i>	<i>Masa Promedio (u.m.a.)</i>	<i>TR</i>	<i>Masa Promedio (u.m.a.)</i>
B 36.72	3234.702, 3432.99 , 3502.964, 3589.547 , 3828.835, 3986.189, 4070.65, 4227.906, 6459.996	46.53	3915.145, 4051.546, 4319.845, 4710.326 , 4782.406, 4868.122, 5107.706 , 7067.905, 13435.689
S 38.38	3139.623, 3184.45 , 3321.588 , 3425.717 , 3496.553, 3583.433 , 4097.234 , <i>6937.6</i> , <i>7920</i>	46.86	3920.472 , 4236.709 , 5044.021 , 5182.747, 8246.293, 11459.022, 13358.3, 16209.23
38.38	2821.558, 3138.874 , 3184.309 , 3224.317, 3320.986 , 3425.16 , 3496.739, 3582.915 , 3607.124, 3823.698, 3981.927, 4096.12 , 11273.826	47.82	4298.5, 4700.818, 5272.777, 12469.982
39.20	2274.795, 4011.745, 6497.875	48.70	2166.644, 2304.621 , 2569.271, 2768.228, 3278.62, 3424.448, 3819.497, 3916.217, 4265.672, 4292.422
39.58	1754.777, 2309.273, 2814.406, 3255.029, <i>4206</i> , <i>4406</i> , 4562.588, 6501.695	49	5953.928, 11315.991
40.51	2346.636, 2609.231 , 3252.481, 3561.349, 4556.498, <i>5191</i> , 6497.979	49.6	Indeterminado
41.07	258.316 , 2600.667, 3248.659 , <i>4563.3</i> , 6129.859, 6494.188, 12356.831	50.75	Indeterminado
41.71	1519.672, <i>1666.8</i> , 2346.294, 2518.229, 3283.545 , 3354.893, 3589.862 , 6822.133, 15102.426, 18436.58, 29925.659	51.66	Indeterminado
42.22	<i>1823.8</i> , 2683.176, 2946.172, 3034.03 , 3284.373, 3354.934 , <i>3414.2</i> , 11866.172, 15180.096, 23183.445, 26285.445, 29429.537, 34020.471, 37191.328, 40329.248	52.34	Indeterminado
43.00	2808.873, 3033.261 , 3283.485, 3349.309 , 3420.206, 3759.044, 4457.875, , 11866.607	53.31	3460.978, 3807.741, 5673.486, 10978.726, 16185.602, 24611.234
43.81	1794.666, 3321.342 , 3719.14 , 6871.022, 11360.511, 13987.335	53.84	3548.378, 3591.69, 3899.344
44.29	1841.87 , 6018.366, 11330.008 , 16939.537, 21998.177, 32422.033	54.27	Indeterminado
44.57	1854.978 , 3807.963 , 5328.305, 5558.788, 11284.576	55.20	Indeterminado
S 45.37	1812.525 , 1833.602 , 1842.365, 1850.155 , 1871.964	56.27	1603.661 , 1640.656
45.37	1825.91 , 1855.48 , 2005.218 , 2118.96, 2139.738, 2199.832, 3781.626, 3808.532, 4183.952 , 4706.795	58.92	Indeterminado
46.33	4161.126, 4871.3 , 5174.143 , 5369.532, 9921.73, 13338.577		

* Las masas moleculares marcadas en negritas fueron las que presentaron mayor concentración en la fracción. En cursivas se muestran las masas moleculares obtenidas solo por EIS/MS. Por razones de registro de propiedad industrial no se mencionan dos masas moleculares.

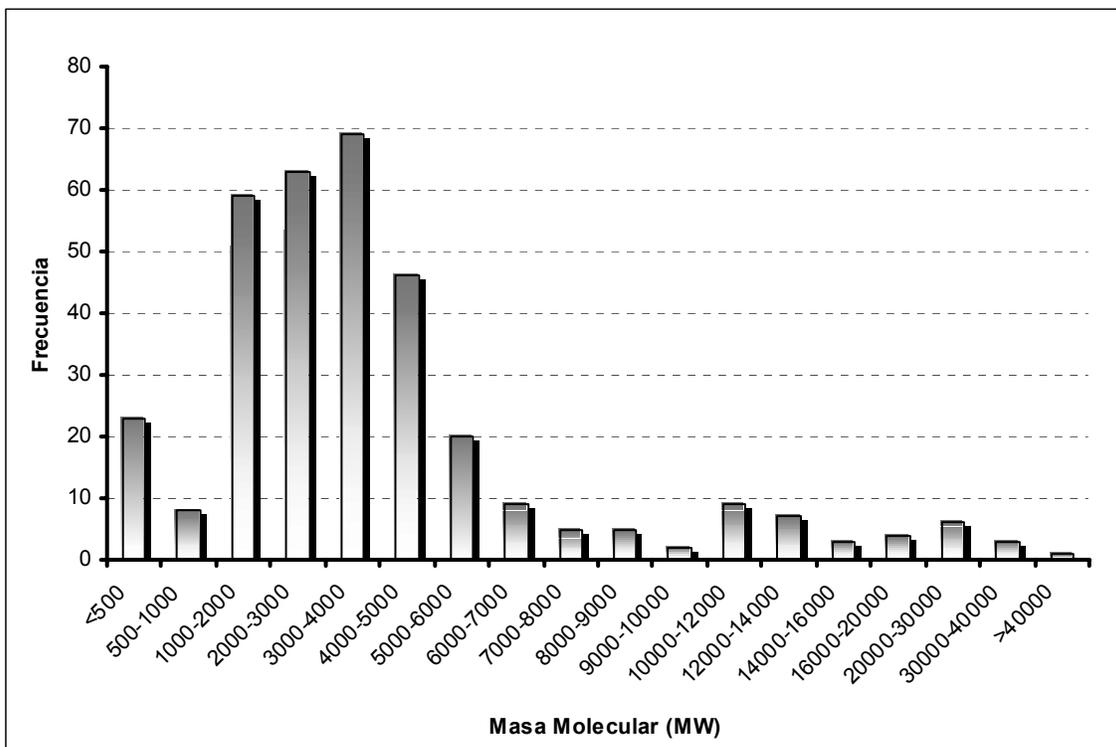


Fig 4. Distribución de la frecuencia de los componentes del alacrán *V. mexicanus smithi* en base a sus masas moleculares. Se observan las mayores frecuencias en los intervalos de 1000 a 6000 u.m.a.

VI.2 Ensayos de toxicidad

Se llevaron a cabo ensayos de toxicidad en ratones, para lo cual se emplearon 3 animales, 2 para probar actividad toxica del veneno total y uno inyectado con agua usado como control. Para los ensayos en insectos se utilizaron 6 grillos, en 5 de ellos se probó el veneno total y el otro fue utilizado como control.

Después de la inyección el veneno resultó ser no tóxico en el caso de los ratones, ya que estos no presentaron síntoma* alguno de intoxicación y su comportamiento fué igual que el ratón control. En los grillos, pasados tres minutos posterior a la inyección del veneno se presentó dificultad para caminar debido a parálisis de extremidades traseras e inmovilidad total a los 10 min. En ninguno de los dos ensayos el veneno mostró ser letal para estos animales en las dosis ensayadas: 100 µg y 30 µg por animal, respectivamente.

*La sintomatología por intoxicación: dificultad para respirar, pelaje erizado, salivación, contracción muscular, pérdida de equilibrio, entre otros.

VI.3 Análisis de los componentes

a) Vm21

Determinación de la estructura primaria

Se inició el análisis con los componentes que presentaran mayor abundancia en el veneno, así como por la pureza de las fracciones. La primera fracción seleccionada correspondió al TR 20.96. Esta presentó solamente un componente principal y un ligero contaminante al realizar el fingerprint del veneno con una masa molecular de 3777.92. Para el proceso de purificación, se inició con la recromatografía de la fracción con un gradiente de 0 - 40% B en 60 minutos; el uso de este gradiente permitió la obtención de la muestra pura, nombrándosele Vm21 (*Vaejovis mexicanus* TR 21; Fig. 5).

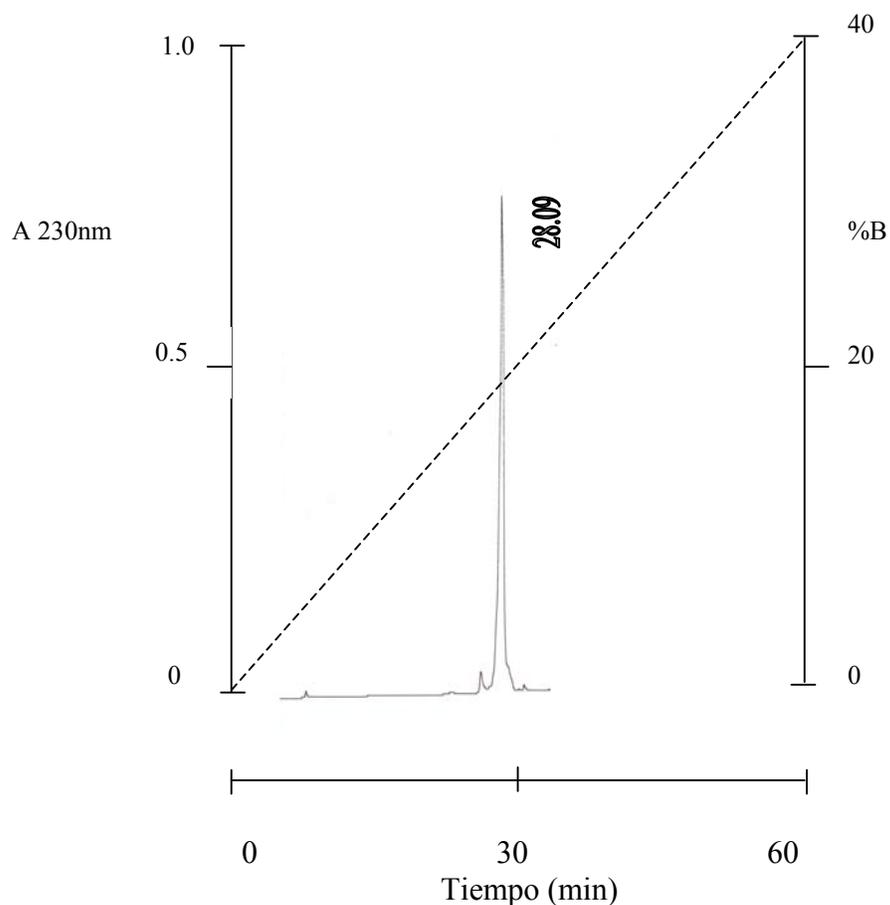


Fig. 5. Recromatografía del componente Vm21. Vm21 fue separado en una columna C18 fase reversa por HPLC, usando un gradiente lineal de solución A (0.12% de TFA en agua tetradestilada) a 40% de solución B (0.10% de TFA en acetonitrilo) en 60 minutos.

La muestra pura fue sometida al proceso de secuenciación aminoacídica por el método de degradación automática de Edman, lográndose determinar los primeros 25 aminoácidos del péptido. Para la completa secuenciación del péptido se realizó una digestión enzimática, utilizando la endopeptidasa Aspártico N. Después de la hidrólisis enzimática, los productos se separaron por HPLC (datos no mostrados) y fueron analizados. Esto se hizo por el método de Edman y por espectrometría de masas (Fig. 6). Para el extremo carboxilo fue necesario repetir la secuenciación utilizando una alícuota restante del producto de la digestión, la cual correspondía a la masa molecular del fragmento final de la secuencia. Se repitió el análisis por el método de Edman y por espectrometría de masas. Por MS/MS, se obtuvo de uno de los fragmentos, la secuencia de la mitad del péptido, del aminoácido 14 al 33 y de otro fragmento se obtuvo la secuencia de los últimos 3 aminoácidos del C terminal, confirmándose por secuencia directa. Para el análisis de la digestión teórica se utilizó el servidor de Expassy, la herramienta Peptide Mass.

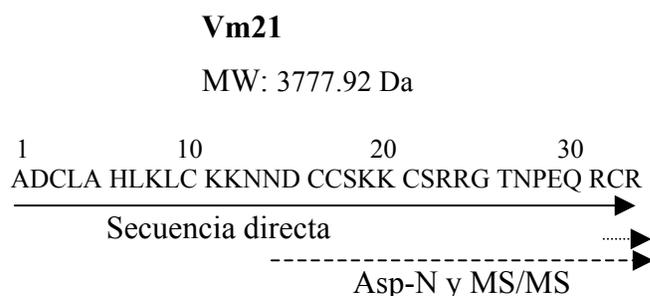


Fig. 6. Estrategia usada para la determinación de la estructura primaria de la Vm21. Se muestra la masa molecular, la secuencia de la proteína indicando con flecha continua la secuencia obtenida utilizando el método de degradación automática de Edman, y con líneas punteadas los cortes de las endoproteasas Asp-N realizando su análisis con espectrometría de masas.

Se sometió la secuencia de la Vm21 contra el banco de datos para localizar proteínas con secuencias similares. Se utilizaron buscadores como FASTA contra el banco de datos de NCBI/Blast -Swiss-Prot. Este péptido resultó poseer un gran porcentaje de identidad con toxinas de alacrán que afectan canales de calcio dependientes de Rianodina como es el caso de la opicalcina 1, opicalcina 2 y la imperatoxina; sugiriendo fuertemente una posible actividad de esta proteína sobre

canales de calcio sensibles a Rianodina. El alineamiento y porcentaje de identidad se muestran en la figura 7.

Toxina	Secuencia	% identidad
Vm21	ADCLAHLKLCCKNNDCCSKKSRRGTNPEQRCR	100
Opicalcina1	GDCLPHLKRCKENNDCCSKCKRRGTNPEKRCR	81
Opicalcina2	GDCLPHLKRCKENNDCCSKCKRRGANPEKRCR	78
Maurocalcina	GDCLPHLKLCKENKDCCSKCKRRGTNIEKRCR	78
Imperatoxina	GDCLPHLKRCKADNDCCGKKCKRRGTNAEKRCR	72
	.***.*** ** :*:***.***.***:* *:***	

Fig. 7. Comparación estructural de la toxina Vm21 con otras proteínas. Toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de Ca^{2+} presentaron un alto porcentaje de identidad con la secuencia de la Vm21. Las secuencias de la opicalcina 1 y 2 fueron obtenidas indirectamente usando secuenciación del cDNA del alacrán *Opistocampus carinatus*. La maurocalcina y la imperatoxina del veneno del alacrán *Maurus palmatus* y del *Pandinus imperator*, respectivamente.

Al obtener el alineamiento antes mencionado, decidimos corroborar la actividad de esta proteína sobre canales de calcio dependientes de Rianodina. Para lo cual enviamos 5 μ g de este péptido al grupo del Dr. Héctor Valdivia, en el Departamento de Fisiología en la Universidad de Wisconsin Medical School, Madison Estados Unidos, y que poseen toda la infraestructura para realizar este tipo de ensayos. Así, se realizó una curva dosis respuesta, donde se determinó una K_d de 91 nM (Fig. 8). Una vez realizados los ensayos de pegado de Rianodina, la Vm21 fue llamada vejovicalcina.

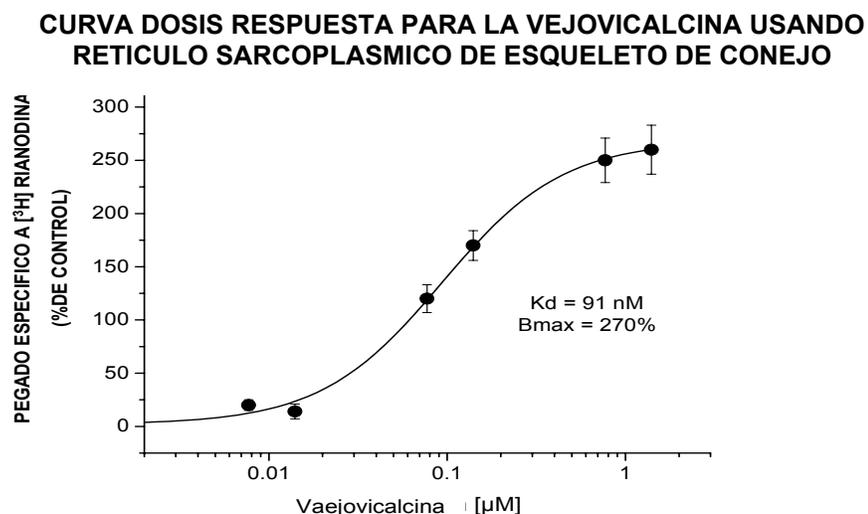


Fig. 8. Curva dosis respuesta de la Vm21 (Vejovicalcina). Rianodina fue incubada con retículo sarcoplásmico de esqueleto en medio de incubación descrito en materiales y métodos en presencia de las concentraciones indicadas de la vaejovicalcina. La K_d fue 91 nM.

b) Vm32

La masa molecular de la fracción con tiempo de retención 32.78 min fue determinada por espectrometría de masas, observándose la presencia de un pico mayoritario con una masa molecular de 3838.78 Da. Para obtener la secuencia de este componente, se sometió parte de la muestra a un proceso de purificación por HPLC, como se observa en la figura 9.

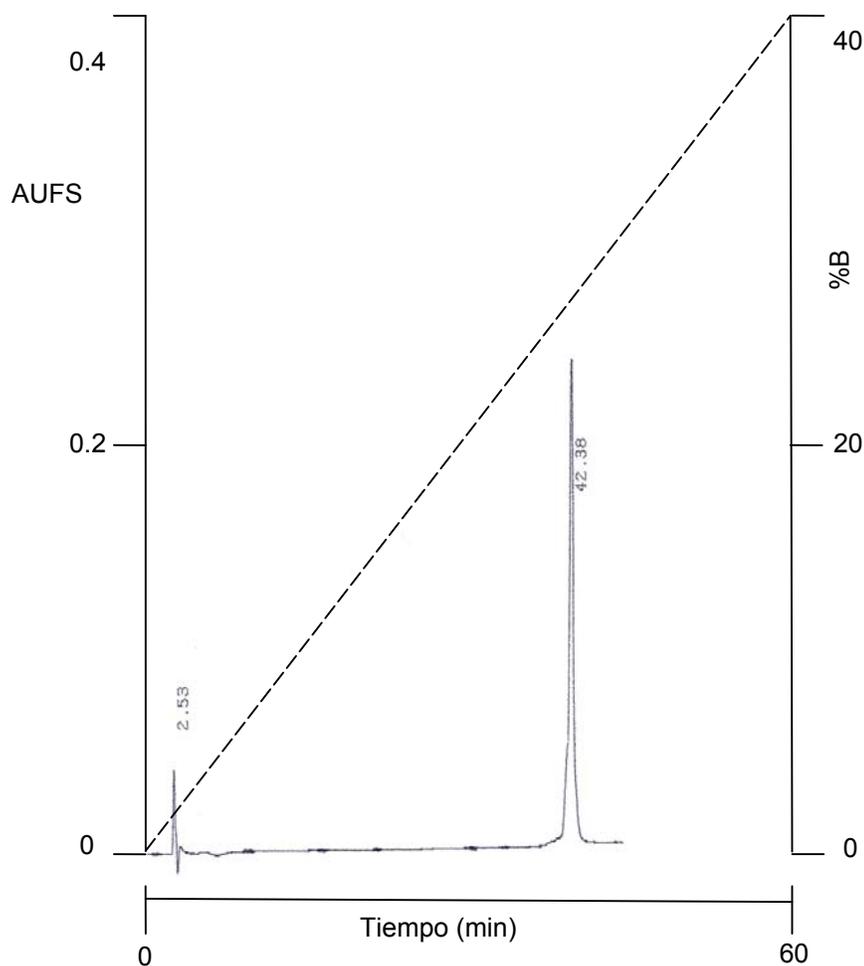


Fig 9. Recromatografía del componente Vm32. Vm32 fue separado en una columna C18 fase reversa por HPLC, usando un gradiente lineal de solución A (0.12% de TFA en agua tetradestilada) a 40% de solución B (0.10% de TFA en acetonitrilo) en 60 minutos.

Una alícuota de la muestra fue reducida y alquilada para facilitar su análisis por espectrometría de masas, dando como resultado la presencia de dos masas moleculares, 1263.56 Da y 2580.9 Da, indicando la presencia de un heterodímero.

Para la determinación de la estructura primaria del heterodímero Vm32, la fracción reducida y alquilada fue digerida con tripsina. Los péptidos generados fueron analizados por LC-MS/MS logrando determinar las secuencias de las dos subunidades con excepción de los aminoácidos que presentan isomasas. Para la diferenciación entre los aminoácidos Lisina y Glutamina, que presentan masas moleculares similares (128.095 y 128.058 Da, respectivamente), la digestión tríptica* específica para los C-terminal de Lisina fue importante en estas determinaciones.

Se confirmó la secuencia por el método de Edman. Los aminoácidos no determinados por Edman fueron confirmados analizando los componentes del heterodímero por separado en el analizador de aminoácidos. El análisis de aminoácidos permitió la diferenciación entre los aminoácidos Isoleucina y Leucina a través de la abundancia de estos en la secuencia total. De esta forma se definió que el aminoácido en la posición 11 de la subunidad pequeña era Leucina y el aminoácido en la posición 22 de la subunidad mayor era Isoleucina. Por lo tanto, el heterodímero está compuesto por una subunidad de 12 a.a y otra de 23 a.a., como se muestra en la figura 10.

El análisis realizado por espectrometría de masas permitió determinar la presencia de una amidación en el C terminal de la subunidad pequeña. La diferencia de 1 u.m.a. con respecto a la masa teórica con la masa experimental confirma esta modificación post-traducciona.

Se sometieron las estructuras primarias a una búsqueda de similitud de secuencia en la base de datos para asignarle una posible función, pero no se encontró ninguna otra secuencia que fuera significativamente similar.

*La digestión tríptica es un corte enzimático utilizando tripsina, la cual corta específicamente en el extremo C terminal de los aminoácidos lisina y arginina en un péptido.

Vm32

MW: 3838.78

Subunidad pequeña MW: 1263.56 u.m.a.1 10
FISPCPLKCGLS-NH₂→
Digestión triptica-MS/MS- - - - ->
Secuencia directa*Subunidad grande* MW: 2580.96 u.m.a.1 10 20
NFGDSKKVCLKNCFAQQA→ → →
Digestión triptica-MS/MS- - - - ->
Secuencia directa

Fig. 10. Estrategia analítica adoptada para la secuenciación del heterodímero Vm32. Se muestra la masa molecular y la secuencia de las subunidades indicando con una flecha continua los cortes con Tripsina realizando su análisis por espectrometría de masas. Con una flecha punteada se señala la secuencia obtenida por el método de Edman, que va de la posición 1 a la 10 en la subunidad pequeña y de la 1 a la 21 en la subunidad grande.

c) Secuenciación de N-terminales de otros componentes del veneno del *V.*

mexicanus smithi

Se seleccionaron fracciones del veneno total para ser purificadas por HPLC bajo diferentes gradientes lineales. Las fracciones fueron recromatografiadas utilizando diferentes gradientes lineales (Fig. 11). El material obtenido de las fracciones repurificadas fue suficiente para determinar sus masas moleculares y secuenciar sus N-terminales. La secuencia de los N-terminales de las fracciones purificadas, así como sus masas moleculares se muestran en la Tabla 2. Una vez obtenida la parte N-terminal de su secuencia, se sometieron a una búsqueda de similitud en la bases de datos. No se obtuvieron resultados significativos al momento de hacer una búsqueda de identidad y similitud. Con la cantidad de material obtenido no fue posible completar la secuencia de estos péptidos y proteínas. Inclusive para algunos el aminoácido no se pudo identificar, o presentaron dos aminoácidos para la misma posición, indicando que el péptido todavía no estaba puro. La fracción recromatografiada 42.12 (Tabla 2) mostró que contenía tres masas distintas por espectrometría de masas.

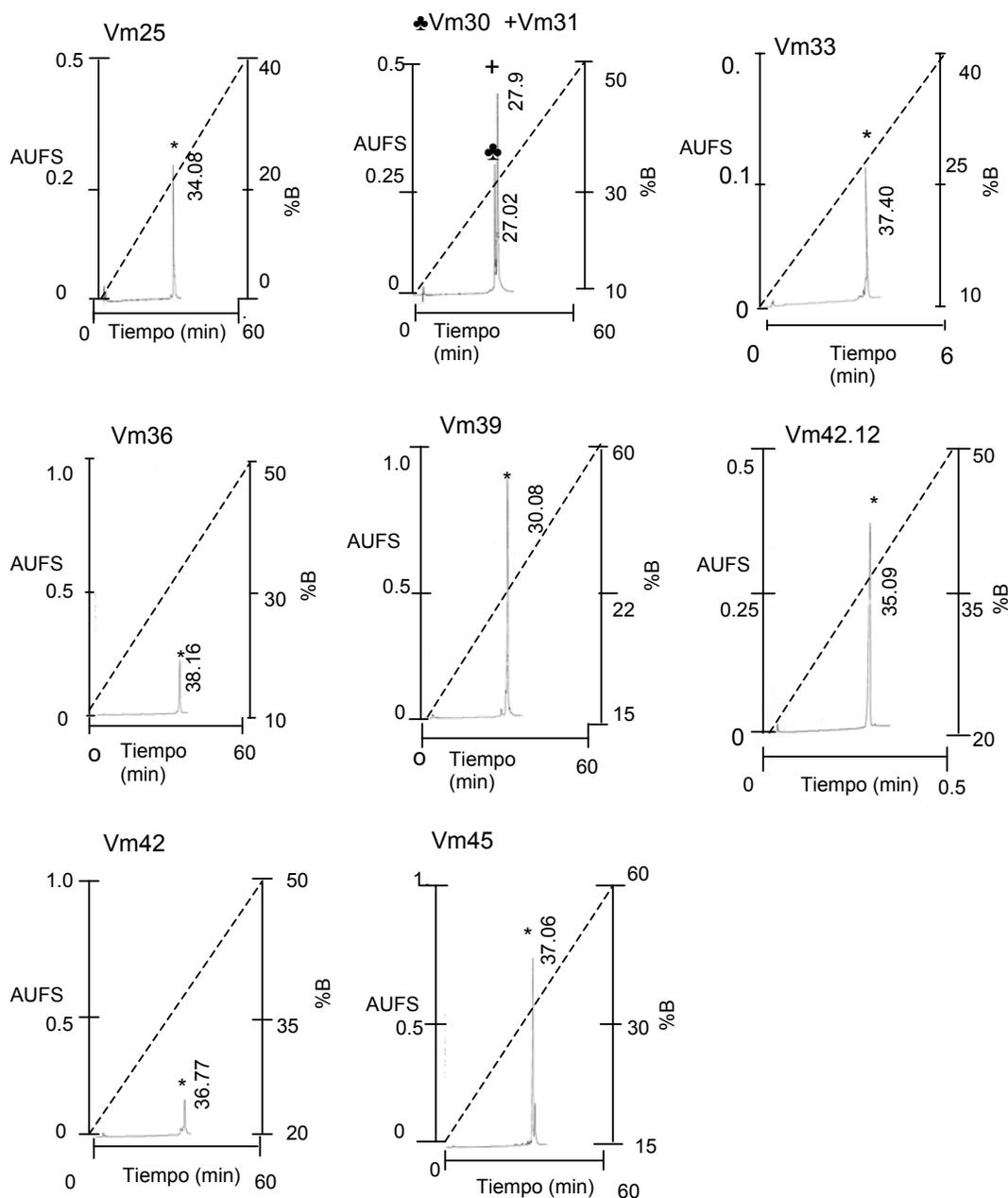


Fig 11. Recromatografías de algunos componentes del veneno del alacrán *V. mexicanus smithi*. Se utilizó una columna C18 fase reversa para HPLC. Los gradientes utilizados fueron de tipo lineal. Con un símbolo se marcaron los péptidos puros utilizados para determinar su secuencia N terminal.

Tabla 2. Secuencias N-terminal y masas moleculares de otros componentes del veneno de *V. mexicanus*

Nombre (RT)	Secuencia	MW (u.m.a.)
Vm25	KQAVK AAKSY VAN	2261
Vm30	DNYEK LKSCY QXDXD NYXNX XYTXX D	4053
Vm31	YDREK LLKCY DVCIK MYVNK YYNEC IDYCD	4625
Vm33	SKSGY PLGAN GKVTD RVPHA LAKXN STXGA	6200
Vm36	G/NWI/NSE/A K/NK/GAQD X/FV/GD	3610.42 ; 3524.4
Vm39	GKIRG LLAQD FVDK RPNGM MXNAI	8084
Vm42.12	TEIGN KGAGAGXNEA SNYEQ LGYF	3414.2/3348.5/3250.5
Vm42	ENLSD DHWKF VCSXX XETEN G	11744
Vm 45	FLSQK XN	1496

X significa aminoácido no determinado. El componente Vm36 mostró doble secuencia en algunas posiciones, indicadas por la diagonal.

VI.4 Ensayos de actividad enzimática

a) ensayos de actividad de fosfolipasa

En la realización del ensayo de actividad de fosfolipasa del veneno total, se observó la formación de un halo de actividad similar al presentado por el control positivo, este ensayo se muestra en la Fig. 12.

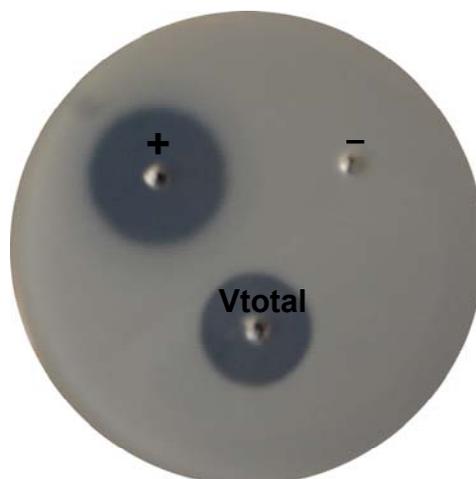


Fig. 12. Prueba de actividad de fosfolipasa de veneno total. Para este ensayo se utilizaron 10 μg de veneno total de *V. mexicanus*, 1 μg de fracción I del veneno de *Heloderma sp* como control positivo, y agua como control negativo.

Una vez realizado este primer ensayo, 9 fracciones colectadas cada 5-10 minutos de una separación de veneno total por HPLC, fueron ensayadas para determinar cual de estas fracciones presentaba actividad fosfolipásica. Junto con estas fracciones, se probó la actividad de un péptido puro (llamando PLP1_Vm), de masa molecular de 13629 kDa, la cual se encuentra en el intervalo de masas moleculares de las fosfolipasas reportadas en venenos de alacranes (13-16 kDa) (Fig. 13) (Tabla 3). Se puede observar mayor actividad en las fracciones: 4, 5, 6, 7 y 10

Tabla 3. Fracciones colectadas cada 5-10 min de Veneno separado por HPLC para pruebas de actividad de fosfolipasa

No de fracción	Fracción colectada Cada 5-10 min.	No de fracción	Fracción colectada Cada 5-10 min.
1	0-11	6	41-46
2	12-20	7	47-50
3	21-30	8	51-55
4	31-36	9	55-60
5	37-40	10	Péptido puro PLP1_Vm

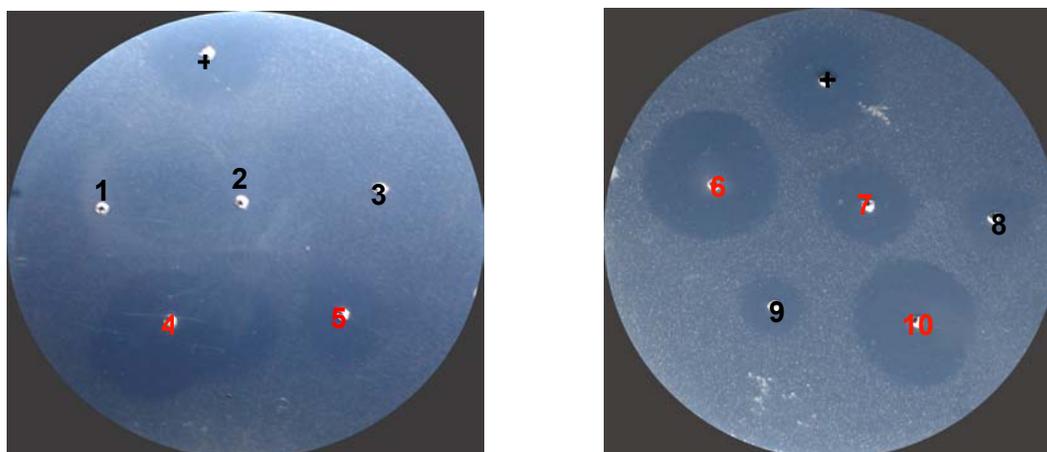


Fig. 13. Ensayos de actividad de fosfolipasa. Ensayos realizados con fracciones de veneno de *V. mexicanus* separadas por HPLC-RC colectados de 5 a la min. Se usó para los ensayos una tercera parte de cada una de las fracciones. En la muestra 10 se usaron

2 μ g. Los halos producidos por los fosfolípidos de yema de huevo con mayor diámetro se observan en las fracciones 4, 5, 6, 7 y 10, marcadas en rojo.

Los ensayos de actividad de fosfolipasa se repitieron usando 5 μ g de cada una de las 71 fracciones colectadas obtenidas de una separación del veneno de 2 mg de veneno total por HPLC. En la Tabla 4 se muestran las fracciones obtenidas de la separación del veneno y el número de placa en la cual fue probada cada fracción. Los resultados de los ensayos son mostrados en la Fig.14.

Tabla 4. Fracciones colectadas para ensayos de actividad de fosfolipasa de la separación por HPLC del veneno del alacrán *V. mexicanus smithi*.

Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6	Placa 7
# Fracción y TR						
1.- 2.49	10.- 15.96	19.- 23.17	30.- 30.03	41.- 35.74	52.- 42.62	63.- 51.63
2.- 3.80	11.- 16.30	20.- S25.52	31.- 30.64	42.- S36.51	53.- 43.71	64.- 52.40
3.- 3.80.2	12.- 17.21	21.- 25.52	32.- 31.20	43.- 36.51	54.- 44.19	65.- 53.28
4.- 4.69	13.- 18.13	22.- 26.19	33.- 31.76	44.- S38	55.- 44.40	66.- S55.39
5.- S10.96	14.- 19.06	23.- 26.51	34.- 32.75.1	45.- 38	56.- 44.88	67.- 55.39
6.- 10.96	15.- 20.48	24.- 27.20	35.- 32.75.2	46.- 38.43	57.- 45.98	68.- 57
7.- 11.31	16.- 20.94	25.- 27.90	36.- 33.44	47.- 39.12	58.- 46.32	69.- 58.77
8.- 14.29	17.- 22.35	26.- 28.27	37.- 33.82	48.- B39.12	59.- 47.74	70.- 58
9.- 14.77	18.- 22.96	27.- B28.27	38.- 34.19	49.- S41.63	60.- 48.51	71.- 61
		28.- 29.15	39.- 35.05	50.- 41.63	61.- 49.60	
		29.- 29.63	40.- S35.74	51.- 42.11	62.- 50	

Se puede observar en la figura 14, que las fracciones que mostraron actividad en las diferentes placas, son de la fracción 39 a la 51.

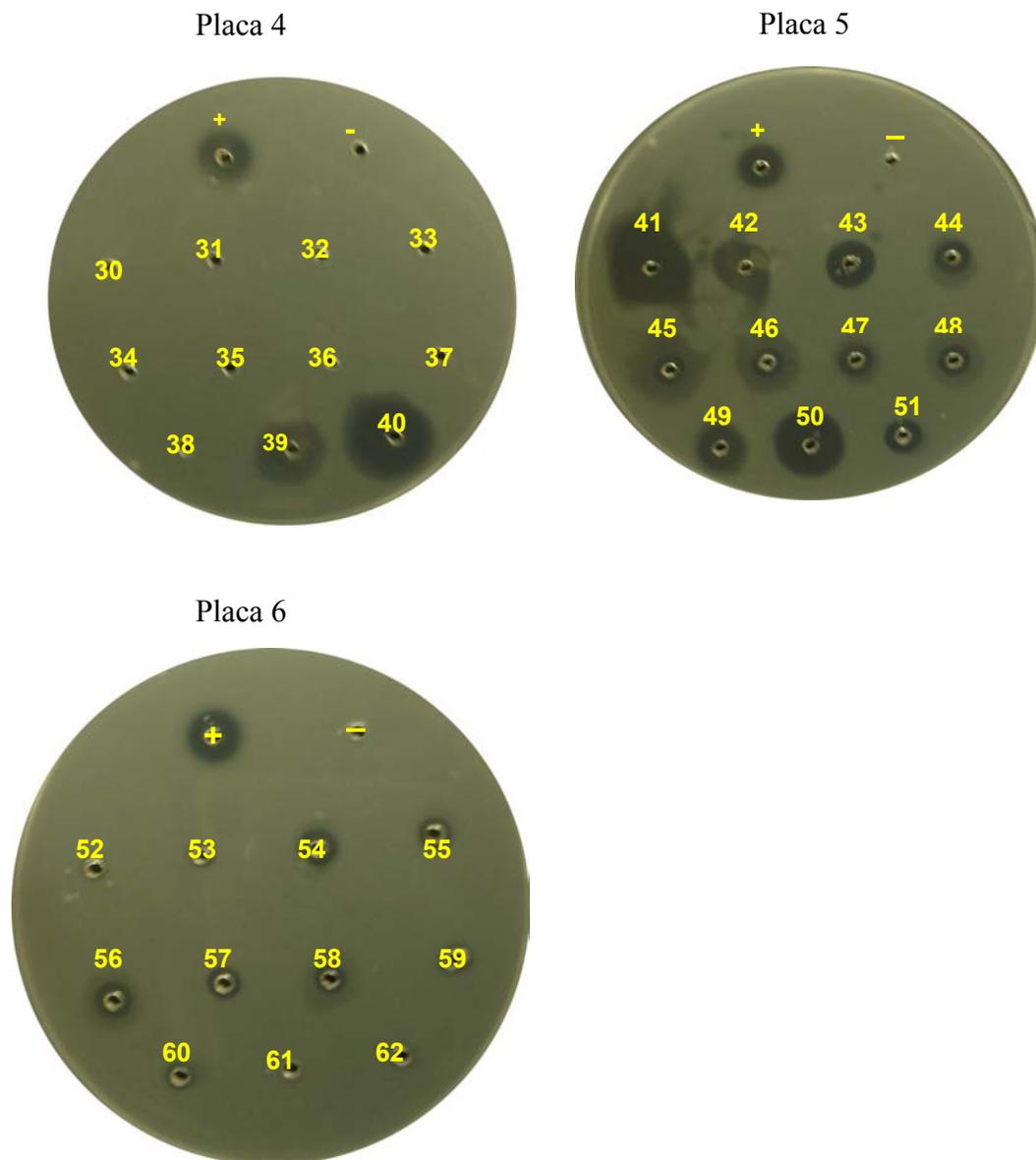


Fig. 14. Ensayos de actividad de fosfolipasa de cada una de las fracciones del veneno. Para la prueba se utilizaron 5 μ g de cada fracción. La numeración corresponde a las fracciones mencionadas en la Tabla 4. Los halos más claros, corresponden a la actividad de las fosfolipasas. El símbolo + representa el control positivo usando 1 μ g de fracción I de *Heloderma horridum*.

El péptido puro probado en el primer ensayo corresponde a un integrante de la fracción 43 (Tabla 3). Un microgramo de este péptido puro fue suficiente para mostrar una actividad similar a la de la fracción 43. Este péptido con un tiempo de retención de 36.51 fue nombrado **PLP1_Vm**. La actividad presente en las otras fracciones, indican la presencia de fosfolipasas, en el “mass fingerprint” del veneno se encuentran diferentes fracciones con masas moleculares que podrían corresponder a las de las fosfolipasas.

La determinación de la masa molecular por EIS-MS del componente PLP1_Vm presentó varias masas moleculares, como 13932.13 y 13770.06 que corresponden al peso de la pérdida de una hexosa, y la diferencia existente entre las masas 13770.06 y 13626 corresponde a diferentes grados de glicosilación, al de una desoxihexosa (fucosa y ramnosa) (Fig 15). Más aún, obteniendo la secuencia parcial por degradación de Edman de PLP1_Vm se identificó una secuencia consenso de glicosilación (NXS,T), donde X es un ácido aspártico. En nuestra secuencia no se observa directamente este sitio consenso, debido a que por esta técnica de secuenciación no se determinan aminoácidos que presentan modificaciones, por lo que deducimos que “X” en nuestra secuencia corresponde a asparagina (N) y que se encuentra glicosilada. Por lo anterior, PLP1_Vm presenta isoformas con diferentes grados de glicolisación

PLP1_Vm

Secuencia *FENPY PGTKK CGPGN IAK**“X”**ESDLGC XN* *13626 Da*

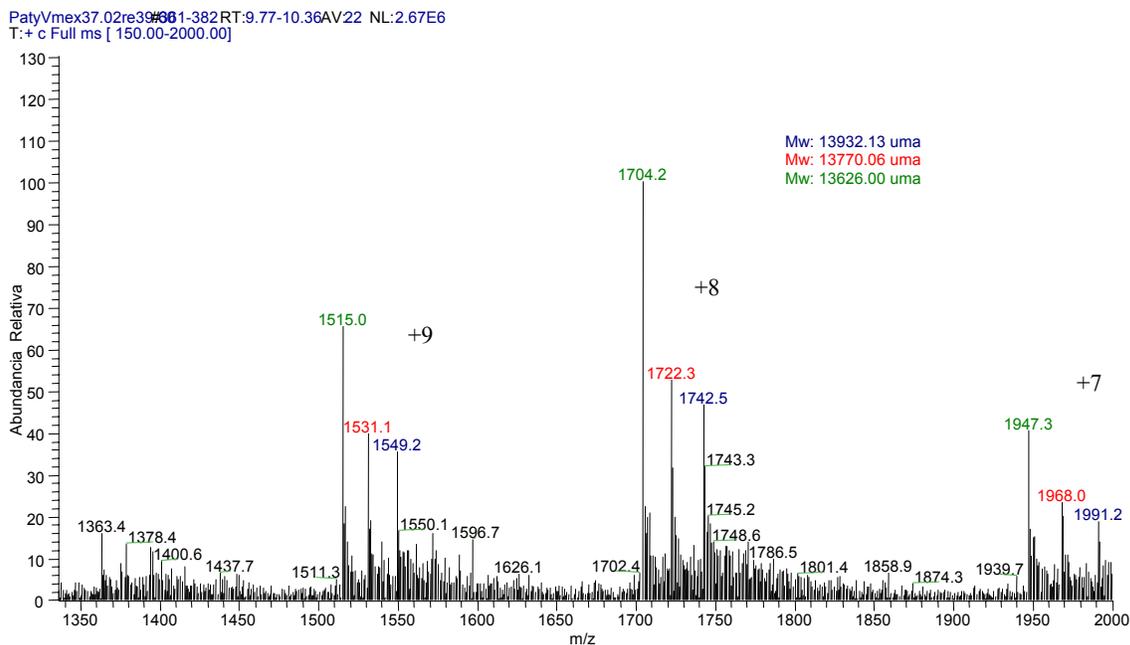


Fig. 15. Espectro de masas de la fosfolipasa PLP1_Vm obtenido por ESI-MS. Las masas moleculares indicadas en el espectro presentan especies moleculares con diferentes niveles de glicosilación. Los valores de masas moleculares obtenidos por la deconvolución del envelope proteínico m/z está insertado en la parte superior de la figura (envelope proteínico es la distribución de cargas de iones producidos por ESI/MS).

Con la secuencia parcial de la PLP1_Vm se realizó un análisis comparativo de secuencias usando los programas FASTA, EXPASy BLAST, NCBI BLAST dando un alto porcentaje de identidad con fosfolipasas de alacranes, de abejas y del lagarto de Gila; se realizó el alineamiento de las secuencias de mayor identidad con la PLP1_Vm utilizando el programa CLUSTAL W, presentados en la Figura 16.

Nombre	No. de acceso	Secuencia	% Identidad
PLABomp	Q7M4I6	-----IIYPGTLWCGNGNIANGTNELGLWKETDACCRTHDMCPDIEAHGSKH	60
PLABomt	P82971	-----IIFPGTLWCGNGNLANGTNQLGSWKETDSCCRTHDMCPDLIEAHGSKH	50
PLAApic	Q9BMK4	-----IIYPGTLWCGHGNVSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVMSAGESKH	50
PLAApid	Q7M4I5	-----IIYPGTLWCGHGNVSSSPDELGRFKHTDSCCRSHDMCPDVMSAGESKH	50
PA2_RHONO	P43318	-----GLIKPGTLWCGMGNNAETYDQLGPFADVDSCK-----	53
PA22_HELSU	P80003	-----GAFIMPGTLWCGAGNAASDYSQLGTEKDTDMCCRDHDHCSDTMAALEYKH	58
PA23_HELSU	P16354	-----GAFIMPGTLWCGAGNAASDYSQLGTEKDTDMCCRDHDHCENWISALEYKH	58
PA2_HELHO	P04362	-----GAFIMPGTLWCGAGNAASDYSQLGTEKDTDMCCRDHDHC-----	58
PLP1_Vm		FEN-----PYPGTKKCGPGNIAKXESDLG-----CXN-----	100
PHLIP_ANUPH	Q6PXP0	FL-----IVSGTKWCGNNNIAANYSDLGFLE-ADKCCRDHDHC-DHIASGETKY	67
IPTXI_PANIM	P59888	FEGRCERMGEADETMWGTKWCGSGNEATDISELGYWSNLDSCCRTHDHC-DNIPSGQTKY	61
		** ** .* : .:**	

Fig. 16. Comparación de secuencia de la fosfolipasa del *V. mexicanus* (PLP1_Vm) con otras proteínas. Alineamiento de la PLP1_Vm con fosfolipasas estructuralmente seleccionadas realizado a través del programa CLUSTAL W. Cabe destacar que la secuencia mostrada de PLP1_Vm es parcial.

VI.5 Ensayos antimicrobianos

Para la realización de los ensayos antimicrobianos se utilizaron bacterias Gram + (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*) y Gram – (*Escherichia coli*). Debido a la limitación en cantidad de veneno, se seleccionaron dos cepas representativas para aplicar cada una de las fracciones colectadas en dos separaciones por HPLC de veneno total. Las cepas seleccionadas fueron *M. luteus* y *E. coli* DH5 α . En las cepas de *Enterococcus faecalis* y *B. subtilis* se utilizó veneno total para probar su actividad antimicrobiana.

La separación de los componentes del veneno total se realizó como se indica en la sección de materiales y métodos, con una columna C18 semipreparativa. La colecta de las fracciones usadas en *E. coli* se realizó a intervalos de alrededor de 5 minutos, usando una tercera parte para el ensayo (Tabla 5).

Tabla 5. Fracciones colectadas de veneno total para la realización de ensayos de actividad antimicrobiana en *E. coli*.

Fracciones veneno total (min)				
1.- 0-5	3.- 11-15	5.- 22-25	7.- 30-37.5	9.- 41-46
2.-6-10	4.-16-20	6.- 26-30	8.- 37.5-40	10.- 47-53

En *E. coli* se observó un halo de inhibición de crecimiento bacteriano en la fracción 9 (Fig. 17).

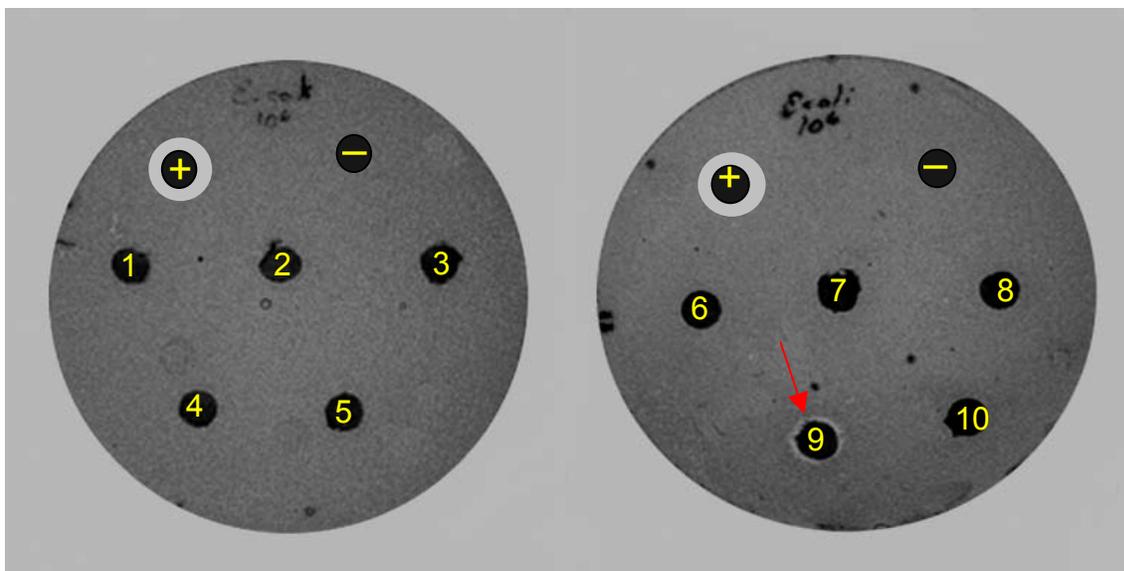


Fig. 17. Ensayos de actividad antimicrobiana en *E. coli*. La numeración indica la posición de las fracciones sobre la placa. La flecha roja señala la presencia de actividad en la fracción 9. Los símbolos + y -, indican el control positivo y negativo respectivamente

En *M. luteus* se usaron cada una de las fracciones colectadas individualmente en una corrida de veneno por HPLC. En esta ocasión las fracciones del veneno fueron depositadas directamente sobre la monocapa, ya que en una prueba realizada anteriormente se observó que no había diferencia en la muestra de actividad si las fracciones se colocaban en el papel Whatman o directamente sobre la monocapa.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se observó que solo se presentó halo de inhibición en las fracciones con TR 3.0, TR 34.0, TR 35.22, y TR 46.14 (Fig. 18)

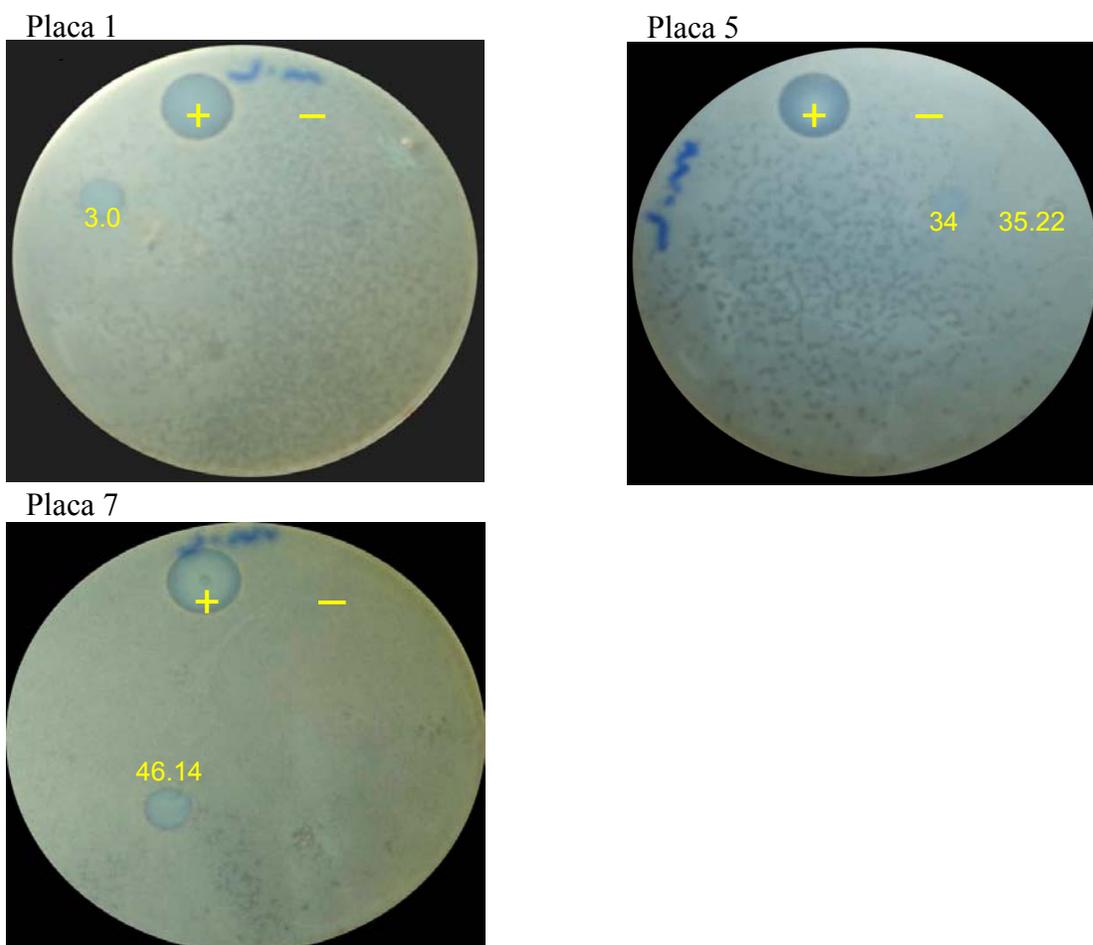


Fig. 18. ensayos de actividad antimicrobiana en *M. luteus*. De cada fracción se aplicaron 10 μg . En cada placa se encuentran marcados los tiempos de retención de las fracciones que presentaron actividad sobre *M. luteus*. En la placa I se muestra la fracción con TR 3.0, en la placa 5 las fracciones con TR 3 y 35.22 y en la placa 7 la fracción con TR 46.14. Como control positivo se utilizó 3 μg de pandinina 2* y como control negativo agua (pandinina 2 es un péptido antimicrobiano del veneno del alacrán *Pandinus imperator*).

De igual manera se probó actividad antimicrobiana en una cepa de *Enterococcus*; aplicándose una alícuota de 333 μg de veneno total, cantidad equivalente a lo inyectado en el piquete de un solo alacrán. En la Fig. 19 se puede observar el halo de inhibición de crecimiento bacteriano producido por el control positivo (ampicilina), pero no hubo actividad por parte del veneno total. Para el ensayo en la cepa de *Bacillus subtilis* debido a la sensibilidad de la cepa, se probaron 30 y 60 μg de veneno total presentándose actividad en la zona donde se depositaron los 60 μg del veneno total (Fig. 20).



Fig 19. Ensayos de actividad antimicrobiana del veneno total en *Enterococcus*. Como control positivo ampicilina, y control negativo agua



Fig 20. Ensayos de actividad antimicrobiana del veneno total en *Bacillus subtilis*. Como control positivo ampicilina, y control negativo agua.

Una vez realizados los primeros ensayos antibacterianos con las fracciones del veneno total, sobre *E. coli* se observó un halo de inhibición de crecimiento en la fracción 9 (fig 17). Para corroborar la actividad y determinar cual péptido(s) presentó la actividad, una alícuota de esta fracción fue recromatografiada (Fig 21). De acuerdo a su tiempo de retención y al tiempo en el que eluyó en su recromatografía se nombró al péptido puro Vm41.

La masa molecular de la fracción recromatografiada fue determinada por ESI-MS, presentó tres masas moleculares, de 4406, 4354.8 y 4206 Da. Ya que las señales de

masa/carga fueron de intensidades equivalentes, sugiere que se trata de isoformas de un mismo péptido.

Para observar la actividad contra *E. coli* de la fracción recromatografiada, se preparó el cultivo de bacterias como ya se mencionó anteriormente, colocándose en el papel filtro el péptido recromatografiado y el control positivo (ampicilina). Después de 12 horas a 37°C se observó halos de inhibición tanto en la fracción como en el péptido recromatografiado (Fig. 22).

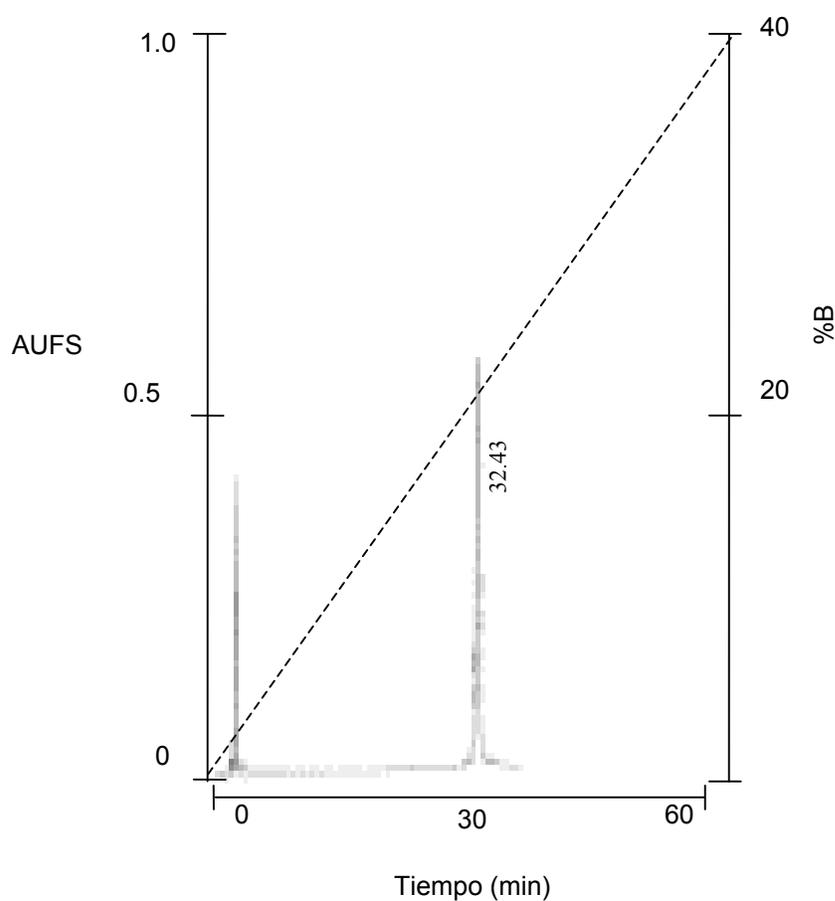
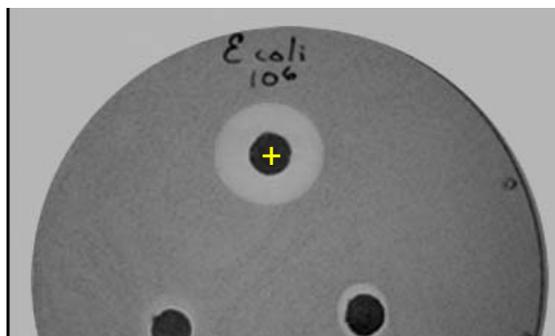


Fig 21. Recromatografía del componente Vm41.

Vm41 fue separado en una columna C18 fase reversa por HPLC, usando un gradiente lineal de solución A (0.12% de TFA en agua tetradesilada) a 40% de solución B (0.10% de



9

M

M = Muestra
recromatografiada

Fig. 22. Ensayo de actividad antimicrobiana del péptido Vm41. en *E. coli*. Se muestra la actividad de la fracción 9 y de los 10 µg del péptido Vm41. Como control positivo se usaron 10 µg de ampicilina.

Con la secuencia parcial se realizó una búsqueda con el programa FASTA y el servidor EXPASY con el fin de encontrar proteínas similares a la Vm41 (Fig. 23).

Nombre	secuencia	% identidad
Vm41	-ELFSW----AKKAWNSNIGKSLRKTAV-----	100
opistopirina2	GKVWDWIKSTAKKLWNSEPVKELKNTAL----NAAKNFVAEKIGATPS-	55
opistoporina1	GKVWDWIKSTAKKLWNSEPVKELKNTAL----NAAKNLVAEKIGATPS-	55
Parabutoporina	FKLG----SFLKKAWKSKLAKKLRAKGEMLKDYAKGLEGGSEEVPGQ	53
	:: ** *: *: *. *: ..	

Fig.23. Comparación estructural del péptido Vm41 con otras proteínas. Proteínas de alacrán que tienen actividad antimicrobiana y presentaron un alto grado de identidad con la secuencia Vm41.

Debido a la similitud presentada por la Vm41 con las secuencias de la Opistoporina 1 y 2 y con la Parabutoporina se pudo agrupar o ubicarla dentro del grupo 3 de las subfamilias de antimicrobianos de diferentes especies de alacranes, (Xian-Chun et al., 2005) Fig. 24.

Puesto que la técnica de halo de inhibición de crecimiento bacteriano es solo demostrativa, no nos ayuda a cuantificar la actividad (concentración mínima inhibitoria: MIC). Sin embargo, los integrantes de esta subfamilia presentan una alta actividad sobre un amplio intervalo de microorganismos, en donde una poca cantidad de muestra es suficiente para obtener buenos resultados.

	Subfamilia	Secuencia	NDBP-x.y nombre
1	peptide T	KKDGYP-VEYDR---AY----	1.1
	K12	LRDYANRVINGGPEAAGPPA	1.2
2	Bs10	VTMGYIKDGDKKIAKKKNKNGRKHVEIDLNKVG	2.2
3	Hadrurin	-GILKTIKSIASKVWNSKTVQKLKRKGINWVANKLGVSPQAA-----	3.1
	Parabuto porin	----FKLGSFLKKAWKSKLAKKLRAGKEMLKDYAKGLEGGEEVPGQ--	3.2
	BmKbpp	----FRFGSFLKKVWKS LAKKLRSGKQLLKDYANKVLNGPEEEAAPAE	3.3
	Pandinin1	GKVWVKWIKSAAKKIWSSEPVSQLKGQVLNAAKNYVAEKIGATPT-----	3.4
	Opistoporin1	GKVWVKWIKSTAKKLWNSEPVKELKNTALNAAKNLVAEKIGATPS-----	3.5
	Opistoporin2	GKVWVKWIKSTAKKLWNSEPVKELKNTALNAAKNFVAEKIGATPS-----	3.6
	Vm41	ELFSWAKKAWNSNIGKSLRKTAV	3.7
4	Pandinin2	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD-	4.1
	BmKb1	-----FLFSLIPSAISGLISAFK	4.2
5	BmKn1	FIGAVAGLLSLIF	5.1
	IsCT	ILGKIWEGIKSLF	5.2
	IsCT2	IFGAIWNGIKSLF	5.3
	BmKn2	FIGAIARLLSKIF	5.4
6	BmKa1	--ESEEN-----EEGSNESGKSTEAKNTDASVDN-----EDSDIDGDSD	6.1
	BmKa2	YPASMDNYDDALEELDNLDLD-DYFDLEPADFVLLDMWANMLESDFDDME	6.2

Fig. 24. Posible ubicación del péptido antimicrobiano entre las subfamilias de antimicrobianos reportados. Se tomó como referencia el artículo de Xian-Chun Zeng, Corzo G., Hahin R. (2005). IUBMB Life. 57 (1): 13-21; anexando la secuencia parcial del péptido con actividad antimicrobiana con el nombre de Vm41 al grupo en donde se presentó la mayor similitud en secuencia.

A manera de resumen, en la Tabla 6 se representan todas las secuencias completas y parciales con sus respectivos nombres y masas moleculares de acuerdo a su tiempo de retención, en donde los números en superíndice localizados a la izquierda del

nombre de los péptidos corresponden a las fracciones analizadas en el cromatograma de la Fig. 3, la abreviatura en superíndice localizadas a la derecha de algunos péptidos indica que se encuentran secuenciados completamente.

Se marcan con P*, las masas moleculares que no se presentaron al momento de hacer el “mass fingerprint”, sin embargo al determinar la masa molecular por EIS-MS y de hacer la recromatografía de la fracción se registraba la masa molecular del péptido.

Tabla 6. Secuencias totales y parciales de componentes del veneno del alacrán *V. mexicanus*

Nombre (RT)	Secuencia	MW (u.m.a.)
¹ Vm21 ^{SC}	ADCLA HLKLC KKNND CCSKK CSRRG TNPEQ RCR	3777.92
² Vm25	KQAVK AAKSY VAN	2261
³ Vmex30	DNYEK LKSCY QXDxD NYXNX XYTXD D	4053
⁴ Vmex31	YDREK LLKCY DVCIK MYVNK YYNEC IDYCD	4625
⁵ Vmex33	SKSGY PLGAN GKVTD RVPFA LAKXN STXGA	6200
⁶ Vmex32	FISPC PLKCG LS-NH3 NFGDS KKVCL KNCFA QQAHS KIN	3838.78
⁷ PLP1Vm	FENPY PGTKK CGPGN IAKXE SDLGC XN	13626
⁸ Vm 36	G/NWI/NSE/A K/NK/GAQD X/FV/GD	3610.42 P*; 3524.4
⁹ Vm 39	GKIRG LLAQD FVDRK KPNGM MXNAI	8084 P*
¹⁰ Vm41.12	TEIGN KGAGAGXNEA SNYEQ LGYF	3414.5/3348.5/3250.5
¹¹ Vm 41	ELFSW AKKAW NSNIG KSLRK TAV	4406/ 4354.8/4206
¹² Vm42	ENLSD DHWKF VCSXX XETEN G	11744 P*
¹³ Vm 45	FLSQK XN	1496 P*

SC: indica secuencia completa

P*: masas moleculares obtenidas por EIS-MS

VII. DISCUSIÓN

*Características estructurales de los componentes del veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus smithi**

Se han observado y reportado variaciones en el perfil cromatográfico de venenos de alacranes separados por HPLC fase reversa. Estas variaciones de perfil cromatográfico se han atribuido a diferencias entre los ejemplares de la misma especie en términos de género, época del año, hábitat, tiempo y alimentación en cautiverio; almacenamiento y uso del veneno (Pimenta et al., 2003, Batista C. V. et al., 2004). Estas variaciones cromatográficas también se presentaron al analizar el veneno del alacrán *V. mexicanus smithi*. Sin embargo, solamente fueron variaciones cuantitativas, disminuyendo o elevando el área bajo la curva del péptido al hacer su separación por HPLC. Se estima que el veneno de los alacranes poseen mas de doscientos diferentes componentes y es debido a esta alta diversidad proteínica que los componentes se sobrelapan en el cromatograma haciendo mas complicada su purificación.

Durante la realización del mapeo de masas moleculares presentes en el veneno, no se logró determinar las masas moleculares de todas las fracciones colectadas por nano EIS-MS. Las razones son muy conocidas, ya que a pesar de que el sistema de ionización por electrospray es difundido ampliamente como un sistema de ionización suave (soft ionization), durante su uso se generan múltiples poblaciones iónicas, cuyo número es dependiente de la estabilidad del solvente, repulsión iónica, voltaje aplicado, y estructura tridimensional de la molécula entre otros. De esta forma, cuando moléculas puras con peso molecular relativamente alto (> 10 KDa) y con características básicas son ionizadas, esas pueden formar poblaciones moleculares con más de 20 cargas, que serán detectadas según su relación masa carga (m/z). Una mezcla que contiene mas de dos proteínas de alto peso molecular, cuando son analizadas por electrospray, generan una serie de señales m/z inestables, lo que imposibilita la deconvolución de las masas moleculares integrales de la mezcla. Este fenómeno también se observa frecuentemente cuando se analizan proteínas puras, pero que presentan isoformas con diferentes grados de glicosilación, lo que fue observado en componentes del veneno en estudio. Para superar este problema técnico, se usaron dos alternativas distintas: 1) la repurificación por RP-HPLC analítico de las fracciones que presentaron mezclas complejas de alto

peso molecular y 2) la determinación de las masas moleculares a través del sistema MALDI-TOF, que produce básicamente señales m/z , $[M+H]$ y $[M+H]_2$. Con la aplicación de esta metodología se logró aumentar considerablemente el número de masas moleculares presentes en el veneno. Sin embargo, una docena de fracciones mostradas en la Tabla 1 aparecen como indeterminadas. Estas indeterminaciones se pueden atribuir al hecho de que los venenos no son constituidos solo de proteínas y péptidos, sino también por ácidos nucleicos, sales, aminas bioactivas, mucopolisacáridos y biopolímeros de naturaleza desconocida.

Para el análisis de los espectros adquiridos por ambos métodos de ionización, ESI y MALDI mostrados en la tabla 1, se eliminaron los valores de masas moleculares correspondientes a los aductos formados por Na^+ y K^+ y las combinaciones ente ambos $[M+H]^+$, $[M+H+Na]^+$, $[M+H+K]^+$, $[M+H+2Na]^+$, $[M+H+2K]^+$, pues se tratan de artefactos generados durante el análisis. De la misma manera fueron retirados los valores correspondientes a las oxidaciones (+16), que en general son modificaciones químicas producidas por la manipulación de la muestra que sufren los aminoácidos metionina y triptófano, en la mayoría de los casos.

De 73 de las 85 fracciones obtenidas de la separación del veneno total por HPLC, se determinaron un total de 342 componentes presentes. Sin embargo a doce de las 85 fracciones no fue posible determinar la masa molecular de sus componentes (Tabla 1).

Al organizar en intervalos las masas moleculares se logro determinar las frecuencias de los componentes de bajo, medio y alto peso molecular (Fig. 4). Se observó claramente la gran variabilidad y mayor número de componentes de bajo peso molecular. De igual manera se distingue que es mas frecuente localizar toxinas para canales de potasio en masas moleculares de bajo peso (Rodríguez de la Vega et al., 2003), y por el contrario, es mínima la probabilidad de encontrar toxinas que afecten canales de sodio en este mismo intervalo de masa molecular (Rodríguez de la Vega y Possani, 2005). La ausencia de toxinas específicas que modifican el mecanismo de apertura y cierre de canales iónicos en el veneno de *V. mexicanus smithi*, corroboró su

baja toxicidad y por ende la falta de letalidad en mamíferos. Lo anterior se hace aún mas evidente cuando se compara la cantidad de toxinas específicas para canales de sodio presentes en especies de alacranes que poseen un alto grado de toxicidad en mamíferos como son: *T. cambridgei* (Batista C. V. et al., 2004), *T. serrulatus* (Pimenta et al., 2001), *T. costatus* (Diego-García et al., 2005) y *T. pachuyrus* (Barona et al., 2005).

Tomando en cuenta la sintomatología presentada en grillos (*Acheta domesticus*) podríamos especular acerca de cuales podrían ser las toxinas responsables de los efectos antes mencionados. Péptidos similares a los caracterizados en este trabajo y que se encuentran en el veneno de otros alacranes, son responsables de el efecto toxico en insectos. Por lo que, podríamos inferir que péptidos como la vejovicalcina, toxinas bloqueadoras de canes, PLP1_Vm y fosfolipasas encontradas en el veneno de *V. mexicanus* son responsables de la letalidad en *Acheta domesticus*, sin embargo es probable que existan otros componentes aun no caracterizados que pudieran contribuir en este efecto.

No es frecuente encontrar toxinas que afecten canales de calcio como lo son aquellas que afectan canales de sodio o de potasio. Se han reportado la presencia de estas toxinas en venenos de los alacranes *Buthotus judaicus* (Zhu X et al., 2004), *Pandinus imperator* (Zamudio et al., 1997), *Maurus palmatus* (Fajloun et al., 2000) y *Opisthophthalmus carinatus* (Zhu S et al., 2003). En este último, la secuencia del péptido fue extrapolada a partir de su RNAm llegando a ser expresado en sistemas heterólogos. El aislamiento, identificación y caracterización del componente denominado como Vm21 (Vejovicalcina), como activador de canales de calcio en el veneno del alacrán *V. mexicanus*, es inédita entre las especies mexicanas ya estudiadas. Datos electrofisiológicos preliminares, utilizando canales de calcio dependientes de rianodina, demostraron efectivamente su actividad sobre estos canales, con una Kd de 91 nM. A través de los datos experimentales de secuenciación, se definió inequívocamente su estructura primaria. La búsqueda de similitud de secuencia en los bancos de datos públicos reveló un 84% (27/32) de identidad con Opicalcina 1. La identidad secuencial

de la Vm21 con otras toxinas bloqueadoras de canales de calcio, corrobora los resultados previos obtenidos por electrofisiología. Zamudio et al., 1997, reportan que la Imperatoxina A presentó una K_d de 5nM la cual es 18.5 mas afin que la presentada por la vejovicalcina, al ser probada bajo las mismas condiciones. Se sabe que la Imperatoxina A, Maurocalcina, las Opicalcinas 1 y 2 comparten un segmento estructural básico que es similar al “loop” II-III de dihidropiridina del músculo esquelético que ha sido propuesto como un activador de los receptores de rianodina (Fajloun Z et al., 2000). Este segmento básico (KKCKRR), localizado en la posición 19-24, también está completamente conservado en la Vm21. Se considera como una estructura efectora endógena que mimetiza el “loop” II-III del receptor de dihidropiridina, el cual es crucial para el acoplamiento de la excitación y contracción muscular. Por lo tanto se espera que la identificación y caracterización de este bloqueador de canales de calcio sea útil para determinar los mecanismos moleculares que coordinan el acoplamiento excitación/contracción, así bien, de la cadena de eventos conformacionales que dirigen los mecanismos de apertura de los receptores de rianodina.

La presencia de componentes heterodimericos en venenos no han sido muy reportados. Estos tipos de péptidos diméricos o heterodiméricos se han identificado en el veneno de diversos alacranes como es en el caso de la phaiodactilipina en el *Anuroctonus Phaiodactylus* (Valdez-Cruz et al., 2004), la imperatoxina y la fosfolipina del *Pandinus imperator* (Zamudio et al., 1997; Conde et al., 1999), LVP1 en *Buthus occitanus tunetanus* (Soudani et al., 2005) y en el *Androctonus crassicauda* (Caliskan et al., 2006). La presencia de un heterodimero en el veneno del alacrán *V mexicanus*, el componente Vm32, es interesante sobre el punto de vista estructural, ya que a todos los resultados de ensayos de actividad biológica a los que fue sometido resultaron negativos. El reto que presentan estas moléculas, que son estructuralmente evolucionados, es encontrar el blanco farmacológico para el cual están genéticamente codificadas. Al analizar el péptido Vm32, se encontró que los aminoácidos en las posiciones 5 y 9 de la subunidad pequeña y en la posiciones 9 y 13 de la subunidad mayor, se encuentran ocupados por cisteínas y que las cuatro están involucradas en la formación de los dos puentes disulfuro presentes en la molécula heterodimérica. Debido a la poca cantidad de este péptido en el veneno total, no fue posible determinar

específicamente los pares de cisteínas que conforman los dos puentes disulfuro. Con las dos secuencias, el análisis de búsqueda de similitud de secuencias en las bases de datos, no produjo ningún resultado significativo, de otros péptidos previamente conocidos

La biodiversidad proteómica presentada por organismos con millones de años de evolución, como es el caso del veneno de los alacranes, es extremadamente rica y aún poco conocida. Este es el primer estudio realizado a nivel de elucidación estructural de los componentes de este veneno y por consecuencia muchas moléculas parcialmente caracterizadas (secuenciación de N-terminales) no presentan similitud con ninguna otra disponible en los bancos de datos. El caso de la estructura Vm32 previamente descrito, es apenas uno de los casos de nuevas moléculas totalmente caracterizadas que no presentan ninguna posibilidad de predicción funcional. De la misma forma, el componente Vm31, cuya estructura primaria fue secuenciada en un 75%, no presenta similitud de secuencia significativa con otras proteínas conocidas, según los puntajes y valores de espectancia (E) reportados por el buscador protein-protein Blast del NCBI. Por otro lado, los datos proteómicos obtenidos también significan una apertura de perspectivas para la búsqueda sistemática de funciones biológicas en el área. En relación a los péptidos, en que los N-terminales secuenciados alcanzaron un bajo porcentaje de cobertura de su estructura primaria, o que presentaron secuencias aminoacídicas de baja complejidad, es evidente la necesidad de una adquisición adicional de datos que posibiliten la anotación funcional de estas proteínas.

Actividad de Fosfolipasas

Las fosfolipasas están presentes en su mayoría en el veneno de alacranes que no presentan toxicidad a mamíferos, como es el caso del *Pandinus imperator* (Conde et al., 1999) y en *A. phaiodactylus* (Valdez-Cruz et al., 2004). Hasta ahora no se han reportado fosfolipasas en el veneno de los alacranes de la familia Buthidae, los que presentan alta toxicidad para mamíferos.

Se han encontrado fosfolipasas en veneno de alacranes pertenecientes a la super familia (clado) Diplocentroide, en la cual se agrupan los alacranes *Pandinus imperator*, *Anuroctonus phaiodactylus* y *V. mexicanus smithi*.

En este trabajo, se observó la presencia de actividad de fosfolipasas en varias fracciones del veneno las cuales no fueron secuencias debido a la poca cantidad de material presente en el veneno y por la dificultad de su purificación. A través de los datos producidos por el análisis total de las masas moleculares o moléculas presentes en el veneno, fueron encontradas masas moleculares alrededor del rango de fosfolipasas reportadas en abejas, alacranes y en el monstruo de cuentas (*Heloderma horridum*). La presencia de actividad de fosfolipasa en varias fracciones del veneno, sin que estas estén en un rango de masas moleculares predichas para las fosfolipasas, podría explicarse por la contaminación de fracciones contiguas.

Al analizar las series iónicas producidas en la determinación de la masa molecular por ESI-MS de la fosfolipasa, se observó la presencia de diferentes niveles de glicosilación en la misma población molecular. La diferencia entre las diferentes masas moleculares obtenidas para el péptido 13932.13 y 13770.06 corresponden al peso de una hexosa, y la diferencia existente entre las masas 13770.06 y 13626 corresponden a una desoxihexosa (fucosa y ramnosa). Además de la determinación de las masas moleculares donde se verifican los diferentes niveles de glicosilación de esta proteína, la secuenciación directa del N-terminal de la proteína por el método de degradación automática de Edman, reveló un sitio putativo de glicosilación, donde el segmento XES secuenciado se ajusta a los tri-péptidos putativos para N-glicosilaciones en asparaginas (NXS/T)

Los criterios para clasificar a las fosfolipasas A2 dentro de los trece grupos propuestos se requiere: 1) la enzima debe catalizar el enlace éster en la posición 2 de un fosfolípido. 2) la secuencia de aminoácidos debe ser completamente caracterizada. 3) las secuencias deben mostrar un alto grado de homología debiendo conservar más del 30% de identidad. Los parálogos deben ser clasificados en subgrupos. Los homólogos de diferentes especies deben ser clasificados en el mismo subgrupo según Six y Dennis (2000). De acuerdo a la secuencia parcial determinada, no es posible ubicar la fosfolipasa de este alacrán en la clasificación de fosfolipasas A2; sin embargo la

secuencia obtenida presenta un alto porcentaje de identidad con fosfolipasas que se han clasificado en el grupo tres, que incluyen fosfolipasas de abejas, lagartos y alacranes.

Actividad Antimicrobiana

Se han descrito varios péptidos antimicrobianos en el veneno y en la hemolinfa de diversos alacranes, péptidos tipo defensinas en *Leiurus quinquestriatus* (Cociancich et al., 1993), *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier et al., 1996). Algunos con dos o tres puentes disulfuro: además de péptidos α -hélice reportados de *Hadrurus aztecus* (Torres-Larios et al., 2000) y de *Pandinus imperator* (Corzo et al., 2001; Conde et al., 2000), los cuales presentaron diferente actividad sobre cepas Gram + y Gram -.

En los ensayos realizados en *Enterococcus faecalis*, no se observó actividad antibacteriana en el veneno total, sin embargo, en *B. subtilis*, al probar alícuotas de 30 y 60 μ g. solo se presentó actividad en la de 60 μ g. A bajas concentraciones de veneno no hay actividad *B. subtilis* que es una cepa bastante sensible a otros péptidos de alacrán ya reportados. Al llevar a cabo los ensayos antimicrobianos en *E. coli* se observó actividad solamente en una fracción. Separar los componentes de la fracción permitió purificar un péptido mayoritario del cual fue posible obtener su N- terminal y al realizar nuevamente los ensayos con el péptido purificado, este presentó actividad con solo 9 μ g. Las tres masas moleculares determinadas de esta fracciones nos pueden indicar la presencia de posibles isoformas de la proteína o contaminantes de la muestra, las cuales presentan la misma hidrofobicidad ya que al separarse por HPLC, eluyen por la columna con el mismo tiempo de retención. Su carácter básico se evidenció por el contenido de aminoácidos básicos en su N-terminal, como se puede ver en el alineamiento de la secuencia parcial con proteínas ya caracterizadas (Fig. 24). Sin embargo, con la secuencia obtenida hasta el momento no ha sido posible precisar si las tres masas estimadas para este antimicrobiano son modificaciones presentes en la muestra o contaminantes que presentan diferencias en uno o dos aminoácidos. Por la secuencia conservada de S(X)3KXWXS(X)5L que presenta este péptido en su N terminal con respecto a las secuencias de la Pandinina 1, Opistoporina 1 y Opistoporina 2 (péptidos

catiónicos α -helices); aun sin tener la secuencia completa del péptido que es de alrededor de 42 aminoácidos, con ya la mitad de la secuencia determinada podemos inferir que es un péptido que no presenta puentes disulfuro (NDPBs). Siguiendo los principios de clasificación de Xian-Chun Zeng, Corzo G., Hahin R., basados en la actividad farmacológica, longitud y estructura similar, podemos ubicar a este péptido dentro del grupo 3 de las subfamilias de antimicrobianos de diferentes especies de alacranes, (Xian-Chun et al., 2005; Fig. 25).

En *Micrococcus luteus* se probó cada una de las fracciones del veneno observándose actividad en 4 fracciones del veneno. Se ha correlacionado la presencia de citratos en la fracción con tiempo de retención 3.00, ya que algunos autores han sugerido la presencia de citratos en el veneno de diversos artrópodos inhibiendo las diferentes actividades presentes en el mismo, y/o facilitando la anticoagulación de la sangre de la presa al funcionar como un agente quelante (Odell et al., 1998, Odell et al., 1999). Este componente ha sido identificado como uno de los mayoritarios en venenos de abejas, serpientes como *Crotalus atrox*, *Bothrops picadoi*, y se ha reportado que la presencia de estos citratos en alacranes promueve el almacenamiento del veneno en la glándula y permite su activación en la presa (Fenton et al., 1995; Odell et al., 1998, Odell et al., 1999). Debido al bajo peso molecular de los citratos, estos pueden localizarse en los primeros tiempos de retención en la separación de veneno realizado por HPLC. La presencia de citratos en el veneno puede inhibir el crecimiento bacteriano a través de cambiar el pH a uno no permisivo para la cepa *Micrococcus luteus*. En *E. Coli* no se presentó tal actividad ya que su rango mínimo de tolerancia de pH es de 4-4.4, a diferencia de *M. luteus* que es de 3-3.5. En el caso de las otras 3 fracciones se puede inferir que esta cepa es mas sensible que *E. coli*, debido a que hay fracciones que presentan actividad en *B. subtilis* y que no se encuentran en *E.coli*, sin embargo estos péptidos serían de peso molecular alrededor de 3-5 kDa ya que estan en el rango de masa modular que se registraron en las fracciones correspondientes en el mass finger print (Tabla 1).

VIII. CONCLUSIÓN

La caracterización de los componentes del veneno de animales ponzoñosos ha sido un tema de estudio desde décadas anteriores, por lo que el obtener un método que facilite la rápida identificación de péptidos de importancia fisiológica es un reto y al mismo tiempo una limitante.

Este trabajo se centró particularmente tanto en la caracterización como en el aislamiento y purificación de nuevos péptidos con actividad biológica, en el veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus smithi*.

El análisis del veneno de este alacrán, endémico de la zona norte del estado de Morelos, permitió darnos una idea de la gran variabilidad de componentes presentes en el veneno de arácnidos. Este trabajo contribuyó al enriquecimiento de nuestro conocimiento acerca de la composición del veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus smithi*, del cual no se había reportado nada hasta el momento.

Sé encontró actividad de fosfolipasa en el veneno y se caracterizó parcialmente una de las fosfolipasas presentes. Así mismo, identificamos varios péptidos con actividad antimicrobiana, de los cuales uno de ellos se estudio más a detalle presentando actividad en *E. coli*.

Se identificó un péptido, nombrado Vejovicalcina, que activa canales de calcio sensibles a Rianodina, y péptidos para los cuales su función no fue determinada.

IX. PERSPECTIVAS

- Obtención de mayor cantidad de toxina Vm21 para continuar los ensayos de actividad sobre canales de calcio sensibles a Rianodina.
- Obtención de mayor cantidad de la enzima fosfolipásica con el fin de obtener su secuencia completa y localizar los sitios de glicosilación, así como medir su actividad calcio dependiente y su actividad enzimática.
- Determinar la secuencia completa y continuar los estudios (determinación de la concentración mínima inhibitoria) del péptido parcialmente caracterizado que presenta actividad antimicrobiana sobre *E. coli* y probar su actividad en diferentes cepas.
- Generar un banco de cDNA a partir de la glándula del alacrán *Vaejovis mexicanus smithi*
- Definir ensayos de actividad tóxica del veneno en insectos para su uso biotecnológico como bioinsecticida.

X. BIBLIOGRAFIA

Alagon A. C, Maldonado M. E, Julia J. Z, Sanchez C. R, Possani L. D. (1982). Venom from two sub-species of *Heloderma horridum* (Mexican beaded lizard): general characterization and purification of N-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrolase. *Toxicon*. 20 (2):463-75.

Alfredo Torres-Larios, Gurrola G., Zamudio F. Z., Lourival D. Possani L. D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem*. 267, 5023-5031.

Bagdany M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gaspar R, Possani LD, Panyi G. 2005. Anuroctoxin, a New Scorpion Toxin of the α -KTx 6 Subfamily, Is Highly Selective for Kv1.3 over IKCa1 Ion Channels of Human T Lymphocytes. *Molecular Pharmacology*, Vol 67, No 4. 1034-1044.

Barona J, Batista CV, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Wanke E, Otero R, Possani LD. (2005). Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na(+)- and K(+)-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim Biophys Acta*. Aug 26

Batista C. V., Gomez-Lagunas F., Lucas S., Possani L. D. (2000). Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K(+)-channels *FEBS Lett*. 486 117-120.

Batista C. V., Gomez-Lagunas F. Rodriguez de la Vega R., Hajdu,P., Panyi G. Gaspar R., and Possani L. D. (2002). Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K(+)-channels with distinctly different affinities.

Batista C. V., Del Pozo L., Zamudio F. Z. Contreras S., Becerril B., Wanke E., Possani,L. D., (2004). Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins *J Chromatogr. B. Analyt. Technol Biomed Life Sci* 803 55-66.

Benkhadir K, Kharrat R, Cestele S, Mosbah A, Rochat H, El Ayeb M, Karoui H. (2004). Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. *Peptides* 25 151-161

Bruno Lebrun, Régine Romi-Lebrun, Marie-France Martin-Eauclaire, Akikazu Yasuda, Masaji Ishiguro, Yoshiaki Oyama, Terumi Nakajima. (1997). A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K⁺ channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem J*. 328, 321-327.

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

Caliskan F, Garcia BI, Coronas F. I., Batista C. V., Zamudio F. Z., Possani L. D. (2006). Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. *Toxicon*. Jul;48(1):12-22.

Cestele S, Catterall WA. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*. Sep - Oct; 82 (9-10): 883-92. Review

Cociancich S, Goyffon M, Bontems F, Bulet P, Bouet F, Menez A, Hoffmann J. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun*. 194(1):17-22.

Conde R, Zamudio F. Z., Becerril B., Possani L.D. (1999) Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS Lett*. 460, 447-450.

Conde R, Zamudio F. Z., Rodriguez M. H., Possani L. D. (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett*. 14; 471(2-3):165-8.

Corona M, Gurrola G. B, Merino E, Cassulini R. R., Valdez-Cruz N. A., Garcia B., Ramirez-Dominguez M. E, Coronas F. I., Zamudio F. Z., Wanke E, Possani L. D. (2002). A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Lett*. 4;532(1-2):121-6.

Corona M, Coronas FV, Merino E, Becerril B, Gutierrez R, Rebolledo-Antunez S, Garcia DE, Possani LD. (2003) A novel class of peptide found in scorpion venom with neurodepressant effects in peripheral and central nervous system of the rat. *Biochim Biophys Acta*. Jun 26;1649(1):58-67.

Corzo G., Escoubas P., Villegas E., Barnham K, J., He W., Norton R, S., and Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J*. 359, 35-45.

DeBin J A, Maggio J E, Strichartz G R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol*. 264(2 Pt 1): C361-9.

Diego-García E, Batista CV, García-Gomez BI, Lucas S, Cándido DM, Gómez-Lagunas F, Possani LD. (2005). The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*. 1;45(3):273-83.

Escoubas P, Chamot-Rooke J, Stocklin R, Whiteley BJ, Corzo G, Genet R, Nakajima T. (1999). A comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry methods for the

analysis of crude tarantula venoms in the *Pterinochilus* group. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 13(18):1861-8.

Escoubas P., Corzo G., Whiteley B. J., Célérier M-L., Nakajima T. (2002). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venom. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 16: 403-413.

Ehret-Sabatier L, Loew D, Goyffon M, Fehlbaum P, Hoffmann JA, van Dorsselaer A, Bulet P. (1996). Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem.* 271(47):29537-44.

Fajloun Z, Kharrat R, Chen L, Lecomte C, Di Luccio E, Bichet D, El Ayeb M, Rochat H, Allen PD, Pessah IN, De Waard M, Sabatier JM. (2000). Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca(2+) release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 469(2-3):179-85.

Fenton A.W., West P. R., Odell G. V., Hudiburg S. M., Ownby C. L., Mills J. N., Scroggins B. T., Shannon S. B. (1995). Arthropod venom citrate inhibits phospholipase A2. *Toxicon* 33, 763-770.

Fet V., Sissom D W., Lowe G., Braunwalder M E. (2000) Catalog of the scorpions of the world (1758-1998). The New York Entomological Society.

Froy O, Sagiv T, Poreh M, Urbach D, Zilberberg N, Gurevitz M. (1999). Dynamic diversification from a putative common ancestro of scorpion toxins affecting sodium, potassium, and chloride channels. *J. Mol. Evol.* 48(2): 187-96

Meissner G. (1984). Adenine nucleotide stimulation of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 259: 2365-2374.

Gurrola GB, Possani LD. (1995). Structural and functional features of noxiustoxin: a K⁺ channel blocker. *Biochem Mol Biol Int.* 37 (3):527-35.

Ganz T., Lehrer R. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Current Opinion in Immunology.* 10:41-44

Habermann E. Hardt K. L. (1972). Sensitive and specific plate test for yhe quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* 50. 163-173.

Hwang, P. M. and Vogel, H. J. (1998). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol.* 76, 235-246.

Inceoglu B, Lango J, Wu J, Hawkins P, Southern J, Hammock B D. (2001). Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae). *Eur. J. Biochem.* 268(20): 5407-13

Jover E., Couraud F., Rochat H. (1980). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys.* 278 (2), 319-325.

Miller C. (1995). The charybdotoxin family of channel-blocking peptides. *Neuron* 15: 5-10

Moerman L., Bosteels S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., and Scoofls, L. (2002). Antibacterial y antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from Southern Africa. *Eur. J. Biochem.* 268,1-12.

Odell G.V., Ferry P. C., Vick L. M., Fenton A. W., Decker L. S., Cowell R. L., Ownby C. L., Gutierrez J. M. (1998). Citrate inhibition of snake proteases. *Toxicon* 36 No. 12, 1801-1806.

Odell G. V. (1999). The role of the venom citrate. *Toxicon* 37, 407-409.

Pimenta A M, Stocklin R, Favreau P, Bougis P E, Martin-Eauclaire M F. (2001). Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun Mass Spectrom.*;15(17):1562-72.

Pimenta A.M, De Marco Almeida F, de Lima M.E, Martin-Eauclaire M.F, Bougis P.E. (2003) Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 17(5):413-8.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. (1999a). "Scorpion toxins specific for Na⁺-channel." *Eur. J. Biochem.* 264(2): 287-300.

Possani, L. D., Selisko, B. and Gurrola, G. (1999). Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channel. In *Perspective in Drug Discovery and Design* . Vol. 15/16, pp. 15-40.

Possani LD., Merino E., Corono M., Bolivar F., Becerril B. (2000) Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82, 861-868.

Rodriguez de la Vega R, Enrique Merino, Baltazar Becerril, Lourival D. Possani. (2003). Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, Vol 20, No 5. 222-227

Rodriguez de la Vega R., Possani L. D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon.* 15;43(8):865-75.

Rodríguez de la Vega R. C., García B. I., D'Ambrosio C., Diego-Garcia E., Scalini A., Possani L. D. (2004) Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. *Cell Mol. Life Sci.*, 61 1507-1519.

Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*. Dec 15;46(8):831-44.

Rodriguez de la Vega RC Possani,L.D. (2006). Novel paradigms on scorpion toxins that affect the activating mechanism of sodium channels *Toxicon* En prensa.

Salzet M. (2002). Antimicrobial peptides are signaling molecules. *TRENDS in Immunology*. June Vol. 23 No.6

Soudani N, Gharbi-Chihi J, Srairi-Abid N, Yazidi CM, Planells R, Margotat A, Torresani J, El Ayeb M. (2005). Isolation and molecular characterization of LVP1 lipolysis activating peptide from scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *Biochim Biophys Acta*. Feb 14;1747(1):47-56.

Selisko B, Garcia C, Becerril B, Delepierre M, Possani LD. (1996) An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann. cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. *Eur J Biochem*. 1996 Dec 1;242(2):235-42.

Six D. A. y Dennis E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. Oct 31;1488(1-2):1-19.

Ulvatne H. (2003). Antimicrobial peptides: Potencial use in skin infections. *Am. J. Dermatol*. 4 (9): 591-595

Valdez-Cruz,N.A., Batista,C.V., Possani,L.D. (2004). Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur. J. Biochem* 271:1453-1464.

Valdivia H H, Kirby M S, Lederer W J, Coronado R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca (2⁺)-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89(24): 12185-9.

Wang CG, He XL, Shao F, Liu W, Ling MH, Wang DC, Chi CW. (2001). Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Eur J Biochem*. Apr;268(8):2480-5.

Wudayagiri R, Inceoglu B, Herrmann R, Derbel M, Choudary PV, Hammock BD. (2001). Isolation and characterization of a novel lepidopteran-selective toxin from the venom of South Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*. *BMC Biochem*. 2001 Dic.; 2:16.

Zeng Xian-Chun, Corzo G, Hahin R. (2005). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life*. January, 57 (1)

Zamudio F. Z., Conde R., Arevalo C., Becerril B, Martin B. M., Valdivia H. H., Possani L. D. (1997). The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J. Biol. Chem.* May 2;272(18):11886-94.

Zhang H, Wei Yan, Ruedi Aebersold. (2004). Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* Feb;8(1):66-75. Review

Zhu S, Li W, Jiang D, Zeng X. (2000). Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom. *IUBMB Life*. 50(1):57-61.

Zhu S, Darbon H, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J.(2003) Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *FASEB J*. 12:1765-7.

Zhu X, Zamudio FZ, Olbinski BA, Possani LD, Valdivia H. 2004. Activation of Skeletal Ryanodine Receptors by Two Novel Scorpion Toxins from *Buthotus judaicus*. *J. Biol. Chem* Vol. 279, No. 25, junio 18, pp. 26588–26596.

Zlotkin E, Fishman Y, Elazar M. 2000. AaIT: from neurotoxin to insecticide. *Biochimie*. 82(9-10):869-81