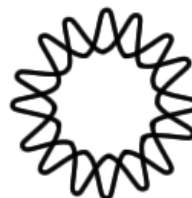




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN DE EVENTOS MOLECULARES ASOCIADOS A
LA INTOXICACIÓN CON LA TOXINA CN2 MEDIANTE
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

TESIS

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Bioquímicas

Presenta:

Biol. Dora Luz Gómez Utrera

Director de tesis:

Dra. Georgina Gurrola Briones

Cuernavaca, Morelos, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COMITÉ TUTORAL

Dra. Georgina Gurrola Briones

Dra. Rosa Victoria Pando Robles

Dra. Rosa María Uribe Villegas

Invitado: Dr. Lourival D. Possani

JURADO DE EXÁMEN

Dra. Rosario Vera Estrella

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte

Dr. Ernesto Ortiz Suri

Dra. Georgina Gurrola Briones

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Georgina Gurrola Briones.

Este trabajo fue financiado en parte por recursos recibidos de DGAPA-UNAM IN204110, el proyecto CONACyT SEP-CONACyT 48646 e Instituto Bioclón S.A. de C.V. concedidos al Dr. Lourival D. Possani y la beca CONACYT con el No. de apoyo 23737 otorgada a Dora Luz Gómez Utrera

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Georgina Gurrola Briones por su inapreciable ayuda en la dirección de este trabajo, por su guía, apoyo, paciencia e interés en mi formación académica.

Al Dr. Lourival Domingos Possani por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por sus importantes aportaciones y apoyo durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Rosa Victoria Pando Robles, quien como parte del comité tutorial, contribuyó activamente en el desarrollo de este trabajo gracias a sus invaluable aportaciones y apoyo técnico.

A la Dra. Rosa María Uribe Villegas, que como parte del comité tutorial, colaboró en la dirección de este trabajo mediante aportaciones técnicas y académicas.

A la Dra. Martha Pedraza Escalona por su apoyo, comentarios y sugerencias para la realización de este trabajo.

Al jurado de examen conformado por la Dra. Rosario Vera Estrella, el Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva, la Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, el Dr. Ernesto Ortiz Suri y la Dra. Georgina Gurrola Briones, por sus importantes aportaciones en la escritura final de esta tesis.

A Cipriano Balderas por su incondicional ayuda con el manejo de los ratones.

A la unidad del bioterio, en especial a la M.V.z. Elizabeth Mata, I.B.I. Marcela Ramírez y Sergio Gonzáles por el préstamo de sus instalaciones, su buena disposición y apoyo con los animales.

Al Dr. Fernando Zamudio por la determinación de masa molecular.

A la unidad de proteómica por la identificación de proteínas.

Al Sr. Fredy coronas por su apoyo técnico en múltiples ocasiones.

A la Lic. María del Carmen Segura Martínez y la unidad de docencia por su ayuda y buena disposición en diferentes trámites.

A mis profesores, de las diferentes materias que curse, por su importante participación en mi formación académica.

A todos los miembros y ex-miembros del laboratorio del Dr. Possani y el Dr. Batazar Becerril: Mary, Rosby, Cynthia, Verna, Marthita, Marisol, Carmen, Marisol Chevez, Lorenzo, Rita, Lidia G., Juan Carlos, Myriam, Oscar, Vero, Rivel, Ernesto, Polo, Timo, Pavel, Kenya, Lilu, Lidia G., Itzel, Omar, Lidia R., Gabriel, Linda, Fredy, Cipriano, Rosalba, Martha, Memo, Dr. Corzo, Dr. Zamudio, Dra. Georgina, Dr. Possani, Dr. Balta, por su ayuda, amistad, sugerencias y comentarios para la realización y mejora de este trabajo.

A las personas que lejos de su participación en esta tesis, me han apoyado y acompañado en los momentos más importantes de mi vida y que aún sin darse cuenta me han ayudado a comprender el camino elegido: mi familia y mis más preciados amigos.

Finalmente un agradecimiento único y sumamente especial a Iván por apoyarme incondicionalmente, por todo lo compartido y sobretodo por ayudarme a ser.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ABREVIATURAS.....	8
1. RESUMEN.....	9
2. SÍNDROME DE ENVENENAMIENTO OCASIONADO POR LA PICADURA DE ALACRÁN.....	10
2.1. Sintomatología.....	10
3. VENENO DE ALACRÁN.....	11
3.1. Neurotoxinas.....	11
4. TRATAMIENTO DE LA PICADURA DE ALACRÁN E IMPORTANTES IMPLICACIONES DE SU USO...	12
5. IMPORTANCIA DEL EFECTO DE LAS NEUROTOXINAS SOBRE CANALES IÓNICOS.....	13
5.1. Neurotoxinas específicas de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje.....	13
5.2. Canales de Na ⁺ dependientes de voltaje.....	14
5.3. Mecanismo de modulación de los canales Na _v	16
6. NEUROTOXINA Cn2.....	17
6.1. Mecanismo de acción de la Cn2.....	17
6.2. Canales Na _v 1.6: blanco principal de la neurotoxina Cn2.....	18
7. EVENTOS MOLECULARES ASOCIADOS AL ENVENENAMIENTO POR PICADURA DE ALACRÁN.....	19
8. TEJIDOS ELEGIDOS PARA SU ANÁLISIS.....	21
8.1. Ganglios de la raíz dorsal.....	21
8.1.1. Mecanismos propuestos en los DRG por efecto de la Cn2.....	22
8.2. Cerebelo.....	23
8.2.1 Mecanismos propuestos en cerebelo por el efecto de la Cn2.....	25
9. FUNDAMENTOS TÉCNICOS.....	26
9.1. Electroforesis bidimensional en gel.....	26
9.1.1. Preparación de la muestra.....	26
9.1.2. Isoelectroenfoque.....	28
9.1.3. Segunda dimensión SDS-PAGE.....	29
9.1.4. Detección de proteínas.....	30
9.1.5. Análisis de imágenes.....	31
9.1.6. Espectrometría de masas.....	31
10. JUSTIFICACIÓN.....	32
11. HIPÓTESIS.....	32
12. OBJETIVO GENERAL.....	32
12.1. Objetivos específicos.....	32
13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
14. METODOLOGÍA.....	34
14.1. Purificación de la toxina Cn2.....	34
14.1.2. Cromatografía de filtración en gel.....	34
14.1.3. Cromatografía de intercambio iónico.....	34
14.1.4. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	36
14.1.5. Espectrometría de masas.....	36
14.2. Tratamiento de animales.....	36

14.2.1. Extracción de tejidos.....	36
14.3. Estandarización del procesamiento de tejidos	37
14.3.1. Lisis celular	37
14.3.2. Limpieza de la muestra	38
14.4. Cuantificación de proteína	38
14.5. Electroforesis unidimensional.....	39
14.6. Electroforesis bidimensional	40
14.6.1. Primera dimensión.....	40
14.6.2. Segunda dimensión.....	40
14.6.3. Tinción y digitalización	41
15.RESULTADOS	43
15.1. Purificación de la neurotoxina Cn2	43
15.1.1. Cromatografía de filtración en gel	43
15.1.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	43
15.1.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	45
15.2. Tratamiento del tejido	45
15.3. Análisis del perfil proteómico	46
15.3.1. Ganglios de la raíz dorsal	46
15.3.2. Cerebelo.....	47
15.4. Identificación de proteínas con diferencias de abundancia	53
15.4.1. Ganglios de la raíz dorsal	53
15.4.2. Cerebelo.....	54
16.DISCUSIÓN.....	57
17.CONCLUSIONES.....	61
18.PERSPECTIVAS	62
19.LITERATURA CITADA.....	63
ANEXO	72
1. Tratamiento de la muestra: detalles de la estandarización.....	72
2. Geles de gradiente de DRG y cerebelo	75
3. Materiales	77
Soluciones.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Elaboración de curva estándar para la cuantificación por Bradford.....	39
Tabla 2. Protocolo de corrida del IEF tiras 7 cm.....	41
Tabla 3. Protocolo de corrida del IEF tiras 13 cm.....	41
Tabla 4. Rendimiento de proteína durante cada uno de los pasos cromatográficos de la purificación de la Cn2.....	45
Tabla 5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas con cambios cuantitativos en los DRG de ratones intoxicados con la toxina Cn2*	53
Tabla 6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas con cambios cuantitativos en el cerebelo de ratones intoxicados con la toxina Cn2*	54

Tabla 7. Cuantificación de proteína obtenida con diferentes amortiguadores de lisis a partir de 20 ganglios	73
Tabla 8. Cuantificación de proteína obtenida con diferentes amortiguadores de lisis a partir de 15 ganglios*	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de un potencial de acción*.....	14
Figura 2. Representación de la estructura molecular de Na_v^{+*}	15
Figura 3. Modulación funcional del canal de sodio dependiente de voltaje (Na_v)*	16
Figura 4. Estructura molecular de la Cn2*	17
Figura 5. Efecto de una β -toxina (Cn2)*	18
Figura 6. Representación de la acción de la neurotoxina Cn2*	18
Figura 7. Esquema de la localización y estructura de los ganglios de la raíz dorsal [42].	22
Figura 8. Esquema de la cito arquitectura básica de la corteza cerebelar*.....	24
Figura 9. Extracción de los ganglios de la raíz dorsal*	37
Figura 10. Cromatograma del veneno total de <i>C. noxius</i> separado por cromatografía de filtración en gel*.....	43
Figura 11. Cromatogramas de separación de las cromatografías de Intercambio Iónico*	44
Figura 12. Gel bidimensional de gradiente del perfil proteómico cerebelo bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B)*	48
Figura 13. Gel bidimensional de gradiente del perfil proteómico de los DRG bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B)*	49
Figura 14. Gel Bidimensional del perfil proteómico de DRG bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B)*	50
Figura 15. Gel Bidimensional de Cerebelo bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B)*	51
Figura 16. Gel bidimensional de Cerebelo bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B) *	52
Figura 17. Gel unidimensional de poliacrilamida-SDS al 12% de 4 diferentes amortiguadores de lisis celular*	72
Figura 18. Geles Bidimensionales (tiras de 7 cm) de las muestras tratadas con 2 diferentes amortiguadores de lisis y dos diferentes técnicas de limpieza*	74
Figura 19. Geles de gradiente (4-20%) de los tejidos A) DRG y B) cerebelo tratados con la toxina Cn2*	76

ABREVIATURAS

BSA: Albúmina Sérica Bovina

C. noxius: *Centruroides noxius*

CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato

CHAPSO: 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato

DIGE: Differential Gel Electrophoresis (electroforesis diferencial en gel)

DRG: Dorsal Root Ganglia (ganglios de la raíz dorsal)

DTT: Ditiotreitól

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FACS: fluorescence activated cell sorting

HEPES: Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico

IAA: Iodoacetamida

IEF: Isoelectroenfoque

IPG: Inmovilized pH Gradient (gradientes de pH inmovilizados)

LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

mA: miliamper

MS: espectrometría de masas

Na_v⁺: canales de sodio dependientes de voltaje

nm: nanómetros

PAF: Platelet-activating factor (Factor activador de plaquetas)

PAGE-SDS: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

PBS: phosphate-buffered saline (Amortiguador Fosfato Salino)

pI: punto isoeléctrico

RNA_m: RNA mensajero

SDS: dodecilsulfato sódico

SNA: Sistema Nervioso Autónomo

SNC: Sistema Nervioso Central

T. serrulatus: *Tytilus serrulatus*

TTX: tetrodotoxina

2D-PAGE: Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida)

VST: Voltage Sensor Trapping (captura del sensor de voltaje)

V-hr: volt-horas

1. RESUMEN

El veneno de los alacranes es una mezcla compleja de componentes como enzimas, péptidos, nucleótidos, lípidos, mucoproteínas, aminas biogénicas y otras sustancias desconocidas, pero su toxicidad se debe, en gran medida, a polipéptidos básicos de bajo peso molecular, conocidos como neurotoxinas, las cuales afectan la conductancia de iones en tejidos excitables.

Durante el proceso de envenenamiento el canal iónico es reconocido por la neurotoxina, generando la alteración de su funcionamiento normal, lo que a su vez provoca la alteración de múltiples órganos. Las alteraciones multiorgánicas han sido ampliamente documentadas y se conoce el mecanismo de interacción de las neurotoxinas sobre los canales iónicos, sin embargo la respuesta celular a nivel molecular como consecuencia de la interacción de la neurotoxina con el canal iónico ha sido poco estudiada.

Para tener mayor conocimiento de los mecanismos celulares es necesario conocer qué moléculas están involucradas en la red de eventos provocados como consecuencia del efecto de las neurotoxinas sobre los canales iónicos. Con este fin, este trabajo consistió en la implementación de una metodología adecuada para la búsqueda de modificaciones en la abundancia de proteínas relacionadas con el efecto de la neurotoxina Cn2. Esto se hizo mediante el análisis del perfil proteómico, con electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE), de ganglios de la raíz dorsal (DRG) y cerebelo de ratones intoxicados con la neurotoxina Cn2.

La elaboración de este trabajo requirió tres etapas principales: la purificación de la neurotoxina Cn2 (a partir del veneno total del alacrán *Centruroides noxius*), un proceso de optimización de diferentes aspectos de la electroforesis bidimensional y el análisis del perfil proteómico de los tejidos analizados bajo el efecto de la Cn2.

Finalmente se logró establecer la metodología para el análisis de cambios proteómicos de tejidos intoxicados con la neurotoxina Cn2 y se logró la detección de algunos cambios cuantitativos en la abundancia de ciertas proteínas en DRG y cerebelo de ratones intoxicados con la Cn2. Este estudio permitió proponer diferentes modificaciones a la estrategia experimental y definir nuevas perspectivas para el avance del análisis de las respuestas celulares específicas a la intoxicación del ratón con la neurotoxina Cn2.

2. SÍNDROME DE ENVENENAMIENTO OCASIONADO POR LA PICADURA DE ALACRÁN

La picadura de alacrán es un importante problema de salud pública en México. En el 2006 se registraron un total de 269 149 intoxicaciones ocasionadas por la picadura de alacrán [1]. El efecto adverso de este envenenamiento comprende fallas severas de múltiples órganos y sistemas como el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio, el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune [2-6].

2.1. *Sintomatología*

La picadura de alacrán causa síntomas primarios que son inmediatos y locales como dolor local, prurito e hiperestesia [6]. Posteriormente, en un corto periodo de tiempo de entre 5 a 30 minutos, comienzan a presentarse síntomas de alteración sistémica severa. Estos últimos no acontecen de manera generalizada ni parecen llevar un orden específico. Las manifestaciones comprenden fallas funcionales en múltiples órganos que incluyen: cerebro, corazón, pulmones, páncreas, intestino, hígado y riñón [5, 7, 8]; estas fallas multiorgánicas generalmente van acompañadas de complicaciones a nivel sistémico. En casos severos, en el cerebro se ha detectado congestión cerebral, hemorragias, infarto cerebral, trombosis cerebrovascular y edema cerebral [3, 7, 9, 10]. Se han detectado otros síntomas que incluyen alteraciones del SNC como hiperirritabilidad, convulsiones focales y generalizadas, hemiplejía (parálisis), hipertermia e hipotermia, escalofríos y piloerección [3, 6]. Los síntomas como lagrimeo, salivación, vómito, sudoración, fasciculaciones, espasmo laríngeo y pupilas dilatadas, también han sido detectados e indican un efecto neurotóxico general del sistema neuromuscular y el sistema nervioso autónomo [5, 7]. En el corazón se han detectado arritmias cardíacas (taquicardia y bradicardia sinusal), anormalidades electrocardiográficas, hipertensión, hipotensión, daños al miocardio (fibras musculares degeneradas, necrosis local y edema intersticial), disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, insuficiencia cardíaca aguda y niveles anormales de enzimas cardíacas [2, 3, 5, 7]. En relación al sistema respiratorio se han registrado arritmias respiratorias (taquipnea, disnea), anormalidades respiratorias (patrones de respiración anormal con episodios de jadeo y apnea), shock respiratorio y edema pulmonar [3, 5]. En el páncreas se ha detectado pancreatitis aguda hemorrágica [5, 7]. En el hígado se ha identificado necrosis y aumento de enzimas pancreáticas y en el riñón hemólisis severa y subsecuente falla renal [7]. En el intestino se ha observado calambres intestinales y úlceras gástricas [11].

Metabólicamente se han registrado niveles plasmáticos anormales de diferentes enzimas y metabolitos. Enzimas cardíacas como la isoenzima creatinina fosfoquinasa fracción MB (*myocardial binding*), aumentan en casos de picadura de alacrán, se ha considerado que esta enzima es altamente sensible y específica para indicar el daño al miocardio [2]. Durante la picadura de alacrán, también se ha registrado un importante cambio hormonal que además de la liberación excesiva de catecolaminas, incluye la

liberación masiva de hormonas como la angiotensina II, aldosterona, renina, cortisol y un estado de elevados niveles de insulina y glucosa en sangre [5, 8]. Estos datos indican un síndrome de deficiencia energética y la falta de habilidad para usar los sustratos metabólicos por los órganos vitales, lo que podría contribuir a la falla de múltiples órganos y la muerte [5, 11]. Así mismo se ha observado que después de la picadura de alacrán se estimula la liberación de diferentes mediadores químicos como citocinas y óxido nítrico, que afectan procesos inflamatorios que pueden ser los responsables de diversas manifestaciones observadas, como el síndrome de estrés respiratorio, el síndrome de inflamación sistémica severa y la falla de múltiples órganos [8].

2.2. Origen del efecto ocasionado por la picadura de alacrán

Los síntomas presentados por las víctimas se deben a la sobre-estimulación del sistema nervioso autónomo (SNA) causado por los componentes tóxicos del veneno del alacrán (neurotoxinas) [6]. Esta sobre-estimulación resulta en una liberación masiva de neurotransmisores, que ha sido considerada como uno de los mayores factores de la fisiopatología del envenenamiento. Los síntomas incluyen la activación del sistema nervioso autónomo simpático (taquicardia, hipertensión, arritmias cardiacas) y parasimpático (salivación, lagrimeo, bradicardia, hipotensión) [6, 12]. La principal causa de muerte se atribuye a la alteración funcional del sistema cardiovascular causada por la liberación masiva de catecolaminas, junto con las complicaciones provenientes del edema pulmonar y el arresto respiratorio [12].

3. VENENO DE ALACRÁN

El veneno de los alacranes es una mezcla compleja de componentes biológicamente activos: enzimas, péptidos, nucleótidos, lípidos, mucoproteínas, aminas biogénicas (histamina, dopamina, noradrenalina, etc.) y otras sustancias desconocidas [12, 13]. La toxicidad del veneno se debe principalmente al efecto de péptidos conocidos como neurotoxinas, que afectan específicamente la conductancia de iones en tejidos excitables [5]. Se ha demostrado que los efectos neurotóxicos están relacionados con el daño al correcto funcionamiento de los canales de sodio [14].

3.1. Neurotoxinas

Se han identificado 4 familias diferentes de toxinas de alacrán que interactúan con canales iónicos específicos de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} . Usualmente las toxinas que se unen a canales de potasio y cloro son de 29-41 aminoácidos. Las que se unen a canales de sodio son más largas, de 60 a 76 aminoácidos. Las toxinas que se unen a canales de calcio son poco conocidas [14]. La mayoría de estas toxinas comparten un motivo estructural conservado que contiene una α -hélice y dos o tres hojas- β unidas por puentes disulfuro [13].

4. TRATAMIENTO DE LA PICADURA DE ALACRÁN E IMPORTANTES IMPLICACIONES DE SU USO

El tratamiento para la picadura de alacrán, consiste en el uso de medicamentos sumamente efectivos, que son inmunoglobulinas procesadas con pepsina para producir fragmentos F(ab)², con los que se logra neutralizar el veneno que circula en la víctima. Estos fragmentos purificados se usan como antídoto y se les conoce como faboterápicos o anti-veneno. Los anti-venenos disponibles son fragmentos F(ab)² obtenidos del suero de caballos inmunizados con macerados del telson de alacranes de varias especies tóxicas [15].

El envenenamiento por picadura de alacrán es considerado como una situación de emergencia extrema, debido a que las toxinas de los alacranes presentan una rápida absorción desde el sitio de la picadura [16] y una rápida distribución [3, 16, 17], por este motivo, para revertir la toxicidad es necesaria la aplicación temprana del anti-veneno. En efecto algunos resultados experimentales y clínicos, indican que la administración retardada del anti-veneno (2 hrs o más después de la picadura) aumenta considerablemente el daño causado por el veneno en diversos órganos [3, 16-18] y que existe una asociación estadísticamente significativa entre el retardo del inicio del tratamiento del paciente y la severidad de su estado [19]. En estudios experimentales se ha evaluado la eficacia neutralizante del anti-veneno, cuando es aplicado de manera retardada, sobre las toxinas de alacrán y se ha registrado una completa neutralización de la neurotoxina en el plasma sanguíneo [16]. A pesar de la aplicación retardada del anti-veneno, éste mantiene su capacidad neutralizante pero no revierte los efectos clínicos, lo que sugiere que la acción de las toxinas ejerce un efecto deletéreo e irreversible antes de la administración del anti-veneno y a través de diversos mecanismos moleculares provocados en células afectadas por las toxinas. El conocimiento de eventos moleculares ocurridos por la acción de las neurotoxinas de alacrán ayudará a entender el mecanismo de funcionamiento del envenenamiento por picadura de alacrán y a mejorar el tratamiento clínico de los pacientes.

5. IMPORTANCIA DEL EFECTO DE LAS NEUROTOXINAS SOBRE CANALES IÓNICOS

Las señales eléctricas son elementos sumamente importantes para el funcionamiento celular. Estas señales controlan la contracción muscular, la secreción hormonal, la sensibilidad al ambiente, el procesamiento de información en el cerebro y su salida del cerebro a tejidos periféricos. En células excitables, las señales eléctricas también ejercen una importante influencia en el metabolismo intracelular, la transducción de señales, la expresión de genes, la síntesis, la degradación y marcaje de proteínas. Las señales eléctricas son conducidas por miembros de la súper-familia proteica de canales iónicos. La manera de generar estas señales en la célula es mediante potenciales de acción [20]. El potencial de acción es una alteración en el potencial de membrana (campo eléctrico de la membrana) causado por la apertura y cierre de canales dependientes de voltaje (Fig. 1), de esta manera las neurotoxinas al alterar el funcionamiento normal de los canales iónicos, pueden producir su efecto tóxico.

En esta sección nos enfocaremos en las toxinas específicas para canales de Na^+ dependientes de voltaje, estas toxinas pueden producir una despolarización sostenida de las membranas de células nerviosas y terminaciones nerviosas, lo cual puede bloquear la conducción de potenciales de acción en los axones de células nerviosas y causar una liberación descontrolada de neurotransmisores de la terminaciones nerviosas [5]. La neurotoxina Cn2, que pertenece a esta familia y la cual fue utilizada en este proyecto, es la neurotoxina más tóxica aislada del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, el cual a su vez es el alacrán más peligroso en nuestro país [21].

5.1. Neurotoxinas específicas de canales de Na^+ dependientes de voltaje

Las neurotoxinas específicas para canales de Na^+ han sido divididas en 2 tipos principales, α y β , basado en los efectos farmacológicos que ejercen sobre los canales de sodio y por sus características de unión. Las α -toxinas se unen al sitio 3 de los canales de Na^+ , de un modo dependiente de voltaje. Las toxinas del tipo β se unen al sitio 4 independientemente del potencial de membrana y afectan la activación de los canales de sodio [13]. Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) modulan el incremento transitorio de la permeabilidad de sodio, que es la base de la fase de aumento del potencial de acción en la mayoría de las células excitables (Fig. 1), por lo que cualquier modificación en su funcionamiento normal tiene una fuerte repercusión sobre el correcto funcionamiento celular.

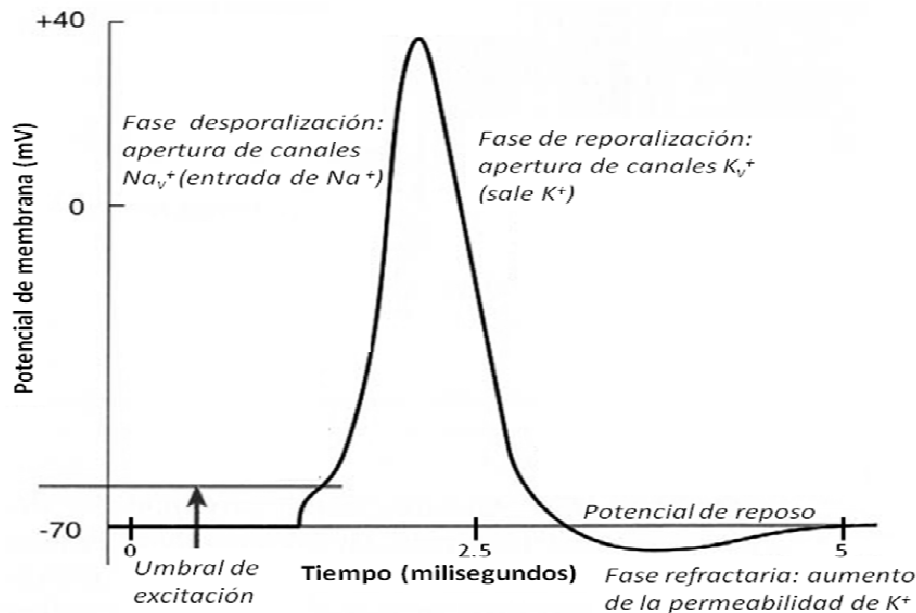


Figura 1 Esquema de un potencial de acción*.

*El potencial de acción comienza cuando un estímulo (impulso nervioso) despolariza a la membrana hasta el umbral de excitación (-50 mV), este cambio causa la apertura de los canales Na_v^+ y por consiguiente el Na^+ difunde hacia el interior de la célula. Este movimiento del Na^+ hace que la membrana revierta el potencial hasta cerca de +40 mV (fase de despolarización). Después, en la fase de repolarización, los canales de sodio se desactivan y el cambio del potencial de membrana, previamente ocasionado por la entrada de Na^+ , provoca la apertura de los canales K_v^+ . Como resultado los iones de potasio difunden fuera de la célula. La menor permeabilidad de la membrana al Na^+ y el aumento de su permeabilidad al K^+ hacen que el potencial de membrana cambie a un valor negativo cercano a -80 mV (fase refractaria). Este potencial negativo hace que los canales de potasio se cierren y finalmente la membrana regresa al estado de reposo [22].

5.2. Canales de Na^+ dependientes de voltaje

Los canales Na_v^+ permiten un rápido influjo de sodio en respuesta a la despolarización de la membrana que es la base de la fase ascendente (Fig. 1) del potencial de acción en el nervio, músculo y células endocrinas [20]. Los canales de sodio dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad central α (260 kDa aproximadamente). La subunidad α contiene 4 dominios homólogos (I-IV), los cuales están compuestos por seis segmentos transmembranales hidrofóbicos α -hélice (S1-S6). Los 4 dominios homólogos internos, forman un ensamblaje radial simétrico con el poro del ión en el centro [23]. Estudios bioquímicos y moleculares han permitido asociar el funcionamiento del canal con ciertas secuencias de aminoácidos o incluso motivos. El poro, como tal, está formado por un bucle reentrante que se profundiza en los segmentos transmembranales S5 y S6 (Fig. 2), los segmentos S4 con la activación dependiente de voltaje y la inactivación con el dominio III y IV (Fig. 2).

La sola subunidad α es capaz de dar lugar a un canal funcional de sodio, sin embargo se encuentra asociada a subunidades β (33-38 kDa). Existen 4 diferentes tipos de

subunidades β ($\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$). Estas proteínas poseen un segmento transmembranal y un dominio N-terminal grande, extracelular y homólogo, en estructura, a una cadena variable de inmunoglobulina. La subunidad β también posee un segmento C-terminal intracelular pequeño. Las subunidades β interactúan con la subunidad α a través de su dominio extracelular, modulan la función de la subunidad α , aumentan su expresión celular, también sirven como moléculas de adhesión celular y en general son requeridas para un funcionamiento cinético normal y para la apertura dependiente de voltaje [20, 24].

En mamíferos se han identificado 10 genes diferentes que codifican para subunidades α de canales de sodio dependientes de voltaje: Na_v^+ 1.1- Na_v^+ 1.9 y Na_x . Todos ellos comparten la misma estructura pero con una secuencia de aminoácidos variable, especialmente en las regiones asociadas a la modulación del canal [20].

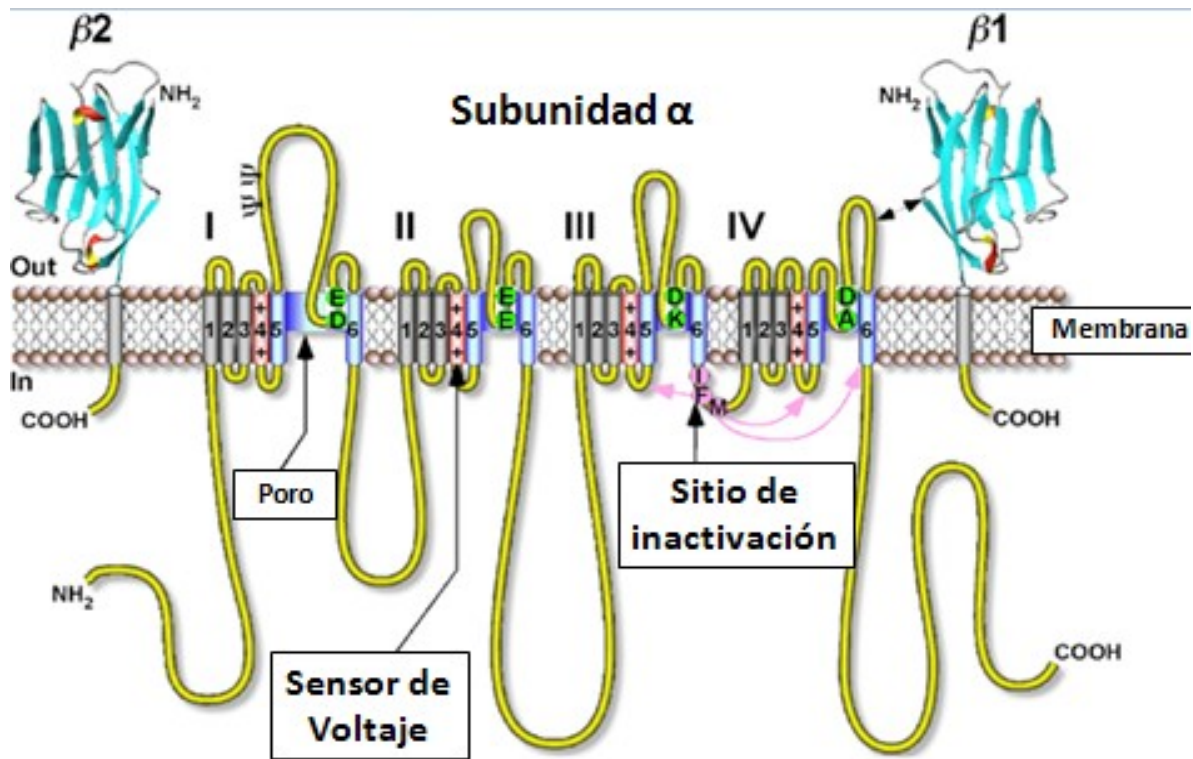


Figura 2. Representación de la estructura molecular de Na_v^{+*} .

*Se representa la subunidad α y los 4 dominios homólogos (I-IV) cada uno conteniendo 6 hélices transmembrales hidrofóbicas (S1-S6), representados por los cilindros. La cadena polipeptídica está representada por la línea amarilla. El sitio de inactivación está representado por la partícula de inactivación (residuos hidrofóbicos IFM). Las flechas magenta indican los sitios posibles de receptor del sitio de inactivación. El poro está indicado entre los segmentos S5 y S6, el bucle formado entre estos forma las paredes de la vía de conducción del ion (en color azul). Los sitios Ψ son sitios probables de glicosilación. Las múltiples cargas positivas de residuos en el S4 constituye el sensor de voltaje. Los anillos de residuos de aminoácidos: DEKA (interno) y EEDD (externo) constituyen el filtro de selectividad [24].

5.3. Mecanismo de modulación de los canales Na_v

Los canales de sodio dependientes de voltaje, como su nombre lo indica, poseen un mecanismo de activación dependiente de voltaje. Los segmentos S4 transmembranales (Fig. 2) contienen motivos repetidos de residuos de aminoácidos cargados positivamente, seguidos de 2 residuos hidrofóbicos, potencialmente crean una α hélice cilíndrica con una tira en espiral de carga positiva alrededor. La despolarización de la membrana ocasiona el movimiento hacia afuera de los segmentos S4 a lo largo del espiral, con este movimiento se inicia la apertura del poro. En el proceso de inactivación, participa el lazo intracelular que conecta los dominios III y IV. Este lazo tiene una estructura de una α -hélice rígida que en su amino terminal está flanqueada por dos vueltas, en la segunda vuelta se encuentra el motivo IFM, llamado así por contener isoleucina, fenilalanina y metionina (Fig. 2). La hélice rígida sirve de andamio para presentar el motivo IFM a un receptor en la boca del poro, esta interacción ocasiona el cierre de la boca del poro [24]. El movimiento hacia afuera del sensor de voltaje del dominio IV también está asociado con el proceso de inactivación [25] (Fig. 3).

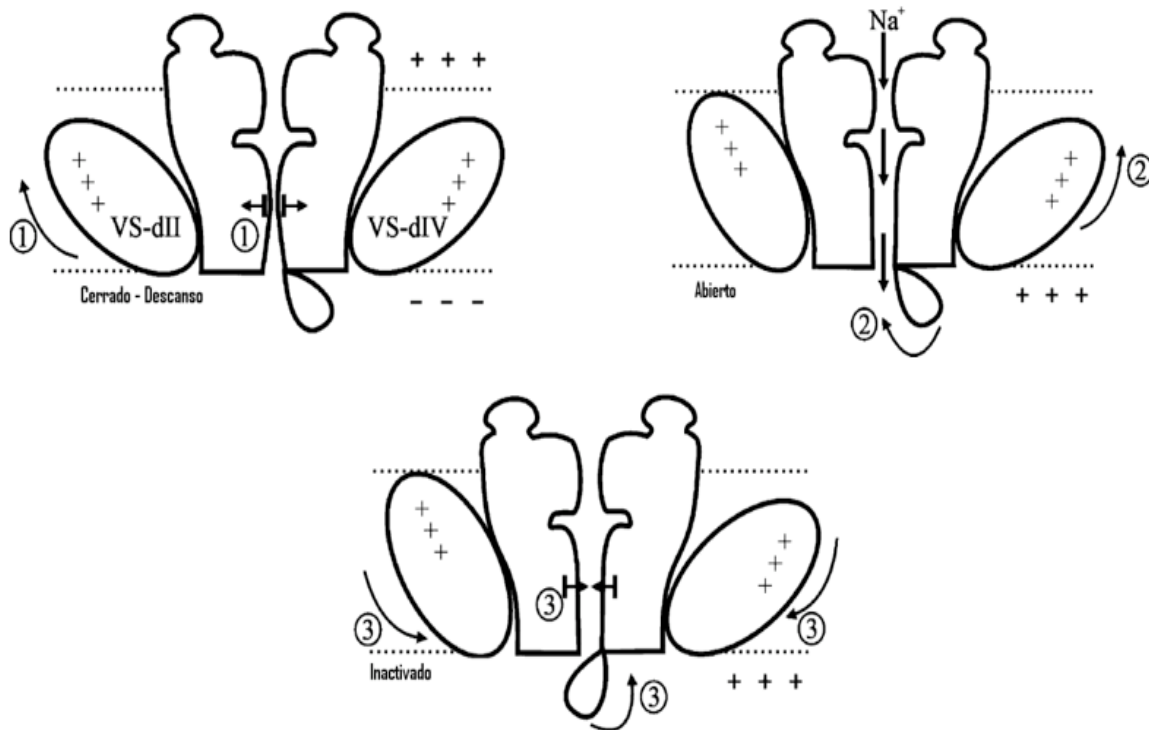


Figura 3. Modulación funcional del canal de sodio dependiente de voltaje (Na_v)^{*}.

*1 Activación: la despolarización de la membrana provoca la abertura del camino de conducción de iones debido al movimiento hacia afuera del sensor de voltaje (Segmentos S4). 2 Inactivación: movimiento hacia afuera del sensor de voltaje del dominio IV y el movimiento de la partícula de inactivación hacia la boca del poro provocan la inactivación del canal. 3 La deactivación: vuelve al estado de descanso.

6. NEUROTOXINA Cn2

La neurotoxina Cn2 es considerada como el componente más tóxico, aislado del veneno del alacrán *Centruroides noxius* (*C. noxius*), para mamíferos con una LD_{50} de 0.25 $\mu\text{g}/20$ gr de peso de ratón y representa el 6.8% del veneno total, lo que hace que sea la proteína mayoritaria en el veneno total [21]. La Cn2 es una β -toxina compuesta de una triple hebra de hojas- β antiparalelas y una α -hélice estabilizada por cuatro puentes disulfuro [26] (Fig. 4). Algunos datos indican que los sitios de importancia farmacéutica de este tipo de toxinas estriba en la región formada por el amino terminal y el carboxilo terminal [27]. Los canales de Na_v^+ son su principal blanco y su efecto consiste en el cambio de la dependencia de voltaje de la activación del canal, dirigiéndolo hacia voltajes hiperpolarizados y la reducción de la amplitud del pico de la corriente [20].

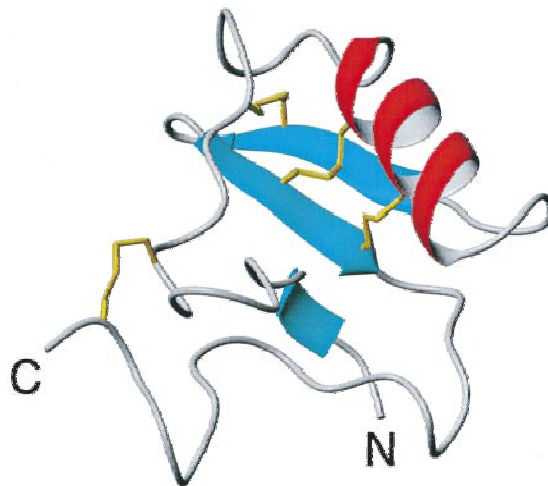


Figura 4. Estructura molecular de la Cn2*.

* β -toxina compuesta de una triple hebra de hojas- β antiparalelas (azul) y una α -hélice (rojo) estabilizada por cuatro puentes disulfuro (amarillo). Tomado de [26]

6.1. Mecanismo de acción de la Cn2

El mecanismo de acción de esta toxina consiste en un proceso conocido como captura del sensor de voltaje (*Voltage Sensor Trapping*, VST). La toxina al unirse al canal de sodio en reposo, causa la reducción del pico de la corriente de iones de sodio. Cuando se aplica un prepulso despolarizante sobre el canal, provoca un cambio conformacional en el sensor de voltaje del dominio II (S4-DII), esto promueve una estrecha unión con la toxina (Fig. 5 y 6). La unión de la toxina impide el regreso del S4-DII al estado de reposo ocasionando un cambio en el umbral de activación a potenciales hiperpolarizados [25]. Recientemente se ha comprobado que el efecto de la Cn2 ha resultado ser bastante específico para los canales de Na^+ dependientes de voltaje del tipo $\text{Na}_v 1.6$ [28].

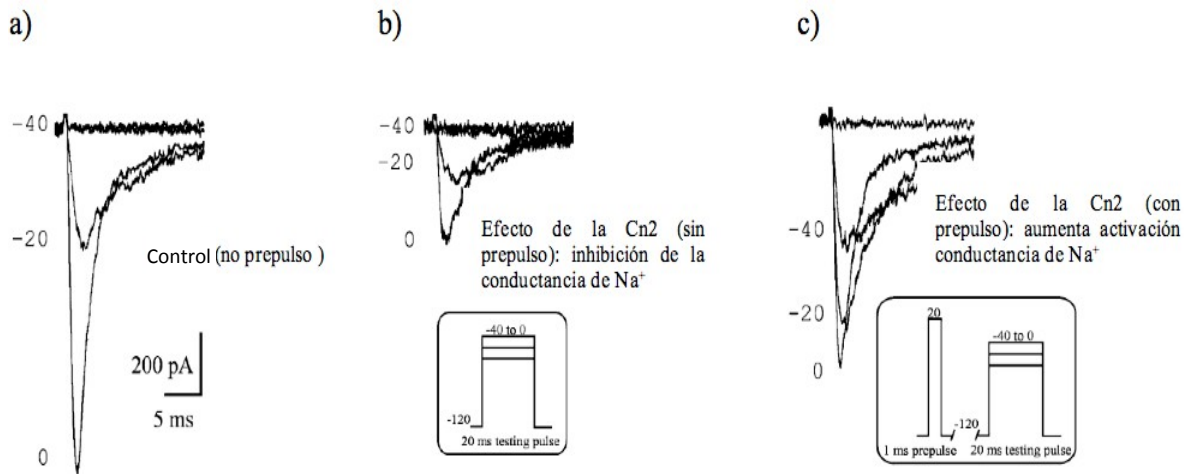


Figura 5. Efecto de una β -toxina (Cn2)*.

*Registros de pulsos de despolarización de canales hNa_v expresados en la línea celular HEK293 bajo condiciones control y en presencia de 70nM de Cn2. a) Registro del control a tres pulsos despolarizantes de -120 mV a -40, -20 y 0 mV. b) Inhibición producida por la aplicación de la Cn2 bajo condiciones similares. c) registro del efecto de la toxina cuando se aplica un prepulso despolarizante de -120 mV a 20 mV antes de los pulsos de prueba. Tomado de [25].

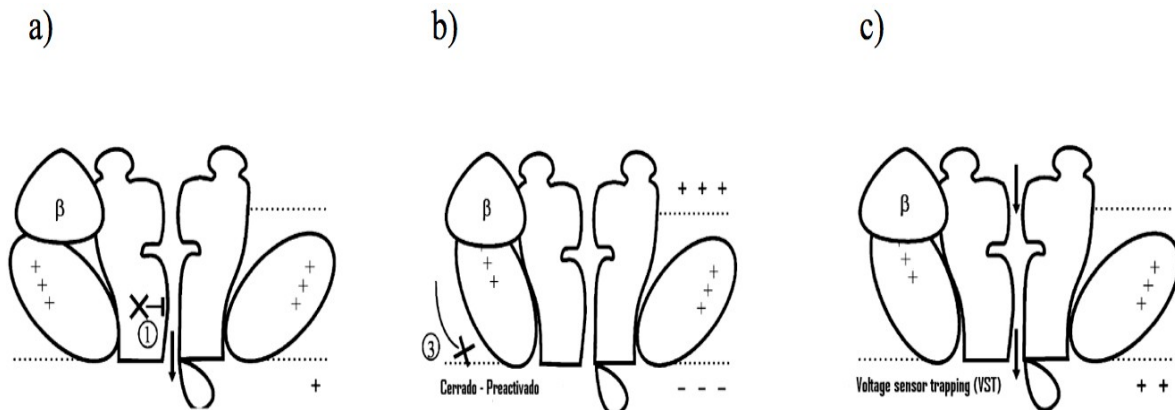


Figura 6. Representación de la acción de la neurotoxina Cn2*.

*a) inhibición de la conductancia de iones de Na^+ por efecto de la unión de la toxina al sensor de voltaje (ver Fig. 5b). b)- c) efecto de la toxina después de un prepulso despolarizante, en el cual el sensor de voltajes (S4-DII) es atrapado, por la neurotoxina, en una posición pre-activada, favoreciendo la conductancia de iones a potenciales hiperpolarizados y lo inhibe a potenciales despolarizados (VST) [28]. Tomado de [25]

6.2. Canales Na_v 1.6: blanco principal de la neurotoxina Cn2

Originalmente los canales de sodio fueron caracterizados en base a su farmacología, principalmente por su sensibilidad a tetrodotoxina (TTX) [29]. El canal Na_v 1.6 es sensible a TTX. Este canal parece estar distribuido ampliamente en diferentes tejidos del organismo. En un estudio realizado para analizar la expresión del RNA mensajero (RNAm) de las subunidades α y β , de los canales de sodio, en diferentes tejidos, resultó que el transcrito del Na_v 1.6 fue ubicuamente expresado en todos los tejidos probados: glándula adrenal, medula ósea, cerebro, cerebelo, corazón, pulmón, riñón, páncreas, próstata, glándulas

salivales, músculo esquelético, testículos, timo, glándula tiroidea, tráquea, útero y bazo [30]. Lo anterior sugiere que modula funciones locales en muchos tejidos, además su amplia distribución contribuye a que existen múltiples tipos celulares como blancos potenciales de la toxina Cn2. El Na_v 1.6 también juega un importante papel en la conducción periférica nerviosa tanto del sistema nervioso central como del periférico [30]. La localización del Na_v 1.6 ha sido determinada por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en todas las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, cerebro, cerebelo, médula espinal y en los nodos de Ranvier de nervios periféricos [31]. La presencia de este canal fue una de las condiciones tomadas en cuenta para la elección de los tejidos de estudio.

7. EVENTOS MOLECULARES ASOCIADOS AL ENVENAMAMIENTO POR PICADURA DE ALACRÁN

El proceso de envenenamiento causado por la picadura de alacrán es sumamente complejo y sus efectos adversos han sido explicados principalmente por el efecto de sobre-estimulación del SNA, provocando la liberación masiva de neurotransmisores, ocasionado por la acción de neurotoxinas [6], sin embargo se han determinado varios de los mecanismos que provocan la serie de alteraciones orgánicas.

La disfunción cardiaca ha sido asociada a la alteración en la concentración de electrolitos: hiponatremia (baja concentración de sodio en la sangre), hipercalcemia (concentración elevada de calcio en la sangre), hipocalcemia (baja concentración de calcio en la sangre), hipercalemia (alta concentración de potasio en sangre) e hipocalemia (baja concentración de potasio en sangre). El veneno de *Leiurus quinquestriatus*, *Buthus minax* y *Pandinus exitalis* dan lugar a un efecto inotrópico en el cual el bloqueo de canales de Ca^{2+} provoca su acumulación en el retículo sarcoplasmático del músculo y provoca que la próxima contracción del corazón sea más vigorosa [3]. La necrosis del miocardio, caracterizada por la presencia de hiper-contractibilidad, ha sido asociada al efecto directo de la toxina gamma de *Tytilus serrulatus* (*T. serrulatus*) sobre el corazón aislado de rata. Esto fue comprobado en presencia de la toxina γ , con el bloqueo de la vía colinérgica y adrenérgica (mediante el uso de antagonistas), estos bloqueadores lograron inhibir los efectos cronotrópicos (bradicardia y taquicardia), lo cual indica que este efecto depende de la liberación de neurotransmisores, sin embargo el efecto inotrópico (aumento de contractilidad) no fue inhibido lo cual indica que la toxina provoca un efecto inotrópico por su acción directa sobre los cardiomiocitos. Es probable que tal efecto, sea ocasionado por la alteración del funcionamiento normal de los canales de Na^+ , lo cual podría provocar la sobreacumulación de Ca^{2+} . Este incremento de calcio podría ser el mecanismo para explicar el incremento de contractilidad [32].

Una propuesta interesante, respecto a los mecanismos moleculares, está asociada a la respuesta inflamatoria sistémica, que involucra la estimulación del sistema inmune. El veneno de alacrán tiene la capacidad de liberar catecolaminas, corticosteroides, bradiquinina y prostaglandinas, por lo que puede estimular el eje neuroendocrino-

inmunológico, debido a que se ha probado que todas estas sustancias inducen la liberación de mediadores inmunológicos [8, 33]. La respuesta inflamatoria es una cascada que involucra sistemas, elementos celulares y la liberación de mediadores y es considerada como el evento primario después de la exposición al veneno [8]. En general se ha considerado que participa en fenómenos como dolor local, vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y la producción de mediadores químicos como citocinas, óxido nítrico, prostaglandinas y leucotrienos [11].

El edema pulmonar, producido por la picadura de alacrán, es una de las condiciones más severas y peligrosas que podrían conducir a la muerte. La discusión en cuanto a su origen es aún activa, sin embargo los estudios realizados hacen pensar que este evento es cardiogénico (se debe a la presencia excesiva de catecolaminas) y que está asociado a la disfunción del miocardio, a la anormalidad del movimiento del ventrículo izquierdo y al incremento de la presión en la arteria pulmonar [3]. Sin embargo, existen datos que sugieren un origen no cardiogénico, influenciado por la liberación de sustancias vasoactivas (factor activador de plaquetas, leucotrienos y prostaglandinas), que incrementan la permeabilidad vascular y están asociados a fenómenos de la vasculatura pulmonar y la permeabilidad de la membrana [34, 35]. Un interesante estudio sobre el posible origen molecular del edema pulmonar demuestra que, en parte, se debe a la activación de la cascada inflamatoria y liberación de mediadores de inflamación, incluso se ha registrado un severo incremento en la expresión del RNAm de citocinas inflamatorias y no inflamatorias [36], sin embargo poco se sabe sobre cómo es que el veneno del alacrán desencadena la activación de esta cascada. Se han llevado a cabo estudios usando el veneno de *T. serrulatus* y se ha demostrado, mediante la depleción de nervios sensoriales, que este veneno provoca la liberación de neuropéptidos por nervios sensoriales aferentes [37]. Estos neuropéptidos, al actuar sobre sus receptores específicos, pueden provocar la activación de otros tipos celulares. En este sentido se ha demostrado un papel importante de los receptores de tachikinina NK1, cuyo principal ligando es la sustancia P, debido a que al bloquearlos se ha observado una importante disminución del edema pulmonar. Mediante la depleción de mastocitos, se reveló que la activación de este tipo celular y la subsecuente liberación de sustancias mediadoras como el factor activador de plaquetas (PAF, *Platelet-activating factor*), prostaglandinas y leucotrienos son importantes en la formación del edema pulmonar [38].

Ciertos tipos celulares, como los macrófagos, se han observado bajo el efecto de neurotoxinas. La importancia de estas células estriba en que además de embeber y destruir patógenos son capaces de liberar sustancias mediadoras como: citocinas, lípidos bioactivos, especies reactivas de nitrógeno y oxígeno [39]. En macrófagos se han estudiado algunos eventos moleculares generados por la intoxicación. En estos experimentos, se observó que los macrófagos peritoneales de ratón, expuestos a la toxina Ts1 de *T. serrulatus*, presentaban un balance alterado de citocinas inflamatorias. En la fase aguda de respuesta a Ts1, se observó un estado pro-inflamatorio, caracterizado por una mayor presencia de citocinas pro-inflamatorias, que provocó una respuesta compensatoria anti-inflamatoria, involucrando citocinas anti-inflamatorias [40].

En otro estudio, también llevado a cabo en macrófagos, bajo el efecto de la misma toxina y el veneno total de *T. serrulatus*, se observó que el veneno causó cambios morfológicos en los macrófagos que consistían en el incremento de formación de vacuolas, en la modificación de la forma redonda y extensión, así como oscilaciones en las concentraciones internas de calcio. Las modificaciones morfológicas involucran el incremento en la activación de los macrófagos y se correlacionaron con las oscilaciones de Ca^{2+} . Las oscilaciones de Ca^{2+} podrían ser explicadas por el efecto que tiene la toxina Ts1 sobre los canales Na_v^+ , debido a que modifica su apertura hacia potenciales más negativos, lo cual provoca la despolarización de macrófagos y consecuentemente la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje [39]. La activación de macrófagos resulta en un incremento metabólico, estimula la secreción de factores de crecimiento, citocinas y mediadores de inflamación y aumenta la actividad fagocítica.

En el caso del veneno de *C. noxius*, se ha reportado un aumento en el balance de citocinas pro-inflmatorias (TNF, IL-6) y anti-inflamatorias (IL-10) en el suero de ratones tratados con el veneno total de *C. noxius* [41]. Otro de los mediadores que han sido relacionados con el envenenamiento por la picadura de alacrán es el óxido nítrico. Altos niveles de NO se observaron después de la inyección con *T. serrulatus* [4].

Evidentemente, la intoxicación con la picadura de alacrán es un fenómeno muy complejo, debido a que comprende diferentes vías y procesos que producen la alteración funcional del organismo en general. Los mecanismos moleculares involucrados no se conocen con claridad.

8. TEJIDOS ELEGIDOS PARA SU ANÁLISIS

8.1. Ganglios de la raíz dorsal

Los ganglios de la raíz dorsal (DRG) fueron uno de los tejidos que se analizaron en este proyecto. Se eligieron por dos razones principales: por la alta presencia de canales $Na_v 1.6$ [31] y porque son tejidos muy importantes que transmiten información sensorial de la periferia (piel y órganos viscerales) al sistema nervioso central.

La percepción del medio ambiente que rodea a los organismos es sumamente importante para la sobrevivencia y por lo tanto el organismo tiene la capacidad de percibir y procesar estímulos del ambiente, a través de receptores sensoriales, que son transmitidos al sistema nervioso central (SNC) y de este modo se genera una respuesta [42]. En este caso la médula espinal es un elemento clave debido a que desempeña tres de las funciones más importantes de un individuo: la sensación, el control autónomo y el control motor. Una complicada red de neuronas trabajan en conjunto con el resto del SNC para permitir un perfecto control de las funciones sensoriales, autónomas y motoras [43]. Diferentes órganos sensoriales de las estructuras periféricas inician estas modalidades sensoriales, pero son contactados por los axones de las neuronas de los DRG. Las

prolongaciones de estos axones forman los nervios periféricos [43]. Los nervios periféricos se proyectan hacia diferentes partes del cuerpo y reciben la información sensorial captada por los receptores sensoriales distribuidos en el cuerpo y transmiten la información hasta la médula espinal. Los DRG contienen los cuerpos de neuronas unipolares cuyo axón se bifurca y da lugar a dos procesos axonales: proceso central y proceso periférico [44]. El proceso central se refiere a las proyecciones de las células de la raíz dorsal que hacen contactos sinápticos con neuronas del SNC. El proceso periférico se refiere a la interacción de la proyección axonal con los receptores sensoriales de la piel y los músculos [44].

Los receptores sensoriales se localizan en la piel, en el intestino, en otros órganos viscerales, en el músculo y en las articulaciones [42], que tienen la capacidad de percibir la energía térmica, la electromagnética, la mecánica o química (proveniente del ambiente) y convertirlas en impulsos eléctricos y transmitirlos en forma de potenciales de acción.

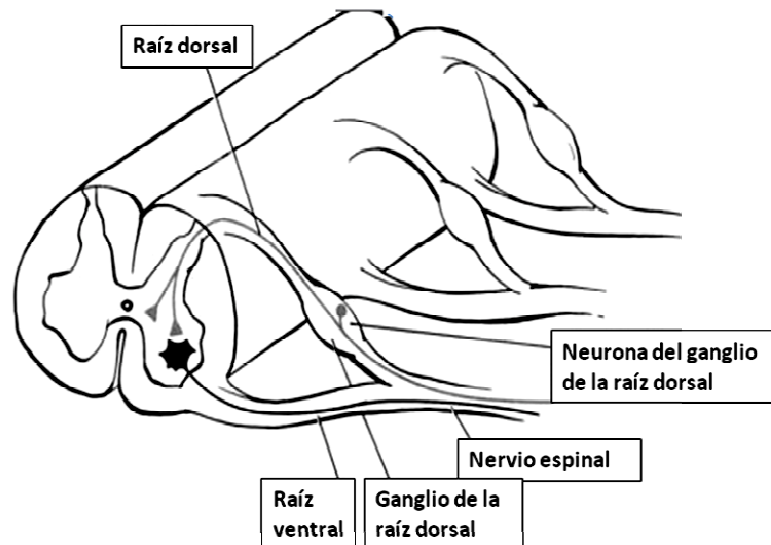


Figura 7. Esquema de la localización y estructura de los ganglios de la raíz dorsal [42].

8.1.1. Mecanismos propuestos en los DRG por efecto de la Cn2

Diversos estudios sobre el análisis del perfil proteómico de los DRG, mediante electroforesis bidimensional (2-DE), se han llevado a cabo para entender diferentes fenómenos biológicos como el efecto crónico de la morfina [45], el efecto de la hiperalgesia [46], del dolor neuropático [47, 48], entre otros. Esto significa que tanto la técnica empleada (2-DE) como el perfil proteómico de los DRG resulta ser un elemento sobresaliente para comprender diversos fenómenos fisiológicos.

En lo que respecta al efecto de la neurotoxina Cn2 sobre los DRG puede estar influenciado por dos vías. Una es por la interacción directa de la Cn2 sobre los canales de sodio de los DRG, pero también puede ocurrir que la neurotoxina afecte los canales de órganos periféricos (corazón, pulmón y otros) provocando una serie de alteraciones que ocasionen una respuesta en las neuronas de los DRG. Existe evidencia para ambos casos.

En el primer caso, se sabe que la Cn2 ocasiona un cambio en el umbral de activación a potenciales hiperpolarizados de los $\text{Na}_v 1.6$ [25]. Se sabe que los canales de sodio dependientes de voltaje son los responsables del inicio y conducción de potenciales de acción. La llegada de un potencial de acción a una terminal nerviosa aumenta las concentraciones intracelulares de Na^+ y Ca^{2+} . La entrada de calcio a las neuronas a través de los canales de calcio dependientes de voltaje se asocia con una variedad de procesos intracelulares [49]. Evidentemente la Cn2 podría estar afectando procesos celulares muy importantes, ya que se ha reportado que la Cn2 estimula la liberación de GABA (ácido aminobutírico) en sinaptosomas de ratón [50]. En el segundo caso, debido a que el canal $\text{Na}_v^+ 1.6$ parece estar ubicuamente expresado en diferentes tejidos [30, 51] y a que se ha observado que el veneno de alacrán es absorbido hacia el torrente sanguíneo para distribuirse a diferentes órganos [3], la toxina Cn2 podría estar ejerciendo un efecto directo sobre los canales iónicos de diferentes tejidos periféricos. Las terminaciones nerviosas de los tejidos periféricos contactan con las terminaciones axonales de las neuronas de los DRG, por lo que el efecto sobre los DRG podría originarse de esta manera. En el miocardio se ha comprobado la existencia del canal $\text{Na}_v^+ 1.6$ funcionalmente activo [52] y en general en el sistema cardiovascular se han observado diferentes desórdenes fisiológicos ocasionados por la picadura de alacrán [3]. El entorno cardiaco está cambiando constantemente y esto es transmitido a diversas neuronas, entre ellas, las que se encuentran en los DRG, estas neuronas tiene la capacidad de transmitir tanto señales mecánicas como químicas [53]. Durante la isquemia del miocardio (fenómeno inducido por la picadura de alacrán) se ha visto que la liberación de adenosina, bradiquinina y ATP, a partir de las terminaciones nerviosas del miocardio [54]. Estos mediadores químicos pueden provocar una respuesta en las neuronas de los DRG como la sobre-expresión del neuropéptido nociceptina/orfanina FQ (N/OFFQ) [55] o de la sustancia P [56]. Los cambios inducidos por la isquemia aguda en el miocardio estimulan las terminaciones nerviosas del corazón y la respuesta neuronal asociada a las neuronas aferentes primarias (presentes en los DRG), lo cual se podría expresar como un cambio en la liberación y presencia de neurotransmisores [56]. Un evento estimulante como la picadura de un alacrán involucra múltiples alteraciones sistémicas y locales, que pueden producir importantes cambios en el funcionamiento de las neuronas sensoriales de los DRG. Estos cambios se pueden reflejar en una producción diferencial de proteínas, enzimas, receptores moleculares, neuropéptidos, segundos mensajeros y otras moléculas importantes.

8.2. Cerebelo

Otro de los tejidos analizados en el presente proyecto fue el cerebelo. El cerebelo está involucrado principalmente en la regulación motora de las extremidades, ojos y dedos y el aprendizaje motor [57]. Recientemente se han propuesto otras funciones en las que podría estar involucrado como en funciones cognitivas, que aún es materia de un intenso debate [58] y se piensa que podría participar en la nocicepción. Algunas proyecciones cerebelares influyen la respiración, modulan la detección de la discrepancia sensorial y la predicción de eventos sensoriales [59].

El cerebelo se divide en corteza, una región medular (materia blanca) y muchos núcleos cerebelares profundos (neuronas localizadas centralmente); a su vez la corteza cerebelar (Fig. 8) está constituida por tres capas: capa de células granulares (contiene principalmente células granulares), capa media o de células de Purkinje (contiene principalmente células de Purkinje) y la capa molecular que contiene principalmente prolongaciones celulares y pocos somas neuronales [60].

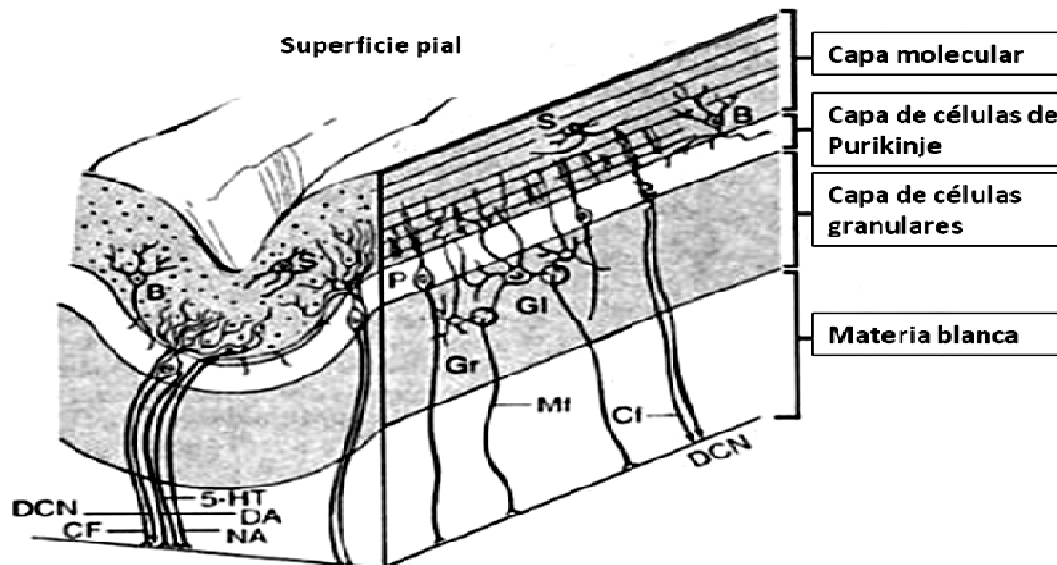


Figura 8. Esquema de la cito arquitectura básica de la corteza cerebelar*.

*Tres tipos de proyecciones nerviosas aferentes: Fibras ascendentes (Cf), fibras musgosas (Mf) y fibras aminérgicas (DA, NA, 5-HT). 5 principales tipos de neuronas: Célula de Purkinje (P), células granulares (Gr), células de canasta (B), células estrelladas (S). También se ilustra, el glomérulo (Gl) y la salida al núcleo profundo cerebelar (DCN) [61]

El cerebelo consta principalmente de 5 tipos celulares: células de Purkinje, granulares, estrelladas, de canasta y células de Golgi. Los axones de las células granulares se prolongan hasta la capa molecular, en donde se bifurcan formando fibras paralelas que contactan con las dendritas de las células de Purkinje. Las fibras paralelas son glutamatérgicas y generalmente excitan a las células de Purkinje. Las células estrelladas y de canasta mandan proyecciones inhibitorias a las células de Purkinje debido a que son GABAérgicas. Las células de Golgi también hacen conexiones inhibitorias pero con las células granulares. Las células de Purkinje son los decodificadores finales de la información en la corteza cerebelar debido a que son las únicas células que recogen información fuera de la corteza hacia los núcleos intracerebelares [59]. En general el cerebelo recibe información de las fibras musgosas (provenientes de diferentes áreas de sistema nervioso) y de las fibras ascendentes (provenientes de la oliva inferior). Las fibras musgosas hacen sinapsis con las células granulares y de Golgi mientras que las fibras ascendentes hacen sinapsis con las células de Purkinje [60]. La manera en que las neuronas cerebelares responden a estas señales depende directamente del tipo de canales iónicos que están expresando y de la localización subcelular de esos canales.

8.2.1 Mecanismos propuestos en cerebelo por el efecto de la Cn2

Mediante hibridación *in situ* e inmunolocalización se ha demostrado que el canal Na_v 1.6 está presente en las células de Purkinje, células granulares, interneuronas de la capa molecular, glia Bergman y en neuronas cerebelares profundas [60]. A pesar de la presencia del Na_v 1.6 en el cerebelo, este se halla protegido por la barrera hematoencefálica (BHE), lo cual podría impedir el paso de la neurotoxina al cerebelo y evitar la interacción entre ésta y el canal de sodio. La barrera hematoencefálica es una estructura compleja constituida, principalmente, por células endoteliales de la red del sistema nervioso central (SNC) [62]. El endotelio que forma la BHE se caracteriza por ser continuo y porque cada borde celular está íntimamente unido a la célula adyacente y de ese modo sella la hendidura intercelular lo que hace impermeable a la pared interna del capilar cerebral [62]. La BHE cumple con funciones como proteger al SNC de agentes potencialmente neurotóxicos que comúnmente circulan en la sangre y regular el intercambio entre la sangre circulante y el tejido nervioso, lo que permite mantener la homeostasis del microambiente químico del SNC. Se ha estudiado la posibilidad de que el veneno o diferentes componentes de él crucen esta barrera y los resultados han sido negativos [63], sin embargo se han reportado casos de infarto cerebelar severo [9, 64] durante la intoxicación por picadura de alacrán. Esto se ha explicado como un efecto causado por diferentes alteraciones sistémicas periféricas como: aumento agudo de la presión arterial que rompe vasos desprotegidos o enfermos, miocarditis tóxica que provoca arritmias que dan lugar a la embolia cerebrovascular, hipercoagulabilidad, coagulación intravascular diseminada, vasculitis causada por el veneno e hipotensión causada por miocarditis, hiperactividad parasimpática y deshidratación [65]. El cerebelo también influencia varias funciones del sistema nervioso autónomo incluyendo la respiración [66] y el sistema cardiovascular [67], dos de los principales sistemas afectados por la picadura de alacrán.

En base a lo anterior se considera que el efecto de la intoxicación en el cerebelo, difícilmente será ocasionado por la disfunción causada por la acción directa de la neurotoxina sobre los canales iónicos, pero sí puede ser ocasionado por el desorden metabólico y sistémico provocado en órganos periféricos. El cerebelo fue elegido con la intención de analizar una respuesta no ocasionada por el efecto de la interacción entre la neurotoxina y los canales de sodio del cerebelo, sino de los mecanismos afectados por esta interacción, en otros tipos celulares, que repercutan en el funcionamiento del cerebelo. Diversos estudios incluyen el análisis del perfil proteómico con 2D-PAGE del cerebelo en diferentes condiciones como el alcoholismo crónico [68], el desarrollo post-natal [69], bajo el efecto de cannabinoides [70], comparando su perfil con otros tejidos del cerebro [71, 72]. Esto indica que tanto la técnica empleada (2-DE) como el perfil proteómico del cerebelo resultan elementos importantes para comprender diversos fenómenos fisiológicos.

9. FUNDAMENTOS TÉCNICOS

9.1. *Electroforesis bidimensional en gel*

Actualmente los estudios proteómicos han sido ampliamente utilizados debido a que consisten en el estudio de las propiedades de proteínas (niveles de abundancia, modificaciones postraduccionales, interacciones, etc.) a gran escala para obtener una visión global e integrada de procesos celulares y redes a nivel proteico [73]. Además el patrón de abundancia de proteínas (proteoma), se encuentra en un estado de flujo dinámico, constantemente cambiando y respondiendo a estímulos, lo que permite que su estudio represente diversos procesos celulares [74].

La proteómica consiste en dos pasos fundamentales: la separación de proteínas y su identificación. La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE, *two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis*), en conjunto con la espectrometría de masas de alta sensibilidad, ha resultado ser de las técnicas más recurridas en estudios proteómicos [73]. La 2D-PAGE es una herramienta analítica poderosa que permite la caracterización de mezclas complejas de proteínas, debido a que se monitorean dos de las principales características de las proteínas: carga y peso molecular [75]. La 2D-PAGE resulta de la combinación de dos procedimientos electroforéticos de alta resolución:

- Isoelectroenfoque (IEF, primera dimensión): separa a las proteínas en base a su punto isoeléctrico (pI).
- Electroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, segunda dimensión): separa a las proteínas en base a su peso molecular.

El producto de esta técnica es un patrón de manchas en el gel de poliacrilamida. Cada mancha representa proteínas separadas en base a su punto isoeléctrico (pI) y su peso molecular. Básicamente el método consiste en la preparación de la muestra, IEF, electroforesis SDS-PAGE, tinción, análisis de imagen y la identificación por espectrometría de masas.

9.1.1. *Preparación de la muestra*

La preparación eficiente y reproducible de la muestra es un elemento clave para la doble dimensión. La muestra aplicada a la 2D-PAGE debe contener proteínas desnaturalizadas, sin agregados, reducidas y completamente solubilizadas para lograr la rotura de las interacciones moleculares y asegurar que cada mancha represente un polipéptido individual [76]. La preparación de la muestra debe ser tan simple como sea posible para incrementar la reproducibilidad. En el caso de las muestras provenientes de tejidos completos hay tres pasos fundamentales: lisis celular, inactivación o eliminación de sustancias de interferencia y solubilización de proteínas. No existe un solo protocolo capaz de ser aplicado de manera general para el tratamiento de las muestras debido a que se requiere de un proceso de optimización para cada muestra que será tratada [77].

La lisis celular se logra con uno o la combinación de diferentes mecanismos: lisis osmótica, lisis con detergentes, lisis enzimática de la pared celular, sonicación, molienda en nitrógeno líquido, alta presión u homogenización con camas de vidrio, etc. [78]. La elección del método dependerá del tipo de muestra, el tipo de tejido y el tipo de estudio [77]. Durante la lisis celular, es necesario que se inactiven proteasas, lo cual se logra con el uso de inhibidores de proteasas o bien de procesos que provoquen su inactivación (hervir la muestra, bajo pH) [77, 78]. Con esto se evitará la degradación de proteínas que de otra manera resultaría en una pérdida de proteínas de alto peso molecular y en modificaciones de las proteínas.

Sustancias de interferencia como iones de sal o polisacáridos entre otros pueden interferir con el óptimo desarrollo de etapas posteriores. Las sales pueden interferir con el IEF reduciendo la resistencia y dificultando el alcance de altos voltajes necesarios para el IEF [77, 79]. Otras sustancias como polisacáridos y ácidos nucleicos pueden interactuar con los anfólitos y las proteínas produciendo un patrón rayado [77]. La eliminación de sustancias de interferencia, se puede lograr con el uso de la precipitación de proteínas con solventes orgánicos, diálisis o incluso con el uso de paquetes comerciales. Los métodos más eficientes son la precipitación usando cloroformo-metanol, ácido tricloroacético (TCA) o acetona, que a su vez permiten eliminar diversos contaminantes y romper complejos eficientemente, previniendo la actividad de proteasas irreversiblemente [79].

La solubilización consiste en la ruptura de interacciones macromoleculares, incluyendo puentes disulfuro e interacciones no covalentes, con el fin de separar las cadenas polipeptídicas y conseguir una completa desnaturalización de las proteínas. Generalmente se recurre al uso de agentes caotrópicos, agentes reductores, amortiguadores y anfólitos, con la condición de que no aumenten la fuerza iónica de la solución, para que permita la aplicación de altos voltajes durante el enfoque sin provocar altas corrientes. Durante el proceso de solubilización se debe prevenir cualquier modificación de los polipéptidos en el medio de solubilización [80] y mantener las proteínas en solución hasta el final de la doble dimensión, debido a que en el IEF se pueden encontrar problemas severos como la interacción entre proteínas de diferentes pI, eventos de precipitación debido al alto coeficiente de fricción durante la entrada de la muestra en el gel y el bajo grado de solubilidad de las proteínas a su pI, lo cual también puede resultar en la precipitación de proteínas [80]. Normalmente la ruptura de puentes disulfuro se logra agregando en exceso un compuesto tiol al medio de solubilización. Los más usados son agentes reductores como el ditioneitol (DTT) o el ditioeritritol (DTE) [76]. Las interacciones no covalentes (enlaces iónicos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) [80], se rompen con el uso de agentes caotrópicos y detergentes. Los agentes caotrópicos más usados son la urea y la tiourea. La urea resulta muy eficiente para la ruptura de puentes de hidrogeno [80] y la tiourea es mejor rompiendo interacciones hidrofóbicas. Las mezclas de urea y tiourea exhiben un alto poder solubilizador [76, 80]. El uso de detergentes siempre es incluido en el medio solubilizador para muestras de 2D-PAGE. Los detergentes se usan para eliminar interacciones hidrofóbicas y para incrementar la solubilidad de las proteínas a su pI. Estos detergentes no deben ser iónicos,

para permitir la migración de las proteínas de acuerdo a su carga. Los detergentes comúnmente usados son CHAPS o su análogo hidroxilo CHAPSO [80]. Los anfólitos acarreadores ayudan a contrarrestar el efecto de insuficiente sal en la muestra, debido a que muchas proteínas tienden a precipitarse en su pI y un requerimiento de sal ayuda a mantener la solubilidad.

9.1.2. Isoelectroenfoque

La primera dimensión (IEF) consiste en la separación de proteínas en base al contenido de aminoácidos ácidos o básicos. Los grupos cargados de los residuos aminoacídicos son los que contribuyen a la carga neta de la proteína. Para cualquier proteína, el pH al cual el número de cargas positivas es igual al número de cargas negativas es conocido como punto isoelectrónico (pI). Cuando el pH es igual al pI la carga neta de la proteína es cero y no tendrá movilidad electroforética [75]. El isoelectroenfoque se lleva a cabo en un gradiente de pH, bajo la acción de un campo eléctrico, lo cual provocará el movimiento de la proteína en el gradiente donde su carga es cero. Una proteína con carga positiva migrará hacia el cátodo, haciéndose menos positiva progresivamente conforme se va moviendo a través del gradiente, hasta alcanzar su pI . Una proteína con carga negativa migrará hacia el ánodo, volviéndose cada vez menos negativa, hasta alcanzar su pI . Si una proteína se difunde lejos de su pI , esta inmediatamente gana carga y migra hacia su pI . Este es el efecto de enfoque del IEF, el cual concentra las proteínas en sus pI s y permite la separación de proteínas en base a diferencias de carga muy pequeñas [75].

Los métodos modernos para el IEF utilizan un gel delgado de poliacrilamida como un tamiz molecular que contiene un gradiente de pH inmovilizado (IPG), que garantiza gradientes de pH extremadamente estables permitiendo mayor reproducibilidad. Las tiras IPG se pueden producir en el laboratorio [77] o bien pueden ser adquiridas comercialmente. Las tiras secas de IPG comerciales son muy populares debido a su fácil manejo y mejor reproducibilidad de resultados [77].

El IEF se realiza generalmente en equipos como el sistema de isoelectroenfoque *Ettan IPGphor (Amersham Biosciences)*, que contienen una fuente de poder de alto voltaje. La resolución del proceso está determinada por la curva del gradiente de pH y la fuerza del campo eléctrico. Es muy útil aplicar un gradiente voltaje/tiempo en las tiras para minimizar las diferencias en cuanto a conductividad proveniente de las cantidades variables de sales entre las tiras de IPG [79]. El IEF generalmente se lleva a cabo por un número constante de volt-horas (V-hr), esta unidad es la integral de los volts aplicados en el tiempo. Los sistemas de IEF deben tener un sistema de refrigeración para asegurar la reproducibilidad debido a que los valores de pK de las proteínas y de los amortiguadores usados son altamente dependientes de temperatura [79].

La aplicación de la muestra también es importante para obtener buenos resultados en la 2D-PAGE, existen diferentes modos de aplicación de la muestra a la tira IPG de la primera dimensión: rehidratación en gel, rehidratación activa y carga en copa (cup-

loading). La rehidratación en gel actualmente es el método preferido, debido a que facilita la aplicación de altas cantidades de muestras y reduce los tiempos de enfoque [81].

Después del IEF, es necesario equilibrar las tiras IPG, con el fin de permitir la solubilización de las proteínas previamente enfocadas y de una completa interacción de las proteínas con el dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) de la segunda dimensión. El equilibrio se lleva a cabo tratando las tiras IPG con amortiguadores reductores que contengan SDS y DTT/iodoacetamida para asegurar que las proteínas están completamente cubiertas con SDS, que las cisteínas están reducidas y alquiladas [77].

9.1.3. Segunda dimensión SDS-PAGE

En la segunda dimensión las proteínas se separan en base a su peso molecular, en geles de poliacrilamida y en presencia de SDS. El SDS es un detergente aniónico que rompe casi todas las interacciones no covalentes de las proteínas nativas, lo que provoca la desnaturalización de las proteínas. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal polipeptídica a razón de un SDS por cada dos residuos de aminoácidos. Este complejo de SDS con una proteína desnaturalizada tiene una gran carga negativa, que es aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. La carga negativa conseguida por la unión de SDS es normalmente mucho mayor que la carga de la proteína nativa, por lo que esta se considera no significativa [82]. Durante la electroforesis los complejos SDS-proteína migran hacia el ánodo y su movilidad es principalmente dependiente de su peso molecular pero también puede ser influenciada por su hidrofobicidad. La migración de las proteínas en estas condiciones es linealmente proporcional al logaritmo de su masa [79]. Las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes se quedan arriba. Con la ayuda de la comigración de marcadores estándar de peso molecular, se puede aproximar el peso molecular de los polipéptidos.

En principio los geles SDS-PAGE pueden ser corridos con diferentes sistemas de amortiguadores, sin embargo el sistema discontinuo de Laemmli [83] es el sistema comúnmente usado, se emplea Tris-cloruro pH 8.8 en el gel y SDS-Tris-glicina en el amortiguador de corrida [79, 81]. La matriz estándar es una capa homogénea con determinada concentración de acrilamida total (T) y una concentración de bis-acrilamida (C), que dependerá de las condiciones del estudio. Los geles de gradiente SDS-PAGE brindan un amplio rango dinámico de resolución, pero es más difícil hacerlos consistentes y reproducibles, lo cual es vital para los estudios cuantitativos de proteómica [79]. El grosor del gel varía entre 1.5 mm y 0.5 mm. Geles más delgados tienen una mejor estabilidad dinámica, se pueden enfriar más eficientemente y pueden ser corridos más rápido pero son más difíciles de teñir y dan lugar a la pérdida de muestra [79].

La electroforesis se puede hacer tanto verticalmente como horizontalmente. Los sistemas verticales son más comunes y hay equipos en los que se puede correr hasta 12 geles simultáneamente. Los sistemas horizontales son poco usados pero su ventaja es el bajo consumo de reactivos [79].

9.1.4. *Detección de proteínas*

La visualización de las proteínas se lleva a cabo mediante la tinción del gel. Existen diferentes métodos pero las características ideales para un método de tinción consisten en una alta sensibilidad, un rango lineal dinámico amplio (número de órdenes de magnitud en donde la respuesta del detector aumenta proporcionalmente con la cantidad de proteína), una alta reproducibilidad y compatibilidad con los procedimientos post-electroforéticos de detección de proteína como espectrometría de masas [77].

Los métodos de detección usados en geles de doble dimensión pueden ser clasificados como a) detección con colorantes orgánicos, b) detección por precipitación diferencial de sales, c) detección por reducción de iones metálicos, d) detección por fluorescencia y d) detección con isótopos radioactivos [78]. Las tinciones más usadas son las de colorantes orgánicos, la reducción de iones metálicos y fluorescencia.

Los colorantes orgánicos más populares corresponden a la familia trifenilmetano, colorantes de azul de coomassie: Coomassie G-250 y R-250. Este colorante se une no-covalentemente a los grupos amino de las proteínas y debido a que son aniónicos requieren de un medio ácido para la interacción electrostática [78, 84]. Este colorante es barato, de fácil uso y compatible con la mayoría de los subsecuentes análisis de proteínas por espectrometría de masas (MS). Actualmente el más usado es el coomassie G-250 en dispersión coloidal. Posee una alta afinidad por las proteínas, lo cual resulta en buenos límites de detección (10-100 ng) sin embargo posee un estrecho rango lineal dinámico de un orden de magnitud [85].

Los métodos por reducción de iones metálicos, como la tinción con plata se basan en la saturación del gel con iones de plata, lavando los enlaces más débiles y reduciendo los enlaces proteína-ión para formar plata metálica. Actualmente hay más de 100 diferentes variantes de esta tinción. En general se pueden clasificar en tinción de plata alcalina y tinción de plata ácida, dependiendo de las condiciones usadas para la impregnación de plata. Los métodos alcalinos se llevan a cabo con un complejo de diamina de nitrato de plata en un ambiente altamente alcalino (hidróxido de sodio y amonio). Posteriormente los patrones se desarrollan en soluciones ácidas de formaldehído [86]. Los métodos ácidos usan nitrato de plata en agua (soluciones ácidas débiles) para la impregnación del gel y los patrones se desarrollan en soluciones de formaldehído a pH alcalino. Con la tinción con plata se puede detectar de 100 pg a 1 ng de proteína sin embargo tienen rango dinámico muy estrecho (1 a 2 órdenes de magnitud) [86].

Los colorantes fluorescentes usualmente detectan la proteínas mediante uniones no covalentes, bien uniéndose directamente a la proteína o al SDS que cubre a la proteína. Las proteínas son teñidas simplemente empapando el gel en una solución acuosa que contenga el fluoróforo. Estos métodos resultan muy sensibles, tienen un amplio rango dinámico, una buena linealidad de detección y son fáciles de usar [78]. Un ejemplo es SYPRO Ruby® (Molecular Probes).

9.1.5. Análisis de imágenes

Uno de los principales objetivos de la proteómica es la identificación de la abundancia diferencial de proteínas entre muestras control y muestras en condiciones experimentales. Esto se refiere a la identificación de manchas de proteína que se inhiben (desaparecen), se inducen (aparecen) o bien cambia su abundancia (su intensidad aumenta o disminuye). El análisis de los geles obtenidos por 2D-PAGE se hace con programas de cómputo especializados, para esto el gel debe ser digitalizado previamente y la imagen obtenida es analizada en el programa. Cuando la imagen es sometida al proceso de análisis computacional, el programa limpia la imagen para reducir el ruido de fondo y quitar rayas verticales y horizontales, después las manchas individuales son detectadas y cuantificadas. La intervención activa del usuario es necesaria para un correcto análisis. Posteriormente comienza el análisis comparativo entre la serie de geles a ser procesados, este paso es difícil debido a la inherente irreproducibilidad de los geles por lo que también requiere intervención del usuario, que se encarga de marcar varias manchas y con esto el programa puede comenzar a marcar el resto de las manchas automáticamente [77, 87].

9.1.6. Espectrometría de masas

La 2D-PAGE con IPGs, combinado con la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) es la metodología mayormente empleada en estudios proteómicos [77]. Cuando alguna proteína es detectada en el gel 2D-PAGE, se corta de éste, bien sea de manera automática o manual y se somete a un procedimiento de preparación para su posterior sometimiento a MS que comprende: destinción, modificación química y digestión [88]. En este proyecto la identificación de proteínas se llevó a cabo por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem). La MS hoy en día es una de las técnicas más usadas para la identificación de proteínas debido a su alta sensibilidad y rapidez. En la MS las biomoléculas, en este caso proteínas, primero son digeridas usando proteasas específicas, que permiten la ruptura específica en determinados sitios de la proteína (generalmente se usa tripsina) para obtener fragmentos peptídicos de la proteína. Una vez obtenida la mezcla de péptidos, se separan de acuerdo a sus características hidrofóbicas o hidrofílicas mediante una columna HPLC que está acoplada al espectrómetro de masas. Posteriormente los péptidos son ionizados por la acción de un fuerte potencial eléctrico. Una vez ionizado el analito entra a un sistema de vacío (espectrómetro de masas) en donde es guiado por campos magnéticos y el radio masa-carga (m/z) es medido siguiendo su trayectoria específica en este sistema de vacío, de esta manera se genera el espectro de masas, del cual se puede calcular el peso molecular de determinado fragmento peptídico. Al someter los espectros de fragmentación o las secuencias de estos péptidos a los bancos de datos se obtiene una identificación de una determinada proteína de forma muy segura.

10. JUSTIFICACIÓN

Para este proyecto, en particular, podemos definir dos tipos de eventos que ocurren durante el proceso de envenenamiento por la picadura del alacrán: eventos primarios y eventos secundarios. El primero se refiere al reconocimiento del canal iónico por la neurotoxina, este evento primario, como se describió anteriormente, consiste en la unión de la toxina al canal de sodio y mediante un mecanismo conocido como *Voltage Sensor Trapping*, la unión de la toxina impide el regreso del sensor al estado de reposo ocasionando un cambio en el umbral de activación a potenciales hiperpolarizados. Los eventos secundarios, se refieren a la red de eventos moleculares que ocurren a nivel celular ocasionados por el efecto primario de la neurotoxina. Estos últimos han sido poco estudiados y en realidad poco caracterizados.

Con el fin de tener mayor conocimiento del proceso de envenenamiento, es necesario identificar y analizar los eventos moleculares (moléculas y procesos) inmediatos a la acción primaria de neurotoxinas. Por tal razón en esta tesis se propuso analizar a nivel proteómico la respuesta celular al efecto de la neurotoxina Cn2, mediante la comparación del perfil proteómico de tejidos como los ganglio de la raíz dorsal (DRG) y cerebelo de ratones intoxicados con la neurotoxina Cn2 y ratones control. Los DRG fueron elegidos por la alta presencia de canales Na_v 1.6 y por su importante función biológica. El cerebelo fue elegido debido a su importante actividad biológica sobre órganos que se han visto afectados por el envenenamiento por la picadura de alacrán y porque se han observado serias alteraciones en el cerebelo de pacientes bajo el efecto de la picadura de alacrán.

11. HIPÓTESIS

El efecto de la neurotoxina Cn2 causa cambios en los niveles de abundancia proteica celular, tanto en el los ganglios de la raíz dorsal como en el cerebelo de ratones tratados con la Cn2; estos cambios pueden ser detectados mediante el análisis del perfil proteómico obtenido por 2D-PAGE.

12. OBJETIVO GENERAL

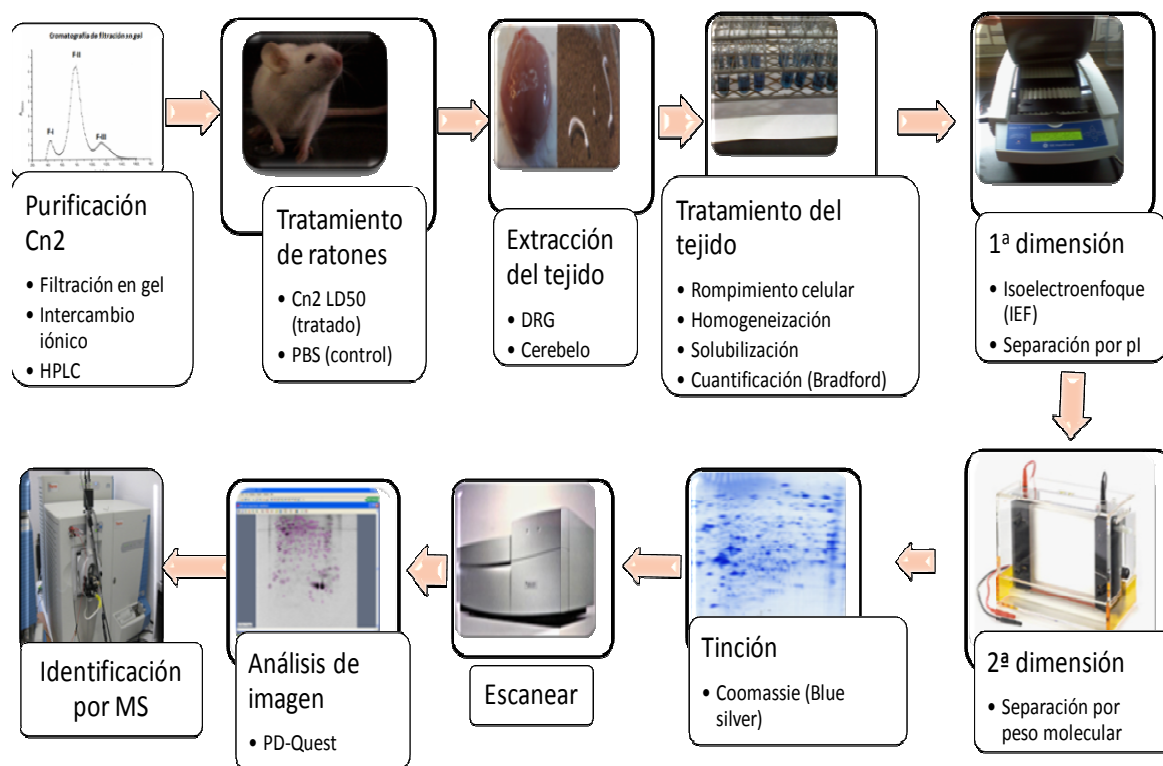
Analizar el patrón de abundancia proteica de ganglios de la raíz dorsal y cerebelo de ratones control y ratones sometidos al efecto de la neurotoxina Cn2.

12.1. *Objetivos específicos*

- Purificar la toxina Cn2 a partir del veneno total de *Centruroides noxius*
- Establecer una estrategia adecuada para la extracción y limpieza de las proteínas provenientes de los DRGs y cerebelo.
- Establecer las condiciones óptimas de elaboración de geles bidimensionales, que brinden buena resolución.

- Comparar, mediante un programa de cómputo de análisis de imagen (PDQuest), geles bidimensionales del tejido control y tratado, tanto de DRGs y cerebelo.
- Identificar por MS las proteínas cuya abundancia presente diferencias entre los tejidos control y tratado.

13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



14. METODOLOGÍA

14.1. *Purificación de la toxina Cn2*

La purificación de la toxina Cn2 requiere de una serie de cromatografías, que previamente han sido descritas [89], la primera de ellas consiste en una cromatografía de filtración en gel, seguida por tres cromatografías de intercambio iónico a pH 4.7, 6 y 8 y la verificación de la pureza de la neurotoxina por cromatografía líquida de alta presión (*HPLC, High Performance Liquid Chromatography*).

14.1.2. Cromatografía de filtración en gel

Quinientos mg del veneno total liofilizado, se resuspendieron en 5 ml de amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH=4.7. La muestra se aplicó a una columna de vidrio con un diámetro de 1.8 cm y 200 cm de largo, empacada por gravedad con Sephadex G-50 medio. La resina fue previamente hidratada y preparada en 200 ml de amortiguador de acetato de amonio.

La columna, conteniendo la resina, fue equilibrada con el mismo amortiguador de resuspensión del veneno, acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Este mismo amortiguador también fue usado para la elución. Se colectaron muestras de 2.5 ml por tubo mediante un colector de fracciones. La separación fue monitoreada mediante el registro gráfico del detector de absorbancia con sensibilidad de 0.1 (*uvicord*). La corrida se llevó a cabo a temperatura ambiente y a presión constante. Posteriormente se leyó la absorbancia a 280 nm de cada uno de los tubos obtenidos, para finalmente coleccionar cada una de las fracciones separadas. Todos los amortiguadores usados en esta cromatografía y en las subsecuentes fueron filtrados con papel filtro de 0.45 μ m mediante un sistema de vacío.

14.1.3. Cromatografía de intercambio iónico

Los siguientes procesos cromatográficos, consistieron en 3 cromatografías de intercambio iónico a diferente pH (4.7, 6 y 8). Todas estas se llevaron a cabo en una columna de vidrio de 0.6 cm de diámetro y 30 cm de largo, empacada por gravedad con carboximetil-celulosa (CMC-32) previamente hidratada y preparada de la siguiente manera: **1)** se lavó durante 5 min con 1M de NaOH, **2)** se filtró con papel de 150 mm mediante un sistema de vacío, **3)** se lavó durante 5 min con agua bidestilada (2-3 veces), **4)** se filtró con papel de 150 mm mediante un sistema de vacío, **5)** se lavó durante 5 min con 1 M HCl, **6)** se filtró con papel de 150 mm mediante un sistema de vacío, **7)** se lavó durante 5 min con agua bidestilada (2-3 veces), **8)** se filtró con papel de 150 mm mediante un sistema de vacío y **9)** la resina se puso en el amortiguador adecuado (de acuerdo al amortiguador usado durante la cromatografía correspondiente).

Cada una de estas cromatografías se corrió con la ayuda de una bomba peristáltica de flujo controlado. Las muestras fueron colectadas mediante un colector de fracciones, acumulando 2.5 ml por tubo. La separación fue monitoreada mediante el registro gráfico

del detector de absorbancia con sensibilidad de 0.1 (*uvicord*). Las corridas se llevaron a cabo a temperatura ambiente y a presión constante. Después de cada una de las corridas se leyó la absorbancia a 280 nm de cada uno de los tubos obtenidos, para finalmente colectar cada una de las fracciones separadas.

14.1.3.1. Cromatografía de intercambio iónico pH 4.7

La fracción II, obtenida de la primera separación por filtración en gel se fraccionó en una columna de carboximetil-celulosa (CMC) a pH 4.7. La columna cromatográfica, se equilibró pasando 200 ml de amortiguador de acetato 20 mM pH 4.7. Una vez lista la columna, se procedió a cargar la muestra. Se aplicaron 120 mg de la fracción II, aproximadamente, y se comenzó la elución con un gradiente lineal de 0 a 0.5 M de NaCl en el amortiguador de acetato previamente mencionado. Después de que el gradiente terminó, se pasó 50 ml de NaCl 1 M para recuperar los componentes que se quedaron en la columna. Finalmente con el fin de limpiar la columna se pasó un gradiente reverso de 1-0 M de NaCl preparado con el amortiguador de fosfato de sodio que se usó a continuación.

14.1.3.2. Cromatografía de intercambio iónico pH 6

El componente II-9, obtenido de la cromatografía anterior, fue fraccionado en la columna CMC a pH 6. Esta vez la columna fue equilibrada con 200 ml de amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6. Previo a la aplicación de la muestra, la fracción se sometió a un proceso de diálisis usando bolsas de diálisis con un límite de exclusión de 3500 Da. La diálisis consistió en 4 cambios de 10 min cada uno, con el amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6. Se aplicaron 27 mg del componente II-9. Se usó un gradiente de elución de NaCl de 0 a 0.38 M preparado en amortiguador de fosfato de sodio. Una vez que terminó el gradiente, se procedió de la misma manera que la cromatografía anterior.

14.1.3.3. Cromatografía de intercambio iónico pH 8

El componente II-9.2 se fraccionó en una columna de CMC a pH 8. Esta fracción también se sometió a un proceso de diálisis antes de ser aplicada a la columna. La diálisis fue muy similar a la anteriormente descrita, con la diferencia de que se usó el amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 8. La columna fue preparada equilibrándola con el gradiente reverso de la cromatografía anterior. Se aplicó un total de 24.31 mg del componente II-9.2. Se usó un gradiente de elución de NaCl de 0 a 0.30 M preparado en el amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH=8. Una vez que terminó el gradiente, se pasó 50 ml de NaCl 1 M para recuperar los componentes que hayan quedado en la columna.

14.1.4. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Para asegurar la pureza de la Cn2, el componente II-9.2.2 separado en la cromatografía anterior, se sometió a un proceso de cromatografía líquida de alta resolución. Se usó una columna en fase reversa C-18. Se corrió en un gradiente de 0-60% de B (acetonitrilo mas 0.1% de ácido trifluoro-acético, TFA) en 60 minutos. Los componentes cromatográficos se colectaron para su posterior determinación de masa.

14.1.5. Espectrometría de masas

De los componentes cromatográficos obtenidos por HPLC se determinó su masa por espectrometría de masas para asegurarnos de que el componente cromatográfico correspondía a la Cn2 y no a otro componente.

14.2. *Tratamiento de animales*

Se usaron ratones machos de la cepa CD1 de 20-28 gr. Se dividieron en dos grupos: tratado y control. Los primeros fueron tratados con una dosis correspondiente a la dosis letal media (LD₅₀) de Cn2 (0.25µg/20 g de peso de ratón). La aplicación de la toxina se hizo mediante una inyección intraperitoneal. Los ratones control se trataron con PBS. A los 15 min, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. En corto tiempo se procedió a extraer el tejido de interés (DRG y cerebelo). El tejido se conservó en criotubos con PBS adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas (*Complet*[®], *Roche*) y fosfatasas (*Phostop*[®], *Roche*). Los criotubos se mantuvieron a -80 °C en nitrógeno líquido para su posterior tratamiento. El mismo procedimiento se llevó a cabo en otro de los experimentos pero esta vez aumentando la dosis inyectada a cuatro LD₅₀ (1 µg/20 g de peso de ratón) y sacrificando el animal a los 25 minutos, en este caso solo se disectó el cerebelo.

14.2.1. Extracción de tejidos

El proceso quirúrgico para la extracción de los ganglios de la raíz dorsal requirió la exposición del canal vertebral. Para esto se cortó la cabeza del ratón y se hizo un corte en la piel a lo largo de la columna vertebral. Se abrió el canal vertebral haciendo pequeños cortes de 0.5 mm, aproximadamente, a lo largo de la parte superior de la columna vertebral. Una vez que el canal quedó descubierto, se extrajo la medula ósea, tratando de dejar completamente limpio el canal vertebral para tener una buena visibilidad. Posteriormente se hicieron cortes sobre las vértebras en un ángulo de 45° con respeto al eje vertebral, esto con el fin de ver el foramen intervertebral, que son los espacios donde se encuentran los DRG. Con unas pinzas se extrajeron los DRG torácicos (Fig. 9). La extracción del cerebelo resultó más sencilla debido a que sólo requirió cortar la cabeza del ratón y a partir del canal medular se fue abriendo el cráneo hasta dejar completamente descubierto el cerebro para extraer el cerebelo y se procedió a almacenar en las condiciones indicadas anteriormente. En general el proceso de extracción de los tejidos se

realizó con sumo cuidado y rápidamente para evitar la acción de proteasas y otras modificaciones del tejido.

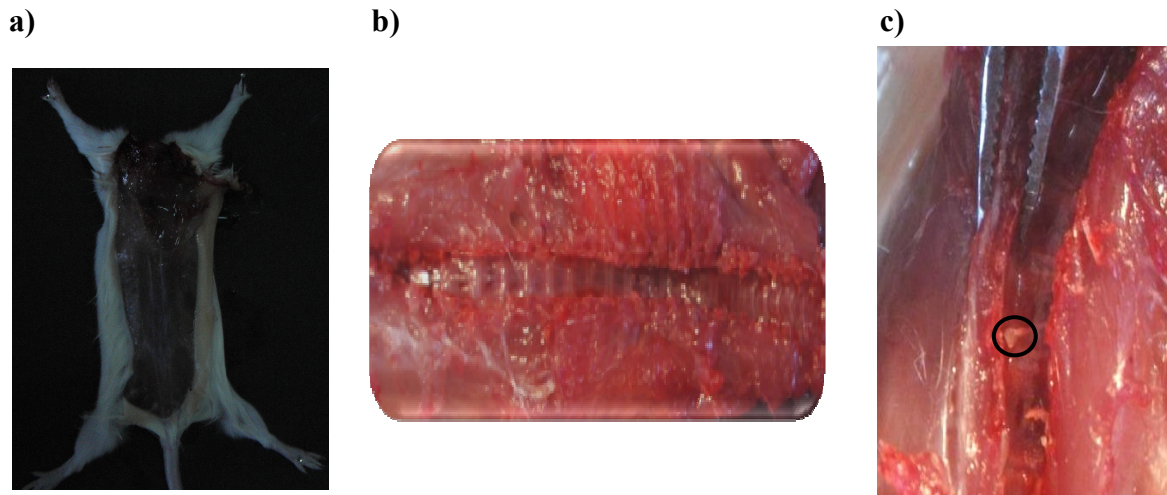


Figura 9. Extracción de los ganglios de la raíz dorsal*.

*a) Decapitación b) Apertura y limpieza del canal vertebral c) localización y extracción de los ganglios, circulo negro indica localización de un ganglio.

14.3. Estandarización del procesamiento de tejidos

La preparación eficiente y reproducible de la muestra es un elemento clave para la doble dimensión. En el caso de las muestras provenientes de tejidos completos hay tres pasos fundamentales: lisis celular, inactivación o eliminación de sustancias de interferencia (limpieza de la muestra) y solubilización de proteínas.

14.3.1. Lisis celular

Los ganglios de la raíz dorsal fueron tratados con diferentes amortiguadores de lisis celular: **1)** CHAPS-Urea-Tiourea (7 M urea, 2 M tiourea y 2% CHAPS), **2)** CHAPS-Urea(8 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 2% anfolitos), **3)** TRIzol® (*Invitrogen*), **4)** Tritón (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.05% SDS), **5)** CHAPS 2% (20 mM HEPES, 5 mM Na-EDTA, 255 mM sacarosa y 2% CHAPS), **6)** CHAPS 4% Urea-Tiourea (7 M urea, 2 M tiourea y 4% CHAPS), **7)** CHAPS 4% Urea (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 2% anfolitos) y **8)** CHAPS 4%(20 mM HEPES, 5 mM Na-EDTA, 255 mM sacarosa y 4% CHAPS).

Los ganglios de la raíz dorsal previamente preservados en nitrógeno líquido se trataron con 200 µl de cada uno de estos amortiguadores de lisis (suplementados con inhibidores de proteasas y fosfatasas). Para una mayor eficiencia de la ruptura celular se sonicaron durante 1 min a intervalos de 10 segundos. Durante el procedimiento las muestras se mantuvieron en un baño de hielo. En los último tres tratamientos, el tejido

fue macerado en N₂ con un pistilo de plástico. El protocolo de TRIzol[®] fue diferente y consistió en tratar a la muestra como sigue: **1)** se agregó 1 ml de TRIzol[®], **2)** se sonicó por 1 min a intervalos de 10 segundos, **3)** se agregó 0.2 ml de cloroformo, **4)** se mezcló (*vortex* 15-30 segundos), **5)** se incubó 5 min a temperatura ambiente, **6)** se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C, **7)** se añadió 1.5 ml de isopropanol (por cada ml de TRIzol[®]) a la interfase y la fase orgánica, **8)** se incubó 20 min a temperatura ambiente, **9)** se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min a 4 °C, **10)** se removió sobrenadante, **11)** se lavó el precipitado 3 veces con 0.3 M de hidrocloreuro de guanidinio (GuHCl) en 95% etanol (solución de lavado), **12)** en cada lavado, se añadió 1 ml de la solución de lavado por cada ml de TRIzol[®], **13)** se disgregó el precipitado, **14)** se esperó 15 min entre lavado y lavado, **15)** después del lavado final se agregó 1 ml de etanol al 100%, **16)** se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min a 4 °C y **17)** se disolvió el precipitado en amortiguador de rehidratación (8 M urea, 2 % CHAPS y 0.002% de azul de bromofenol) y se sonicó.

14.3.2. Limpieza de la muestra

Después del proceso de lisis se continuó con la limpieza de la muestra, con el fin de eliminar sustancias de interferencia como iones de sal o polisacáridos. Para esto se probaron dos diferentes métodos: precipitación con cloroformo-metanol [90] y el paquete comercial 2-D Clean-up Kit[®] (GE Healthcare). Ambos consisten en la precipitación, este proceso generalmente es usado para concentrar y separar las proteínas selectivamente de otras especies contaminantes [91]. El tratamiento del paquete comercial se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El procedimiento de precipitación con cloroformo-metanol consiste en tratar 150 µl de muestra (conteniendo de 150-300 µg de proteína) de la siguiente manera: **1)** se añadieron 600 µl de metanol, **2)** se mezcló (*vortex*), **3)** se añadieron 150 µl de cloroformo, **4)** se añadieron 450 µl de agua tetradestilada, **5)** Mezclar (*vortex*), **6)** se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min, **7)** se añadieron 450 µl de metanol, **8)** se mezcló (*vortex*), **9)** se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, **10)** se quitó sobrenadante y **11)** se disolvió el precipitado en amortiguador de rehidratación.

14.4. Cuantificación de proteína

La proteína se cuantificó por el método de Bradford [92], con algunas modificaciones específicas. La determinación de la concentración de las muestras se hizo en paralelo con una curva estándar de calibración de albúmina bovina sérica (BSA a 600 mg/ml), que comprendió de 0 – 15 µg (en intervalos de tres) y que se aforó a 25 µL con el amortiguador IPG. Al igual que a las muestras problema, se les adicionó 175 µL de agua tetradestilada, 800 µL de reactivo de Bradford y se mezcló inmediatamente incubándose durante 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se leyó la absorbancia a 595 nm. En la siguiente tabla se muestran las indicaciones para la elaboración de la curva estándar y la preparación de las muestras (Tabla 1). El reactivo de Bradford fue preparado con: 0.001% coomassie G-250, 4.15% etanol y 8.15% ácido fosfórico.

Tabla 1. Elaboración de curva estándar para la cuantificación por Bradford.

Tubo	µg BSA	µL BSA	Amortiguador IPG (µL)	Agua tetradestilada (µL)	Reactivo de Bradford (µL)
1	0	0	25	175	800
2	3	5	20	175	800
3	6	10	15	175	800
4	9	15	10	175	800
5	12	20	5	175	800
6	15	25	0	175	800
Muestra problema	No BSA sólo 5 µL de muestra problema		20	175	800

14.5. Electroforesis unidimensional

Para la elección del tratamiento óptimo de los tejidos utilizados en este proyecto, fue necesario el análisis de las muestras obtenidas con determinado tratamiento, mediante geles de poliacrilamida-SDS al 12% de una dimensión, elaborados con una solución monomérica de 30% de acrilamida (%T) y 2.6% de bis-acrilamida (%C), con el sistema discontinuo de Laemmli [83].

La muestra se cuantificó por Bradford y en este caso se aplicó una concentración total de proteína de 30 µg. La muestra se preparó agregando una tercera parte del amortiguador de la muestra (125 µL Tris-HCl, 10 µL SDS al 10%, 100 µL glicerol, 0.5% de azul de bromofenol y 10% de mercaptoetanol, aforar a 1 ml), después la muestra fue calentada durante 5 minutos en agua hirviendo y finalmente se aplicó en el gel cuidadosamente.

Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis modelo QSV (IBI), en geles de 11 por 9 cm. La separación electroforética se llevó a cabo suministrando 10mA por gel, con corriente constante y con el amortiguador de corrida Tris-glicina. Cada gel se corrió hasta que el frente del azul de bromofenol se encontró en el extremo inferior.

14.5.1. Tinción

Los geles se trataron con la solución fijadora: 40% metanol y 10% ácido acético, durante toda la noche y en agitación constante. Posteriormente, para su tinción, el gel se colocó en la solución de azul de coomassie "blue silver" [93]: 10% ácido fosfórico, 10% sulfato de amonio, 0.12% coomassie G-250 y 20% metanol. Este proceso se llevó a cabo durante el día y en agitación constante. Finalmente el gel se destiñó con agua destilada. Los geles se escanearon en un escáner de uso comercial (EPSON, Perfection 1260).

14.6. Electroforesis bidimensional

El análisis proteómico de las muestras se hizo mediante electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE). Esta técnica comprende la primera dimensión y segunda dimensión.

14.6.1. Primera dimensión

La primera dimensión se llevó a cabo en el sistema de enfoque isoelectrico *Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare)*. Se usaron tiras de gradiente de pH inmovilizado (*IPG strips, Sigma Aldrich*). La longitud usada de las tiras fue de 7 y 13 cm, con un rango de pH 3-11. Básicamente la primera dimensión consiste en la rehidratación de la tira, la aplicación de la muestra y el isoelectroenfoco (IEF). Las tiras IPG deben ser rehidratadas antes del IEF. En este caso la muestra se incluyó en la solución de rehidratación para incluir la carga de la muestra durante el proceso de rehidratación. Las tiras de 7 cm se rehidrataron con 125 μ l de la solución amortiguadora de rehidratación (ver anexo 3) y 140 μ g de muestra. Las tiras de 13 cm se rehidrataron con 250 μ l de esta solución, con la diferencia de que se cargaron 200 μ g de muestra. Los anfólitos, el DTT y la muestra fueron aplicados justo antes de su uso. La rehidratación se llevó a cabo en la bandeja de rehidratación (*Amersham Bioscience*), a temperatura ambiente y durante toda la noche. La solución de rehidratación se colocó en uno de los canales de la bandeja y la tira IPG se colocó sobre la solución a manera de que hubiera contacto entre ambos. El carril se cubrió por completo con aceite mineral para minimizar la evaporación y evitar la cristalización de la urea. Después de la rehidratación, se procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El IEF se llevó a cabo en el sistema *Ettan IPGphor 3*, a una temperatura de 20°C. En el caso de las tiras de 7 cm el isoelectroenfoco se realizó acumulando un total de 5750 Vh, aplicando un máximo de 75 μ A por tira y con el protocolo de la tabla 2. Para el caso de las tiras de 13 cm el IEF se realizó acumulando 15500 Vh, aplicando un máximo de 75 μ A por tira y con el protocolo de la tabla 3.

Después del IEF las tiras fueron almacenadas a -80 °C, hasta su posterior uso en la segunda dimensión. Antes de la segunda dimensión, cada una de las tiras IPG fueron sometidas a un proceso de equilibrio. Este proceso consistió en dos pasos. El primero fue poner la tira durante 15 min, en el amortiguador de equilibrio con DTT y otros 15 min, en la misma solución de equilibrio pero con iodoacetamida (ver anexo 3). Todo el proceso de equilibrio se llevo a cabo en agitación constante.

14.6.2. Segunda dimensión

La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de gradiente de poliacrilamida-SDS de 4% a 20%. Los geles se prepararon con una solución monomérica de 30% de acrilamida (%T) y 2.6% de bis-acrilamida (%C). El gradiente de poliacrilamida se hizo con la ayuda de un formador de gradiente (*gradient maker*) de 50 ml. Por su parte los geles de poliacrilamida-SDS de una sola concentración de 12.5%, fueron preparados con la misma solución monomérica.

La segunda dimensión se llevó a cabo en dos cámaras verticales de electroforesis. Las tiras de 7 cm se corrieron en una cámara de electroforesis modelo *QSV (IBI)*, en geles de 11 por 9 cm. Las tiras de 13 cm se corrieron en una cámara de sistema dual *Owl P10DS (Thermo Scientific)* en geles de 20 por 20 cm. Las tiras IPG se colocaron horizontalmente sobre el gel de acrilamida y el sistema se selló con agarosa al 1% adicionada con 0.002% de azul de bromofenol. La separación electroforética se llevó a cabo suministrando 10 mA por gel, con corriente constante y con el amortiguador de corrida Tris-glicina pH 8.8. Cada gel se corrió hasta que el frente del azul de bromofenol se encontraba en el extremo inferior.

Tabla 2. Protocolo de corrida del IEF tiras 7 cm

Paso	Gradiente/Paso	Volts	Volts-hora (Vh)
1	Paso	300	200
2	Gradiente	1000	300
3	Gradiente	5000	4000
4	Gradiente	5000	1250

Tabla 3. Protocolo de corrida del IEF tiras 13 cm

Paso	Gradiente/Paso	Volts	Volts-hora (Vh)
1	Paso	500	500
2	Gradiente	1000	800
3	Gradiente	8000	11300
4	Gradiente	8000	2900

14.6.3. Tinción y digitalización

Una vez concluido el proceso electroforético, el gel fue tratado con la solución fijadora: 40% metanol y 10% ácido acético. Este proceso se llevó a cabo durante toda la noche y con agitación constante. Posteriormente, para su tinción, el gel se colocó en la solución de tinción, coomassie “*blue silver*” [93] (ver anexo 3). Este proceso se llevó a cabo durante el día y en agitación constante. Finalmente el gel se destiñó con agua destilada. Los geles fueron escaneados en el escáner *Typhoon trio (Amersham Biosciences)*. Se escaneó con el láser de excitación 633 nm (*Filter Red*) y el filtro de emisión 520 nm. El análisis computacional de los perfiles proteómicos se hizo mediante el uso del programa *PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad)*. El análisis de imagen consistió en la comparación del

grupo de geles control y tratados de cada uno de los experimentos. Se compararon los valores normalizados de cuantificación (intensidad total, que corresponde a la cantidad total de determinada mancha en el gel) de las manchas de cada miembro del experimento y se eligieron las que presentaron diferencias de mínimo 30% y que además presentaron un comportamiento de abundancia similar, aunque las diferencias fueran variables en cada uno de los miembros del experimento, es decir que su disminución o aumento de cantidad, con respecto al control, fue constante.

14.7. Escisión e identificación de proteínas

Las manchas de interés se removieron del gel cortándolas cuidadosamente. Cada una de las manchas cortadas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con solución fijadora y se guardaron a -80 °C hasta su posterior uso. El tratamiento posterior de las manchas se hizo en la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología (IBT, UNAM). A grandes rasgos el tratamiento consistió en la digestión enzimática “*in gel*” de la proteína contenida en la mancha, la extracción de los péptidos, desalado a través de *ZipTips*[®] (puntas de pipeta de 10 µL con una cama de medio de cromatográfico fijado en su extremo, para concentrar y purificar péptidos o proteínas antes de la espectrometría de masas) y análisis de espectrometría de masas por LC-MS/MS. Mediante la obtención del espectro de masas de los fragmentos (péptidos) de la proteína y su análisis en los bancos de datos, se obtuvo la identificación de las proteínas.

15. RESULTADOS

15.1. Purificación de la neurotoxina Cn2

15.1.1. Cromatografía de filtración en gel

El veneno del alacrán *Centruroides noxius* (500 mg) se fraccionó por cromatografía de filtración en gel, utilizando como fase estacionaria Sephadex G-50, como se detalla en la sección de materiales y métodos. De esta cromatografía se obtuvieron 3 fracciones: la fracción I (F-I) que contiene la actividad hialuronidasa, la fracción II (F-II) que es la mayor y la única fracción tóxica y la fracción III (F-III) que corresponde a los componentes moleculares de menos peso molecular (Fig. 10).

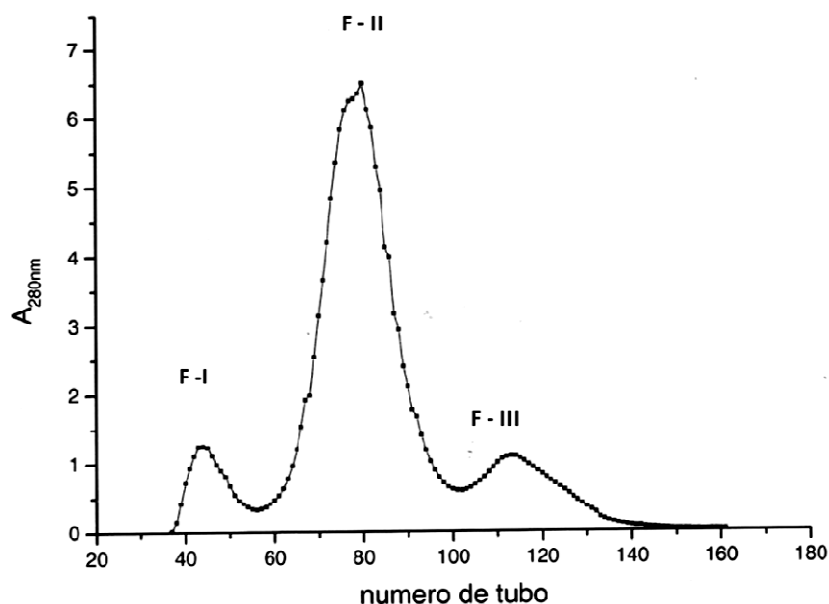


Figura 10. Cromatograma del veneno total de *C. noxius* separado por cromatografía de filtración en gel*.

*Fraccionamiento de 500 mg del veneno total de *C. noxius* mediante una cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-50 (ver materiales y métodos). Se obtuvieron tres fracciones FI, FII y FIII, de las cuales la F-II corresponde a la fracción que contiene la neurotoxina Cn2.

15.1.2. Cromatografía de intercambio iónico

La fracción II (F-II), que contiene las neurotoxinas, se separó en una columna de intercambio catiónico (carboximetil celulosa) a pH 4.7 con un gradiente salino de 0 a 0.5 M de NaCl. En esta separación se obtuvieron 14 fracciones, de las cuales la fracción 9, llamada FII-9, contiene a la toxina Cn2 (Fig. 11A). La fracción FII-9, se fraccionó en una columna de intercambio catiónico a pH 6.0 con un gradiente de NaCl de 0 a 0.38 M (Fig. 11B) y se lograron separar 4 componentes (F-II-9.1 – F-II-9.4). De estos, el componente

cromatográfico principal, F-II-9.2, que contiene a las toxinas Cn2 y Cn3, requiere de un paso adicional de separación por intercambio catiónico a pH 8.0, para poder tener ambas toxinas en forma homogénea (Fig. 11C). De esta separación se obtuvieron tres componentes (F-II-9.2.1 – F-II-9.2.3), de los cuales el componente II-9.2.2 corresponde a la neurotoxina Cn2.

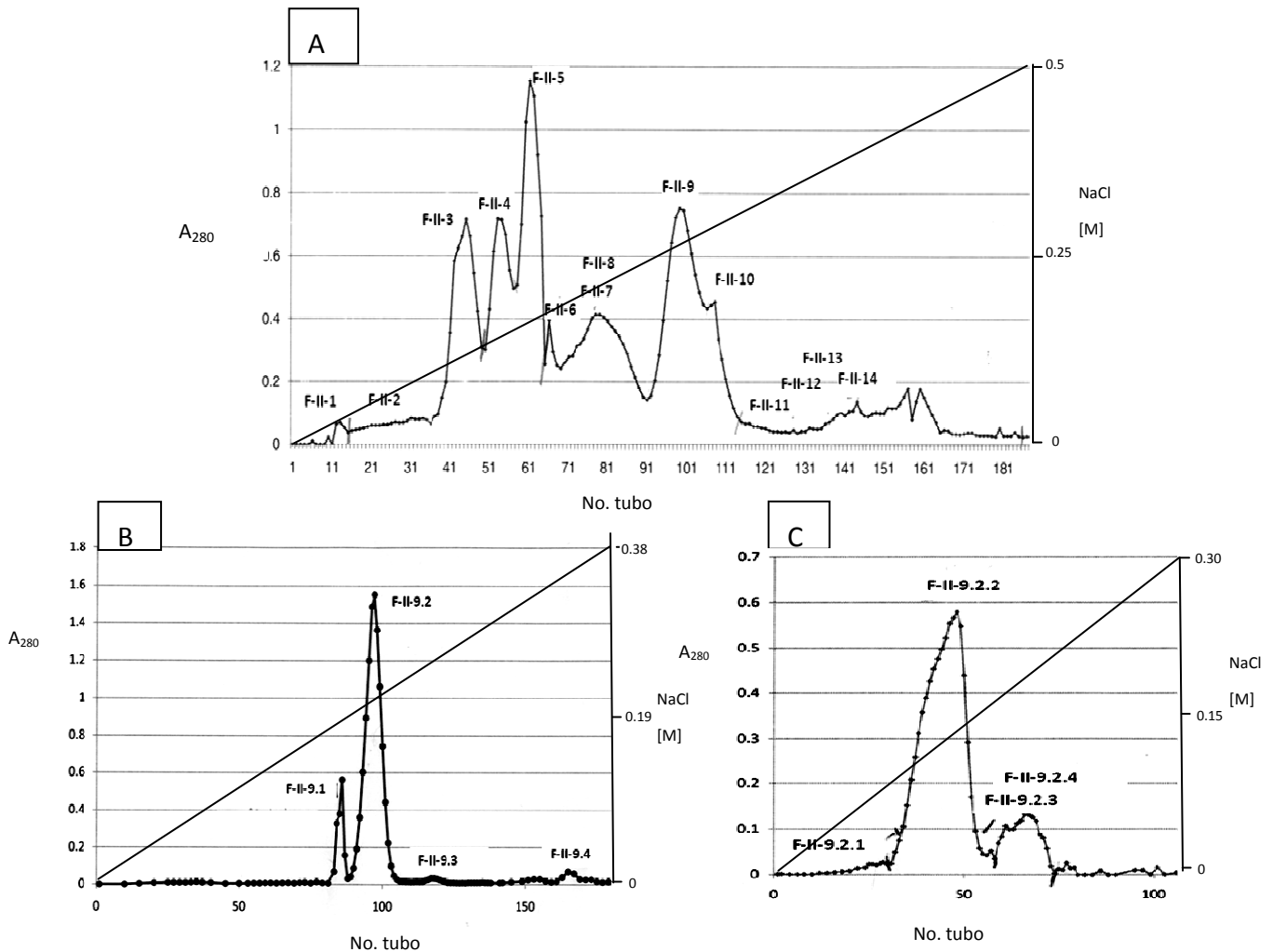


Figura 11. Cromatogramas de separación de las cromatografías de Intercambio Iónico*.

*A) Cromatograma de separación de la fracción F-II obtenido por cromatografía de intercambio iónico a pH 4.7. Se obtuvieron 14 componentes y la fracción F-II-9 contiene la Cn2. B) Cromatograma de separación de la F-II-9 por cromatografía de intercambio iónico a pH 6. Se obtuvieron 4 componentes, de los cuales la fracción F-II-9-2 contiene a la Cn2. C) Cromatograma de separación de la fracción F-II-9.2 obtenido por intercambio iónico a pH 8, se obtuvieron 4 componentes y la F-II-9.2.2 corresponde a la neurotoxina Cn2.

15.1.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Para asegurar la pureza de la Cn2, el componente F-II-9.2.2 separado en la cromatografía anterior, se sometió a una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna de fase reversa C18. La pureza de la toxina se confirmó por espectrometría de masas, obteniendo un componente de 7588 Da, correspondiente al peso molecular esperado para esta toxina.

En la tabla 4 se muestran las cantidades y porcentajes de las fracciones, que contienen a la toxina Cn2, obtenidas en cada paso cromatográfico

Tabla 4. Rendimiento de proteína durante cada uno de los pasos cromatográficos de la purificación de la Cn2

Columna	Componente proteico	Proteína obtenida (mg)	Proteína obtenida (%)
	Veneno Total	500	100
Sephadex G-50	F II	476	95.2
CM-C 32 (pH 4.7)	F II-9	33.68	6.736
CM-C 32 (pH 6)	F II-9.2	24.31	6.19
CM-C 32 (pH 8)	F II-9.2.2	12.72	2.54
HPLC	F II-9.2.2	12.296	2.46

15.2. Tratamiento del tejido

Para establecer la estrategia adecuada de extracción y limpieza de proteínas, se probaron diferentes soluciones, con diferentes concentraciones de detergente y diferentes agentes caotrópicos, así como diferentes métodos físicos de lisis celular como sonicación y maceración en frío y diferentes métodos de limpieza de la muestra. Esto con el fin de encontrar un método que nos permitiera obtener una mayor cantidad y calidad de proteínas para tener una buena resolución en los geles de doble dimensión.

Para la elección del mejor tratamiento de la muestra se tomó en cuenta la recuperación de proteína total (determinado por cuantificación de proteína por Bradford), el patrón de resolución y separación observado tanto en geles de una dimensión como en geles de doble dimensión de 12.5% de acrilamida con tiras IPG de 7 cm pH 3-11 (detalles en el anexo 1).

Finalmente, el tratamiento que nos brindó mejores resultados fue el amortiguador de lisis CHAPS al 4%, en conjunto con la precipitación con cloroformo-metanol y macerando en frío en conjunto con la sonicación. Este tratamiento fue uno con los que se obtuvo mayor cantidad de proteína, una mejor resolución de manchas y no requiere de excesiva manipulación de la muestra por lo que no resulta en riesgos de producir modificaciones en la muestra.

15.3. Análisis del perfil proteómico

Con el fin de obtener una primera aproximación del perfil proteómico, por medio de la 2D-PAGE, se analizaron los geles de DRG y cerebelo tratados con la Cn2. La primera dimensión se hizo con tiras de 7 cm y la segunda dimensión en geles de gradiente (4%-20%). Una vez digitalizados, se hizo el análisis cuantitativo de las manchas detectadas mediante el programa *PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad)*.

En cerebelo identificamos un total de 350 manchas, 17 de las cuales se observaron menos intensas y 20 con mayor intensidad en los geles correspondientes al tejido tratado en comparación a lo observado con el tejido control (Fig. 12). Respecto a los DRG (Fig. 13) se detectaron alrededor de 340 manchas, de las cuales 16 presentaron menor intensidad y 19 mayor intensidad en el tejido tratado. Seis de estas proteínas se analizaron por espectrometría de masas y se lograron identificar 4 que corresponden a la lectina, γ -sinucleína, α y β globina (Fig. 13)

Con este experimento se logró estandarizar y optimizar algunos aspectos de la metodología como: el tratamiento y limpieza de la muestra, la concentración de acrilamida necesaria en la segunda dimensión para lograr una buena separación de las proteínas, las condiciones de corrida de la electroforesis, el uso del *software* para el análisis digital de los geles y la escisión manual de las manchas.

15.3.1. Ganglios de la raíz dorsal

Para lograr una mejor resolución de los geles, el experimento de los DRG se repitió por triplicado, con tiras IPG de 13 cm y la segunda dimensión se hizo en geles con 12.5% de acrilamida, debido a que la distribución de las manchas, en los geles de gradiente de 4-20% acrilamida se concentró principalmente al centro del gel (ver anexo 2), por lo que no fue necesario el uso de gradiente para tener una buena resolución de proteínas.

En estas condiciones se detectaron alrededor de 470 manchas y 2 de ellas presentaron menor intensidad y otras 2 mayor intensidad de proteína en el tejido tratado con la toxina Cn2 (Fig. 14).

Con este experimento se estableció que el poder resolutivo de la doble dimensión mejoró considerablemente al aumentar el tamaño de los geles, debido a que la cantidad de manchas que pudimos identificar fue mayor a la que detectamos con geles más pequeños. El hecho de que en estos geles sólo detectamos 4 manchas con diferencias

cuantitativas, indicó que gran parte de las diferencias observadas en los geles de 7 cm entre el experimento control y tratado pudieron deberse a diversos factores como la heterogeneidad de la muestra y la variación entre los ratones usados, este asunto es abordado ampliamente en la discusión.

15.3.2. Cerebelo

El tejido cerebeloso de los ratones tratados y no tratados con la toxina se analizó siguiendo el mismo protocolo que con los DRG. Este experimento también se realizó por triplicado (Fig. 15). Observamos alrededor de 350 manchas, 5 de las cuales presentaron menor intensidad y 5 con mayor intensidad en el tejido tratado. Nueve de estas 10 manchas se pudieron identificar por MS y corresponden a la subunidad O de ATP sintasa, la hidroxil Coenzima A deshidrogenasa tipo II, el precursor de la acetil coenzima A acetiltransferasa, la dihidrolipoamida deshidrogenasa, la subunidad β de la succinil coenzima A sintetasa ATP específica, polipeptido de neurofilamento, la calreticulina, la subunidad α de la hemoglobina y la fosfoproteína nuclear acídica rica en leucina de la familia 32, miembro A (Fig. 15)

Con la idea de observar cambios más claros en la abundancia diferencial de proteínas, se realizó un nuevo experimento, aumentando la dosis de toxina inyectada a los ratones a 4 LD₅₀ y aumentando el tiempo transcurrido después de la inoculación de la toxina al sacrificio del animal a 25 minutos en vez de 15. De los animales así tratados se analizó el cerebelo. Este último experimento se hizo por duplicado y se detectaron alrededor de 340 manchas, de las cuales 4 manchas fueron menos intensas y 1 más intensa en el cerebelo de los ratones tratados con 2LD de Cn2, estos resultados se muestran en la figura 16.

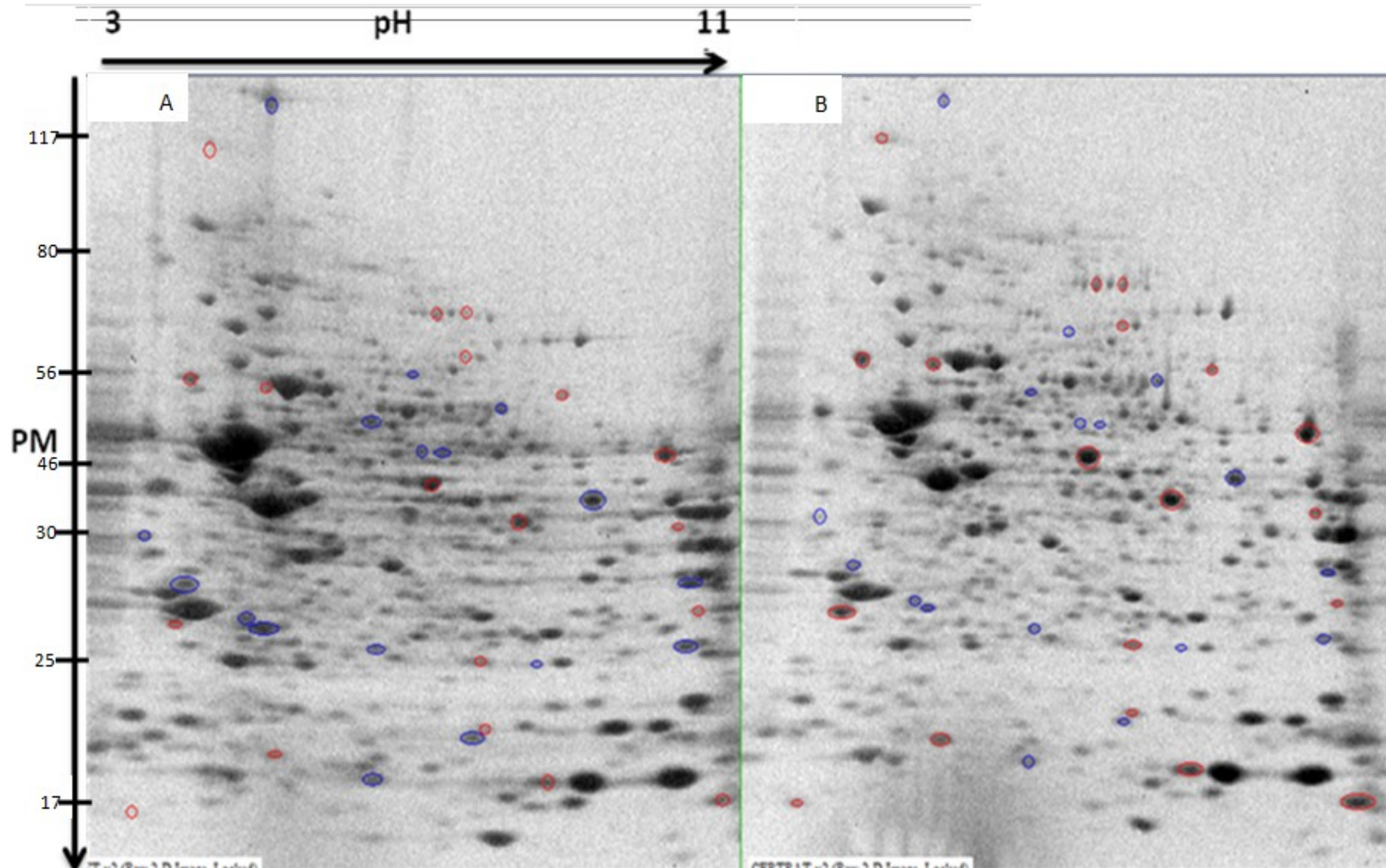


Figura 12. Gel bidimensional de gradiente del perfil proteómico cerebelo bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B)*

*A) Control B) Tratado. Gel de poliacrilamida de gradiente (4-20%), tiras de 7 cm (pH 3-11 NL). Círculos azules indican disminución en tratado y los rojos aumento en el tratado. Total 350 manchas, 17 menos intensas y 20 con mayor intensidad en tejido tratado.

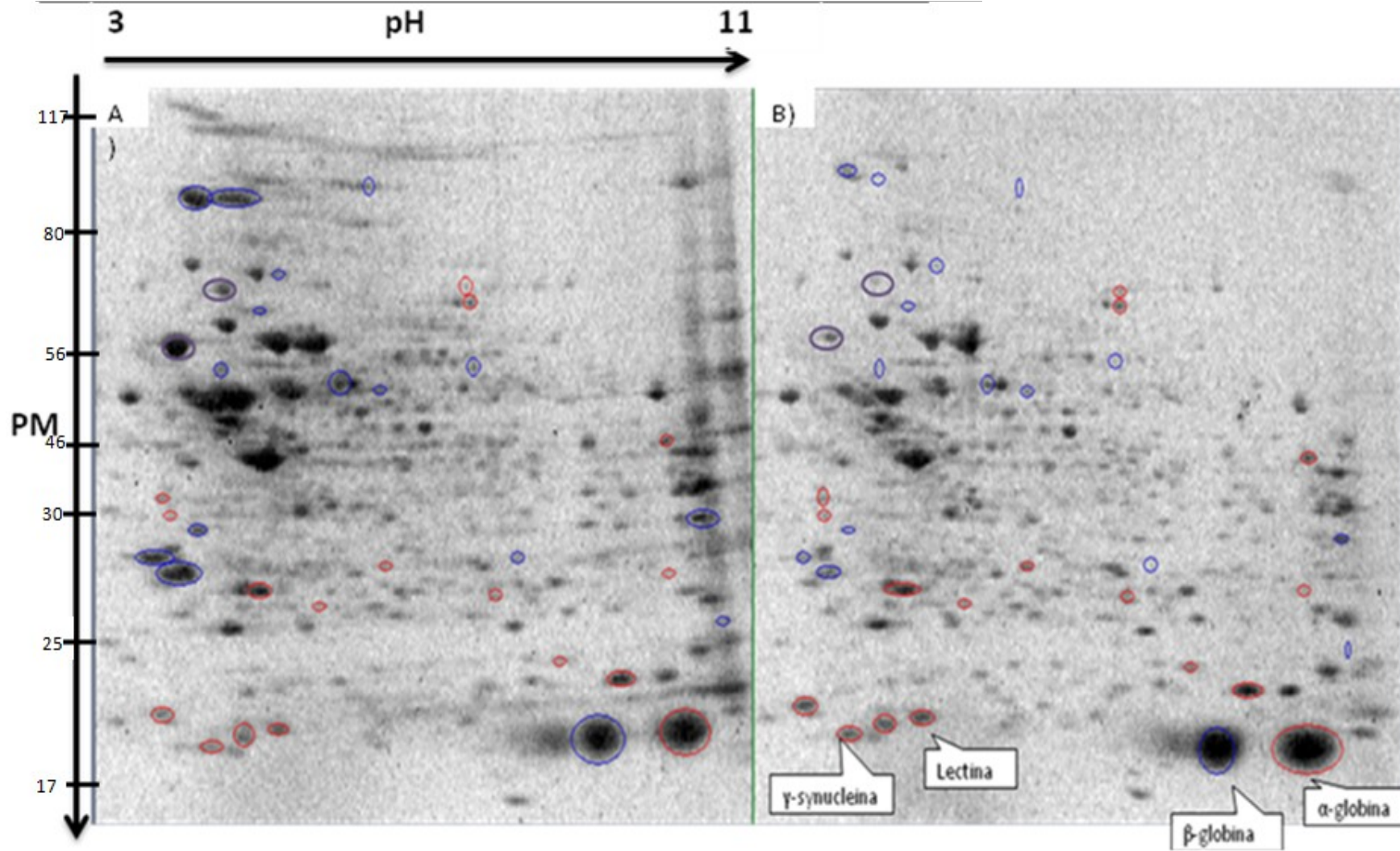


Figura 13. Gel bidimensional de gradiente del perfil proteómico de los DRG bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B)*

*A) Control B) Tratado. Gel de poliacrilamida de gradiente (4-20%), tiras de 7 cm (pH 3-11 NL). Círculos azules indican disminución en tratado y los rojos aumento en el tratado. Total 340 manchas, 16 menor intensidad y 19 mayor intensidad en el tejido tratado. Se señalan las manchas identificadas por MS

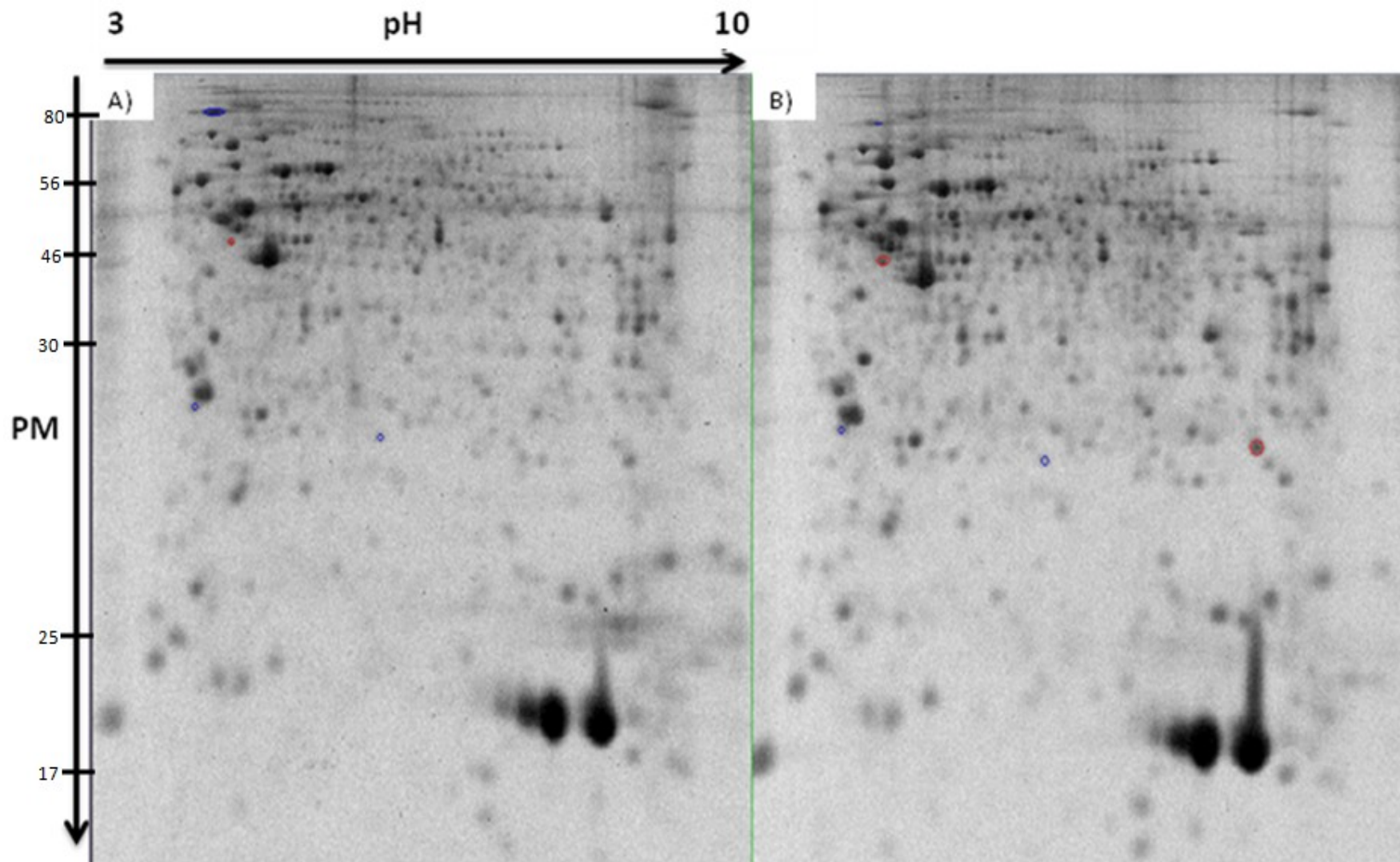


Figura 14. Gel Bidimensional del perfil proteómico de DRG bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B)*

*A) Control B) Tratado. Gel de poliacrilamida (12.5 %), tiras de 13 cm (pH 3-10 NL). Círculos azules indican disminución en tratado y los rojos aumento en el tratado. Total 470 manchas, 2 con menor intensidad y 2 con mayor intensidad en el tejido tratado

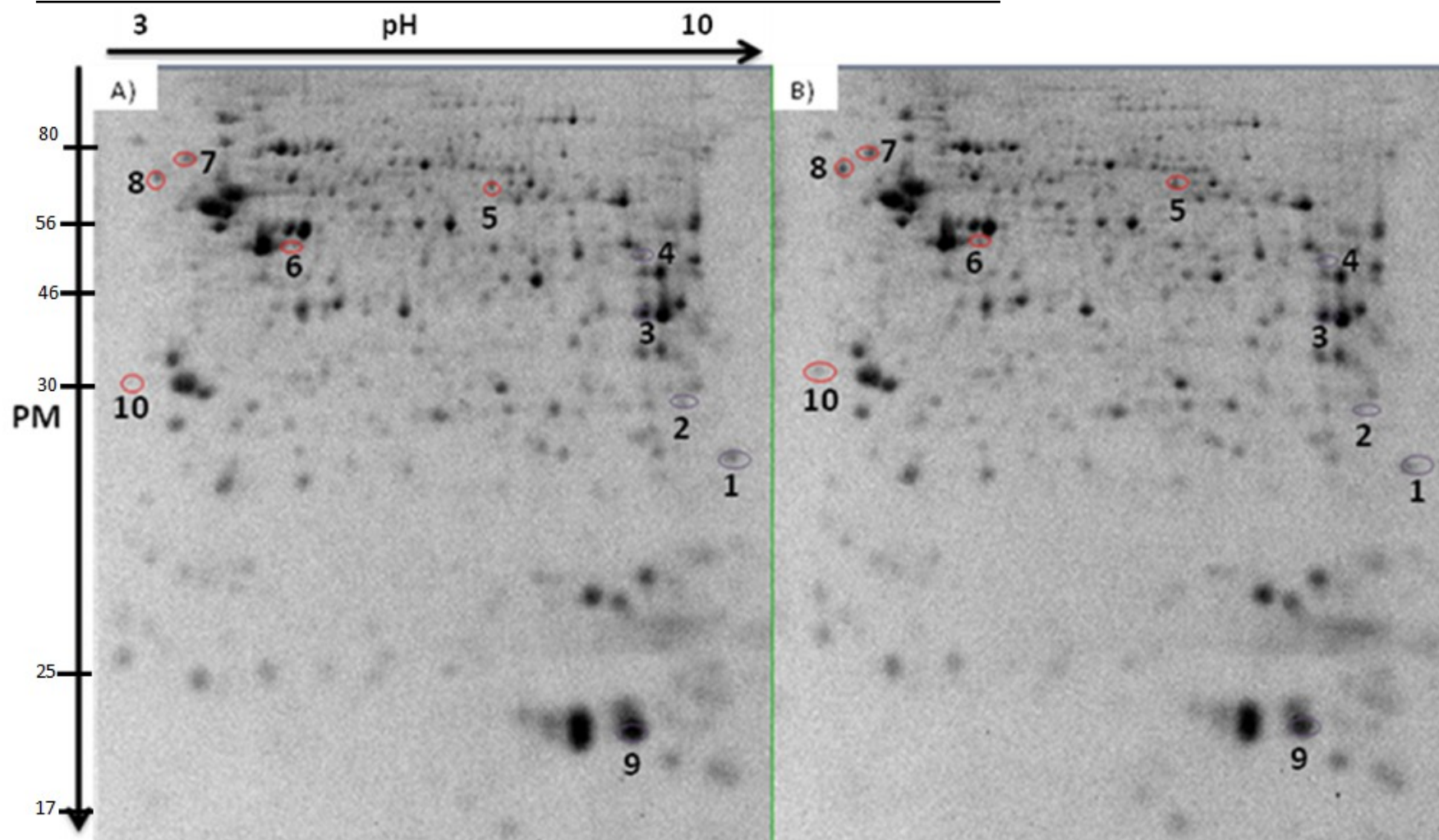


Figura 15. Gel Bidimensional de Cerebelo bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B)*

*A)Control B)Tratado. Gel de poliacrilamida (12.5%), tiras de 13 cm (pH 3-10 NL). Total 350 manchas, 5 menor intensidad (círculos azules) y 5 mayor intensidad (círculos rojos) en tejido tratado. Manchas identificadas por MS 1. Subunidad O de ATP sintasa. Hidroxiacil Coenzima A deshidrogenasa tipo II 3. No determinada 4. Precursor de la acetil coenzima A acetiltransferasa 5. Dihidrolipoamida deshidrogenasa 6. Subunidad β de la succinil coenzima A sintetasa ATP específica 7. Polipeptido de neurofilamento 8. Calreticulina 9. Subunidad α de la hemoglobina 10. Fosfoproteína nuclear acídica rica en leucina de la familia 32 miembro A.

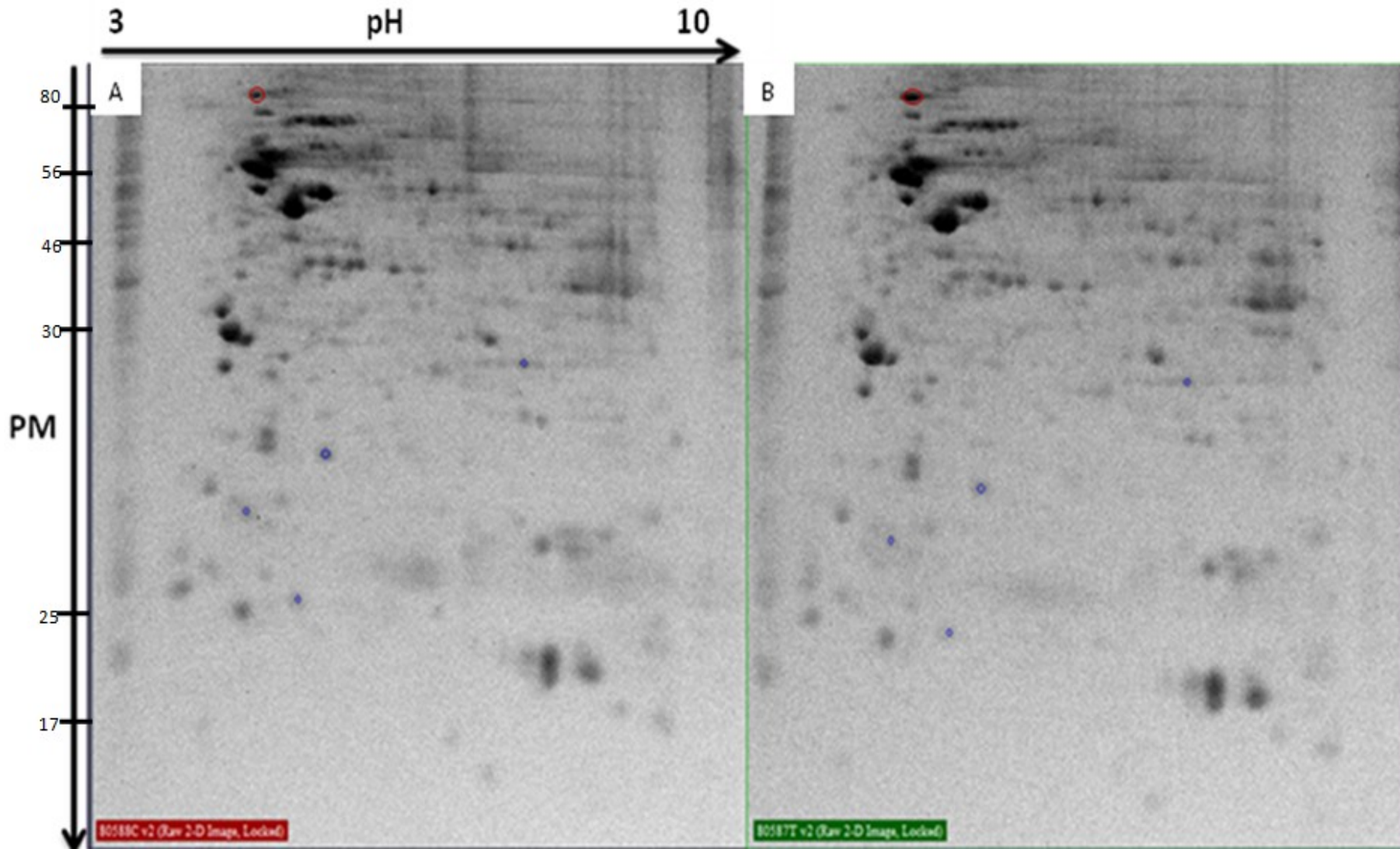


Figura 16. Gel bidimensional de Cerebelo bajo condiciones control (A) y bajo el efecto de la neurotoxina Cn2 (B) *

*A) Control B) Tratado. Gel de poliacrilamida (12.5 %), tiras de 13 cm (pH 3-10 NL). Círculos azules indican disminución en tratado y los rojos aumento en el tratado. Total 340 manchas, 4 menos intensas y 1 más intensa en el tratado.

15.4. Identificación de proteínas con diferencias de abundancia

15.4.1. Ganglios de la raíz dorsal

En el primer experimento realizado con los DRG (Fig. 13) se identificaron las proteínas: lectina, γ -sinucleína, α y β globina. Las tres primeras presentaron un aumento de intensidad y la β -globina pareciera disminuir en los ganglios de los ratones tratados con la toxina (Tabla 5).

Tabla 5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas con cambios cuantitativos en los DRG de ratones intoxicados con la toxina Cn2*

Proteína	Cobertura de secuencia*	Dirección de cambio*
Lectina	77%	↑
γ -sinucleína	77%	↑
α globina	15%	↑
β globina	58.5%	↓

*Flecha ↑ indica aumento en el tratado y ↓ disminución en el tratado. Los valores de cobertura de secuencia indican el porcentaje del número total de aminoácidos del péptido que corresponden a los aminoácidos de la proteína.

Las proteínas de unión a galactósidos, como las lectinas, generalmente son capaces de reconocer con alta especificidad estructuras glicosídicas presentes en la superficie de las células, característica funcional que las ubica como moléculas clave en eventos de reconocimiento celular. Las lectinas se han visto involucradas en fenómenos de inmunomodulación, adhesión celular, regulación del crecimiento, inflamación, embriogénesis, reproducción, metástasis y proliferación [94]. La γ -sinucleína es una proteína ampliamente expresada en el sistema nervioso periférico (neuronas primarias sensoriales, neuronas simpáticas y motoneuronas) [95]. La γ -sinucleína pertenece a la familia de sinucleínas, que incluye otros dos miembros: α -sinucleína y β -sinucleína. La γ -sinucleína está implicada en diferentes tipos de cáncer, algunas enfermedades neurodegenerativas y patologías oculares [96]. La β -globina y α -globina son polipéptidos que constituyen la hemoglobina (Hb), heterotetrámero de 2 β -globina y 2 α -globina con un grupo hemo unido a cada monómero. La interacción cooperativa entre estas subunidades permite la unión del oxígeno a este heterotetrámero (59). Actualmente se han reportado interesantes interacciones de la Hb con el óxido nítrico (NO). El NO reacciona con la desoxiHb y la oxiHb para formar nitrosilHb (HbNO) y metHb más nitrato, respectivamente. La Hb libre se ha presentado como un “barrendero” muy eficiente de NO [97].

En el segundo experimento (Fig. 14), detectamos que 2 de las proteínas se tiñeron con menor intensidad y otros 2 con mayor intensidad en los geles que contenían los tejidos tratados con Cn2 en comparación a los geles que contenían los tejidos control. Estas manchas no pudieron ser identificadas por MS.

15.4.2. Cerebelo

En cerebelo (Fig. 15), identificamos 5 manchas con menor cantidad en el tratado y 5 con mayor cantidad en el tratado. Nueve de estas manchas se pudieron identificar por MS (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas con cambios cuantitativos en el cerebelo de ratones intoxicados con la toxina Cn2*

No. mancha	Proteína	Cobertura de secuencia (%)	Dirección de cambio*
1	subunidad O de ATP sintasa	52	↓
2	Hidroxiacil Coenzima A deshidrogenasa tipo II (HAD)	24	↓
3	No determinada		↓
4	Precursor de la acetil coenzima A acetiltransferasa (tiolasa)	30.9	↓
5	Dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLD)	9	↑
6	Subunidad β de la succinil coenzima A sintetasa ATP específica (SCS-A)	17.9	↑
7	Polipéptido de neurofilamento	22.34	↑
8	Calreticulina	15.4	↑
9	Subunidad α de la hemoglobina	55.3	↑
10	Fosfoproteína nuclear ácida rica en leucina de la familia 32, miembro A	16.6	↓

*Flecha ↑ indica aumento en el tratado y ↓ disminución en el tratado. Los valores de cobertura indican el porcentaje del número total de aminoácidos del péptido que corresponden a los aminoácidos de la proteína.

La mancha numero uno se identificó como subunidad O de la ATP sintasa, proteína involucrada en la producción y conversión de energía. La subunidad O corresponde a la subunidad conferidora de sensibilidad a oligomicina (OSCP, *oligomycin sensitivity conferring protein*).

La HAD es una enzima participante de la tercera reacción de la β -oxidación de ácidos grasos. Se han detectado trastornos hereditarios con defecto en la β -oxidación de ácidos grasos. Estos pacientes presentan hematomegalia, cardiomegalia, encefalopatías, neuropatías periféricas, rabdiomiolisis y mioglobulinuria, lo cual sugiere un papel de las enzimas involucradas en la β -oxidación en el equilibrio metabólico de una serie de órganos. La HAD también actúa como alcohol deshidrogenasa, actividad que podría cooperar con la citotoxicidad de los péptidos amiloidogénicos presentes en pacientes con Alzheimer [98].

La acetil Coenzima A acetiltransferasa (tiolasa) es una enzima que cataliza la conversión de dos unidades de acetil-CoA en acetoacetil-CoA en la ruta del mevalonato.

La enzima dihidrolipoil deshidrogenasa (DLD) cataliza la reacción de oxidación del NADH a NAD^+ reduciendo al mismo tiempo la dihidroxilipoil-lisina unida a una proteína a lipoil-lisina. Esta enzima utiliza como cofactor el FAD. La proteína DLD es parte de diversos complejos enzimáticos. Estos complejos son esenciales para la ruptura de ciertas moléculas para producir energía. La DLD forma una subunidad conocida como E3. La deficiencia en DLD es causa de la acidosis láctica congénita infantil y de la enfermedad de orina con olor a jarabe de arce (*Maple Syrup Urine Disease*, MSUD). La alteración en el metabolismo energético, incluyendo la deficiencia de la DLD que da lugar a la disminución de actividades de las principales enzimas mitocondriales como el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDHC) y el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC), son característicos de muchos trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y Huntington [99].

La SCS-A participa en el ciclo de Krebs, para catalizar una fosforilación a nivel sustrato del ADP. La SCS-A también puede catalizar la reacción inversa para suministrar succinil-CoA para la síntesis del hemo y la activación de cuerpos cetónicos. En un estudio en pacientes con depleción de ADN mitocondrial y encefalomiopatía, se encontró la actividad de la SCS-A drásticamente disminuida, debido a una mutación deletérea en SUCLA2 (gen que codifica la subunidad β de la ligasa ADP-sintetasa formando succinil-CoA). En este caso el cerebro parece ser el tejido más vulnerable porque toda su actividad SCS se puede atribuir a la enzima SCS-A [100].

Los neurofilamentos se encuentran en grandes concentraciones en los tejidos neuronales, principalmente en los axones de las neuronas. Los neurofilamentos forman parte de las proteínas fibrosas que integran los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular y se ubican justo por debajo de la membrana citoplasmática. La función principal de los neurofilamentos es proveer el más rígido de los soportes citoesqueléticos de los axones, sus redes tridimensionales se extienden a las dendritas y al cuerpo neuronal.

La calreticulina es una proteína de unión a Ca^{2+} y una chaperona molecular en la luz del retículo endoplásmico (RE). El dominio C contiene 19 aminoácidos ácidos que tienen una alta capacidad de unirse a Ca^{2+} . La calreticulina afecta la capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} de la luz del RE, modula la función del receptor de inositol-3-fosfato (InsP3R), de la ATPasa transportadora de calcio (SERCA) y desempeña un papel en la señalización de Ca^{2+} mediada por la integrina. La homeostasis del Ca^{2+} en el RE y la señalización son mantenidas mediante el control de la liberación de Ca^{2+} del RE mediante el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3R). SERCA es responsable de la rápida de remoción de Ca^{2+} del citoplasma junto con ERp57 y calnexina. Las células derivadas de embriones deficientes en calreticulina presentan un deterioro en la capacidad del manejo de Ca^{2+} , un comprometido plegamiento de proteína y control de calidad. El Ca^{2+} almacenado en el RE y las vías de señalización dependientes de Ca^{2+} se ven significativamente afectados ante la ausencia de calreticulina. La calreticulina ha sido implicada en otras funciones celulares incluyendo la regulación de la expresión génica, la adhesión célula-célula y la cicatrización de heridas [101].

La fosfoproteína nuclear ácida rica en leucina de la familia 32, miembro A es una proteína multifuncional implicada en numerosos procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis dependiente e independiente de caspasas, supresor tumoral, inhibición de la fosfatasa 2A, en conjunto con ELAVL1 participa en la regulación del tráfico del RNAm, en la estabilidad e inhibición de la acetiltransferasa del complejo INHAT (inhibidor de la acetiltransferasa de histonas) y participa en la represión transcripcional mediada por E4F1.

16. DISCUSIÓN

El entendimiento claro y preciso del fenómeno de envenenamiento por la picadura de alacrán es indispensable para la toma de decisiones médicas con evidencia científica, que permitan la mejora del tratamiento de este importante problema de salud. El estudio de este fenómeno ha brindado un amplio conocimiento sobre el efecto de las neurotoxinas sobre canales iónicos, que son su principal blanco. Sin embargo poco se sabe de lo que acontece a nivel celular, después de la interacción de la neurotoxina con el canal iónico. Considerando que las proteínas son las principales efectoras de diversas actividades biológicas y que se encuentran en un estado de flujo dinámico debido a cambios o estímulos en su micro ambiente, el objetivo de este trabajo consistió en la búsqueda de modificaciones a nivel de abundancia proteica en ganglios de la raíz dorsal y cerebelo bajo el efecto de la neurotoxina Cn2, mediante la implementación de una metodología proteómica adecuada.

La técnica empleada en este trabajo fue la separación de proteínas por 2D-PAGE con IPGs, combinado con la identificación de proteínas por espectrometría de masas, estrategia empleada en la mayoría de los estudios proteómicos [73]. La 2D-PAGE es considerada una poderosa herramienta analítica para la caracterización de mezclas complejas de proteínas, debido a que consiste en la combinación de dos separaciones electroforéticas que permite la separación de proteínas en base a su carga y masa molecular [75].

Previamente fue necesario establecer una estrategia adecuada para la extracción y limpieza de las proteínas proveniente de los DRGs y cerebelo, que consistió en probar diferentes amortiguadores de lisis, mecanismos físicos de lisis celular y protocolos de limpieza del extracto de proteínas. El amortiguador de lisis elegido fue el de CHAPS 4%, debido a que fue uno con los que se obtuvo una mayor extracción de proteínas y el patrón de resolución de manchas en geles de poliacrilamida también resultó ser de los mejores. El amortiguador de CHAPS no tiene el peligro de introducir modificaciones en las proteínas que provoquen la heterogeneidad de carga como ocurre con amortiguadores que contienen urea [90], además el protocolo de extracción resulta simple y no involucra la manipulación excesiva de la muestra, lo cual ocurre con otros protocolos de extracción muy eficientes como TRIzol® [102]. En general el uso de CHAPS en este tipo de tratamiento ha resultado eficiente en la solubilización de proteínas y en la purificación de proteínas de membrana [103]. Los procedimientos mecánicos de ruptura celular como la sonicación [104] y la maceración del tejido congelado en N₂ [105], son técnicas altamente efectivas para la lisis celular debido a su simplicidad, bajo costo y rapidez [105]. Ambas técnicas físicas de lisis celular fueron usadas, incluso en conjunto, para asegurar la ruptura de la célula y la homogenización de la muestra. La limpieza de la muestra se llevó a cabo por la precipitación con cloroformo-metanol [90], técnica muy usada tanto para la separación de lípidos de membrana como de proteínas. La metodología establecida

permitió la detección de diferencias cuantitativas entre los perfiles de abundancia proteica de la muestra control y tratada tanto de DRG como de cerebelo.

En los DRG se identificaron proteínas como lectina, γ -sinucleína, α y β globina, que están implicadas en diferentes procesos celulares de inmunomodulación [94], transducción de señales [96] y en la interacción con mediadores químicos como NO [97], respectivamente. En este caso, observamos que entre los geles había variaciones que no se debían precisamente al cambio de abundancia proteica, debido a que estos cambios no eran reproducibles. Una de las principales razones pudo ser el encubrimiento de cambios por variaciones de diferente origen. Estas variaciones pudieron deberse a que se hizo un análisis de una muestra sumamente heterogénea. Diversos estudios sobre proteómica de los DRG, se han hecho analizando el proteoma de un sólo par de ganglios [46-48]. En el caso de este proyecto el análisis fue hecho del total de ganglios torácicos (12 pares de DRG), porque esta sección de ganglios se encuentran inervando importantes tejidos viscerales que responden a la toxina [43]. Es probable que al utilizar diferentes tipos de ganglios de raíz dorsal, se produjera una muestra sumamente heterogénea, cuyas variaciones propiciarán el encubrimiento de cambios específicos de abundancia de proteínas. Este problema podría resolverse analizando una muestra más homogénea de DRGs, tal y como se hizo en los estudios citados [46-48].

Otro punto importante a considerar, es que en este estudio empleamos varios ratones machos de la cepa CD1. Previamente hemos observado que los ratones presentan diferentes síntomas e incluso diferentes tiempos de reacción al efecto de las neurotoxinas, incluyendo la Cn2, lo cual indica la variación de individuo a individuo. Al juntar muestras de diferentes animales, se pudo dar lugar a variaciones importantes a nivel de proteína que podrían ser debidas a una diferencia de abundancia por el efecto de la toxina pero dada la diversidad de respuesta que podemos tener entre individuos, estas diferencias no se pudieron detectar en forma totalmente clara. Tomando en cuenta lo anterior, podría resultar mejor establecer el sacrificio de los animales de acuerdo a la sintomatología presentada después de la aplicación de la Cn2 y no a un tiempo definido y realizar cada gel con un sólo individuo.

Una de las principales fuentes de variabilidad durante la 2D-PAGE incluye el método de visualización [106, 107]. Usamos el denominado "*Blue Silver stain*", una tinción modificada del clásico Coomassie coloidal G-250 reportado por Neuhoff's [93]. Se ha reportado que presenta un límite de detección de hasta 1 ng de albúmina (BSA) [93]. Frecuentemente, con esta tinción, se produce un fondo fuerte e irregular y debido a que el color de la proteína unida al marcador es más intenso cuando no hay un fondo fuerte teñido del gel se producen variaciones entre las manchas provenientes de la tinción [106]. Esta técnica fue elegida porque presenta una gran reproducibilidad debido a que es insensible a muchos parámetros (como temperatura, tiempos, etc.) y ha sido usada eficientemente en análisis cuantitativos [86, 93]. Sería deseable que en futuros estudios se pruebe el uso de otros métodos de tinción como los colorantes fluorescentes debido a

que estos métodos resultan muy sensibles, tienen un amplio rango dinámico, una buena linealidad de detección y son fáciles de usar [78].

En cerebelo identificamos 5 manchas con menor cantidad en el tejido tratado (la subunidad O de la ATP sintasa, la HAD, la tiolasa y la fosfoproteína nuclear acídica rica en leucina) y 5 con mayor cantidad en el tratado (la DLD, la SCS-A, el polipéptido de neurofilamento, la calreticulina y la α -hemoglobina). Varias de estas proteínas, como HAD, tiolasa, DLD, SCS-A, participan en la producción y conversión de energía, debido a que intervienen en diferentes vías metabólicas como la síntesis de ATP, β -oxidación, oxidación de NADH, ciclo de Krebs y otros. Al considerar la función de estas proteínas, es probable que el cerebelo sufra diversas modificaciones metabólicas que involucran diferentes intermediarios energéticos. Otros procesos como la regulación de calcio, el plegamiento de proteínas y regulación transcripcional pudieran verse afectadas puesto que la calreticulina y la fosfoproteína nuclear acídica rica en leucina de la familia 32, miembro A participan en estos eventos.

En general, para este trabajo, también es importante considerar que el umbral para la aceptación de una variación significativa es un factor de 2.0 [108], es decir sólo las manchas cuya cantidad en el gel B sea al menos dos veces la correspondiente al gel A, se aceptará como un cambio significativo (variación del 100%). Las 10 manchas analizadas en cerebelo no cumplían con este requisito. Una de las razones que pudo dar lugar a esto, fue que los cambios ocurridos en las condiciones estudiadas, son muy pequeños o en tipos celulares específicos. Si ese fuera el caso la estrategia experimental con la que se trabajó no sería adecuada para identificar estos pequeños cambios, debido a la alta variación requerida para la aceptación de un cambio significativo. Una de las alternativas que podría resolver este problema es el uso de la electroforesis diferencial en gel (DIGE). Básicamente el principio es el mismo que la 2D-PAGE pero incluye el marcaje diferencial con fluoróforos de las muestras proteicas antes de la electroforesis. Los fluoróforos poseen espectros de emisión y excitación diferentes, lo que permite mezclar las muestras y correrlas en el mismo gel. El gel puede ser escaneado a diferentes longitudes de onda y de esta manera se puede identificar el perfil proteómico de cada muestra [109]. Con la comigración de ambas muestras, se elimina la variación de la posición y abundancia proteica de las manchas [77]. Otra ventaja de esta técnica es la aplicación de un estándar interno, que es una mezcla de todas las muestra, está marcado con un tercer fluoróforo y es corrido en todos los geles de un experimento. El estándar interno se usa para la normalización de los datos entre los geles, lo cual minimiza aún más la variación experimental e incrementa la confianza en el “*matching*” y la cuantificación en diferentes geles [77]. Con estas modificaciones las variaciones gel a gel, en su mayoría, se reducen, permitiendo que se acepte un cambio significativo hasta de un 20% de variación.

Otro aspecto a considerar es la posible presencia de cambios en proteínas poco abundantes. Se estima que una célula eucariota contiene de 10 000 – 30 000 proteínas diferentes y la mayoría de proteínas identificadas son proteínas “*housekeeping*” que están presentes de 10^5 - 10^6 copias por célula [77]. Las proteínas poco abundantes están

representadas por pocas copias por célula, son de gran importancia fisiológica y han sido asociadas a diferentes enfermedades, blancos para drogas, receptores y en varias funciones celulares regulatorias [77, 110, 111]. Es posible que las principales diferencias significativas que están ocurriendo a nivel proteico por efecto de la neurotoxina Cn2, se encuentren precisamente entre estas proteínas de baja abundancia. Resultaría muy difícil detectar proteínas poco abundantes mediante el protocolo de 2D-PAGE aplicada en este trabajo [81], por tal razón en estudios posteriores se deben considerar alternativas que ayuden al análisis de este tipo de proteínas. Actualmente se considera que el prefraccionamiento de la muestra ayuda a reducir su complejidad y enriquecer las proteínas de bajo número de copias. Esto se puede lograr aislando compartimentos celulares y/u organelos mediante diferentes técnicas como centrifugación de gradiente de sacarosa, precipitación selectiva de cierta clase de proteínas (precipitación TCA/acetona para proteínas ribosomales), *fluorescence activated cell sorting* (FACS) para aislar ciertos tipos celulares de un tejido, con procedimientos de extracción secuencial incrementando amortiguadores solubilizadores poderosos (como amortiguadores acuosos, solventes orgánicos) y mediante métodos cromatográficos [77, 81]. El análisis de la muestra mediante geles *ultrazoom* también ayuda a la separación de proteínas poco abundantes y mejora la resolución disminuyendo el patrón de proteínas desde la primera dimensión. Consiste en el uso de tiras IPG que cubren una serie estrecha de pI o bien que se sobrelapan (por ejemplo IPGs de 4-5, 4.5-5.5, 5-6, 5.5-6.7) [77, 81]. El uso de geles *ultrazoom* en conjunto con el prefraccionamiento de la muestra podría resultar efectiva para lograr una excelente resolución en especial de proteínas poco abundantes, además también podrían ayudar a mejorar la visualización de posibles cambios a nivel de modificaciones postraduccionales (PTMs).

La actividad proteica no sólo es controlada por la biosíntesis y degradación de proteínas sino también por PTMs, las cuales modulan interacciones moleculares, localización proteica, estabilidad y estado de actividad. Varias de estas modificaciones han sido asociadas a enfermedades como cáncer, diabetes, síndrome metabólico y numerosos desórdenes neurológicos [112]. Se han identificado más de 300 modificaciones postraduccionales, que en general son eventos de procesamiento covalente que cambian las propiedades de una proteína mediante la ruptura proteolítica o por la adición de un grupo modificador a uno o más aminoácidos [112, 113]. Resulta factible pensar que muchos de los cambios que ocurren a nivel proteómico por efecto de la Cn2, provocan diversas modificaciones postraduccionales que influyen un gran número de respuestas celulares. La electroforesis bidimensional puede resolver estas modificaciones postraduccionales, debido a que modificaciones como la fosforilación cambia la carga y la masa de la proteína, que generalmente es indicado por una estela horizontal de manchas en el gel [113]. Incluso hay muchos métodos para el estudio de PTMs que se basan en el uso de sondas selectivas y específicas para la detección de proteínas intactas modificadas en el gel, como la tinción fluorescente específica para fosfoproteínas con *Pro-Q Diamond* o para glicoproteínas con *Pro-Q Emerald* [112], sin embargo la modificación de proteínas *in vivo* ocurre sólo en una pequeña fracción de la proteína total (menos del 1%) [114].

Generalmente la muestra es una mezcla muy heterogénea de varias proteínas modificadas y no modificadas [113, 114], por consiguiente la pequeña cantidad de proteína modificada puede ser encubierta por la comigración con proteínas más abundantes. Estrategias como el prefraccionamiento de la muestra y el análisis de geles ultrazoom pueden resultar en el enriquecimiento de las proteínas de interés y en el aumento resolutivo del perfil proteómico de la muestra, respectivamente.

El objetivo de conocer la respuesta celular ocasionada por la acción de los componentes tóxicos del veneno de alacrán, es una tarea que implica un reto metodológico y analítico. Este trabajo consistió en un primer intento, a nivel proteómico, de la investigación de esta respuesta celular, en el que se logró implementar la metodología necesaria para continuar con el análisis de cambios cuantitativos en el proteoma de tejidos de ratones intoxicados con toxinas de alacrán y además permitió definir nuevas perspectivas para el avance del análisis de las respuestas celulares específicas a la intoxicación del ratón con la toxina Cn2

17. CONCLUSIONES

El presente trabajo es el resultado de un primer estudio exploratorio, cuyo principal objetivo es lograr la identificación de modificaciones de abundancia proteica relacionadas con el efecto de la Cn2 mediante la 2D-PAGE y concluimos que:

- Mediante un proceso de optimización de la estrategia experimental, se determinó que la extracción y limpieza del extracto proteico proveniente de los tejidos analizados, resultó mejor con el tratamiento del amortiguador de lisis CHAPS 4% en conjunto con la sonicación, la maceración del tejido congelado y la precipitación con cloroformo-metanol.
- El uso y análisis de geles de gradiente, permitió determinar que geles con una concentración final de 12.5% de acrilamida y de 20 por 20 cm (tiras IPG 13 cm) son adecuados para este tipo de estudio.
- La metodología empleada permitió la detección de manchas con diferencias de intensidad, que fueron identificadas por MS, de los ganglios de la raíz dorsal y cerebelo. Es probable que estas proteínas pudieran tener una función importante en los mecanismos moleculares de respuesta celular al efecto de la neurotoxina Cn2.
- El análisis de los geles bidimensionales de los DRGs, indicó una gran cantidad de variaciones entre los geles, que limitó la determinación de manchas con diferencias en su abundancia. Las causas pudieron ser el uso de muestras muy heterogéneas

proveniente de los ganglios torácicos y la variación de la respuesta a la neurotoxinas Cn2 entre los ratones usados.

- Los cambios cuantitativos observados en cerebelo, están por debajo del límite requerido para la determinación de una variación estadísticamente significativa en la 2D-PAGE. Esto puede deberse a que los cambios de abundancia proteica inducidos por el tratamiento dado son muy pequeños, o bien que los cambios que están ocurriendo involucren proteínas poco abundantes o modificaciones postraduccionales.
- El establecimiento de nuevas modificaciones metodológicas, consideradas en la discusión, permitirán optimizar la identificación de cambios significativos en la abundancia proteica de tejidos tratados con la Cn2

18. PERSPECTIVAS

El futuro desarrollo de este proyecto requerirá importantes adecuaciones de la metodología seguida para:

- Eliminar variaciones en geles:
 - Disminuir heterogeneidad de la muestra disminuyendo los tipos de ganglios analizados. Esto incluso puede también ser aplicado para el cerebelo, analizando partes más específicas.
 - Estandarizar el sacrificio de los animales de acuerdo a la sintomatología presentada
 - Implementar el uso del DIGE (Electroforesis diferencial en gel)
- Lograr la detección de proteínas poco abundantes y modificaciones postraduccionales mediante el:
 - Prefraccionamiento de la muestra
 - Análisis mediante geles ultrazoom

19. LITERATURA CITADA

1. Celis, A., Gaxiola-Robles, R. y Sevilla-Godínez, E. , *Tendencia de la mortalidad por picaduras de alacrán en México, 1979–2003*. Rev. Panam. Salud Publica, 2007. **6**: p. 373–380.
2. Gueron, M., Ilia, R. y Margulis, G., *Arthropod poisons and the cardiovascular system*. Am J Emerg Med, 2000. **18**(6): p. 708-14.
3. Ismail, M., *The scorpion envenoming syndrome*. Toxicon, 1995. **33**(7): p. 825-58.
4. Petricevich, V.L., *Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2004. **3**(3): p. 325-32.
5. Murthy, K.R., *The scorpion envenoming syndrome: a different perspective. The physiological basis of the role of insulin in scorpion envenoming*. Journal of Venomous Animals and Toxins, 2000. **6**: p. 04-51.
6. Dehesa-Davila, M., y Possani, L. D., *Scorpionism and serotherapy in Mexico*. Toxicon, 1994. **32**(9): p. 1015-8.
7. Mahadevan, S., *Scorpion sting*. Indian Pediatr, 2000. **37**(5): p. 504-14.
8. Petricevich, V.L., *Scorpion venom and the inflammatory response*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 903295.
9. Gadwalkar, S.R., Bushan, S., Pramod, K., Gouda, C. y Kumar, P. M., *Bilateral cerebellar infarction: a rare complication of scorpion sting*. J Assoc Physicians India, 2006. **54**: p. 581-3.
10. Romero, N.O., y Hernández, T. J. M., *Cerebral edema associated to scorpion sting: a two-case sting report*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2005. **11**: p. 594-600.
11. Andrade, M.V., Caramenz, M. P., Abreu, E. M., Dolnikoff, M., Omar, E. D., Velasco, I. T., y Cunha-Melo, J. R., *Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid-base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004. **138**(1): p. 97-104.
12. Gwee, M.C., Nirthanam, S., Khoo, H. E., Gopalakrishnakone, P., Kini, R. M., y Cheah, L. S., *Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(9): p. 795-801.
13. Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., y Tytgat, J., *Scorpion toxins specific for Na⁺ channels*. European Journal of Biochemistry, 1999. **264**(2): p. 287-300.
14. de la Vega, R.R.C., y Possani, L. D., *Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution*. Toxicon, 2005. **46**(8): p. 831-44.

15. Espino-Solis, G.P., Riano-Umbarila, L., Becerril, B., y Possani, L. D., *Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives*. J Proteomics, 2009. **72**(2): p. 183-99.
16. Krifi, M.N., Savin, S., Debray, M., Bon, C., El Ayeb, M. y Choumet, V., *Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy*. Toxicon, 2005. **45**(2): p. 187-98.
17. Sevcik, C., D'Suze, G., Diaz, P., Salazar, V., Hidalgo, C., Azpurua, H., y Bracho, N., *Modelling Tityus scorpion venom and antivenom pharmacokinetics. Evidence of active immunoglobulin G's F(ab')₂ extrusion mechanism from blood to tissues*. Toxicon, 2004. **44**(7): p. 731-41.
18. Revelo, M.P., Bambilra, E. A., Ferreira, A. P., Diniz, C. R., y Chavez-Olortegui, C., *Body distribution of Tityus serrulatus scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom*. Toxicon, 1996. **34**(10): p. 1119-25.
19. Chowell, G., Diaz-Duenas, P., Bustos-Saldana, R., Mireles, A. A., y Fet, V., *Epidemiological and clinical characteristics of scorpionism in Colima, Mexico (2000-2001)*. Toxicon, 2006. **47**(7): p. 753-8.
20. Catterall, W.A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., y Scheuer, T., *Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 124-41.
21. Licea, A.F., Becerril, B., y Possani, L. D., *Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion Centruroides noxius Hoffmann*. Toxicon, 1996. **34**(8): p. 843-7.
22. Karp, G., *Potenciales de membrana e impulsos nerviosos*, in *Biología celular y moléculas: conceptos y experimentos*, M. Hill, Editor. 2005: Colombia. p. 177-182.
23. Soderlund, D.M., *Sodium Channels*, in *Comprehensive molecular insect science*, K.I. L. I. Gilbert, and S. S. Gill, Editor. 2005, Elsevier B.V.: Amsterdam. p. 1-24.
24. Catterall, W.A., *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **26**(1): p. 13-25.
25. de la Vega, R.C.R., y Possani, L.D., *Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 171-180.
26. Pintar, A., Possani, L. D., y Delepierre, M., *Solution structure of toxin 2 from centruroides noxius Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels*. J Mol Biol, 1999. **287**(2): p. 359-67.
27. Garcia, C., Calderon-Aranda, E. S., Anguiano, G. A., Becerril, B., y Possani, L. D., *Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of Centruroides noxius Hoffmann*. Toxicon, 2003. **41**(4): p. 417-27.

28. Schiavon, E., Sacco, T., Cassulini, R. R., Gurrola, G., Tempia, F., Possani, L. D., y Wanke, E., *Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons.* J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20326-37.
29. Cummins, T.R., Sheets, P. L., y Waxman, S. G., *The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain.* Pain, 2007. **131**(3): p. 243-57.
30. Candenás, L., Seda, M., Noheda, P., Buschmann, H., Cintado, C. G., Martín, J. D. y Pinto, F. M., *Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha and beta subunit mRNAs in human tissues.* Eur J Pharmacol, 2006. **541**(1-2): p. 9-16.
31. Novakovic, S.D., Eglén, R. M., y Hunter, J. C., *Regulation of Na⁺ channel distribution in the nervous system.* Trends Neurosci, 2001. **24**(8): p. 473-8.
32. Teixeira, A.L., Fontoura, B. F., Freire-Maia, L., Machado, C. R., Camargos, E. R., y Teixeira, M. M., *Evidence for a direct action of Tityus serrulatus scorpion venom on the cardiac muscle.* Toxicon, 2001. **39**(5): p. 703-9.
33. Meki, A.R., Mohamed, Z. M., y Mohey El-deen, H. M., *Significance of assessment of serum cardiac troponin I and interleukin-8 in scorpion envenomed children.* Toxicon, 2003. **41**(2): p. 129-37.
34. De Matos, I.M., Rocha, O. A., Leite, R., y Freire-Maia, L., *Lung oedema induced by Tityus serrulatus scorpion venom in the rat.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1997. **118**(2): p. 143-148.
35. Mazzei de Dávila, C.A., Dávila, D.F., Donis, J. H., de Bellabarba, G. Arata, Villarreal, V., y Barboza, J. S., *Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation.* Toxicon, 2002. **40**(9): p. 1339-1346.
36. Andrade, M.V., Lisboa, F. A., Portugal, A. L., Arantes, R. M., y Cunha-Melo, J. R., *Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines.* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007. **146**(4): p. 581-7.
37. Andrade, M.V., Souza, D. G., de, A. Castro M. S., Cunha-Melo, J. R., y Teixeira, M. M., *Evidence for a role of capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung oedema induced by Tityus serrulatus venom in rats.* Toxicon, 2002. **40**(3): p. 283-7.
38. De-Matos, I.M., Talvani, A., Rocha, O. O., Freire-Maia, L., y Teixeira, M. M., *Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by Tityus serrulatus venom in rats.* Toxicon, 2001. **39**(6): p. 863-7.
39. Petricevich, V.L., Reynaud, E., Cruz, A. H., y Possani, L. D., *Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from Tityus serrulatus.* Clin Exp Immunol, 2008. **154**(3): p. 415-23.

40. Petricevich, V.L., Hernandez Cruz, A., Coronas, F. I., y Possani, L. D., *Toxin gamma from Tityus serrulatus scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages*. *Toxicon*, 2007. **50**(5): p. 666-75.
41. Petricevich, V.L., *Balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in mice treated with Centruroides noxius scorpion venom*. *Mediators Inflamm*, 2006. **2006**(6): p. 54273.
42. Carpenter, R.H.S., *Neurofisiología*. 2 ed. Vol. 1. 1998, México: Manual Moderno. 340.
43. Nógrádi, A., y Vrbová, G., *Anatomy and Physiology of the Spinal Cord*, M.C.B. Database, Editor. 2006, Landes Bioscience: Austin (TX).
44. Murray, M., *Organization of spinal cord*, in *Neuroscience in medicine*, C. Michael, Editor. 2003, Humana Press: New Jersey. p. 197-211.
45. Li, Q., Zhao, X., Zhong, L. J., Yang, H. Y., Wang, Q., y Pu, X. P., *Effects of chronic morphine treatment on protein expression in rat dorsal root ganglia*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **612**(1-3): p. 21-8.
46. Fujisawa, H., Ohtani-Kaneko, R., Naiki, M., Okada, T., Masuko, K., Yudoh, K., Suematsu, N., Okamoto, K., Nishioka, K., y Kato, T., *Involvement of post-translational modification of neuronal plasticity-related proteins in hyperalgesia revealed by a proteomic analysis*. *Proteomics*, 2008. **8**(8): p. 1706-19.
47. Zhang, Y., Wang, Y. H., Zhang, X. H., Ge, H. Y., Arendt-Nielsen, L., Shao, J. M., y Yue, S. W., *Proteomic analysis of differential proteins related to the neuropathic pain and neuroprotection in the dorsal root ganglion following its chronic compression in rats*. *Exp Brain Res*, 2008. **189**(2): p. 199-209.
48. Komori, N., Takemori, N., Kim, H. K., Singh, A., Hwang, S. H., Foreman, R. D., Chung, K., Chung, J. M., y Matsumoto, H., *Proteomics study of neuropathic and nonneuropathic dorsal root ganglia: altered protein regulation following segmental spinal nerve ligation injury*. *Physiol Genomics*, 2007. **29**(2): p. 215-30.
49. Falqueto, E.B., Massensini, A. R., Moraes-Santos, T., Gomez, M. V., y Romano-Silva, M. A., *Modulation of Na⁺-channels by neurotoxins produces different effects on [3H]ACh release with mobilization of distinct Ca²⁺-channels*. *Cell Mol Neurobiol*, 2002. **22**(5-6): p. 819-26.
50. Sitges, M., Possani, L. D., y Bayon, A., *Characterization of the actions of toxins II-9.2.2 and II-10 from the venom of the scorpion Centruroides noxius on transmitter release from mouse brain synaptosomes*. *J Neurochem*, 1987. **48**(6): p. 1745-52.
51. Mechaly, I., Scamps, F., Chabbert, C., Sans, A., y Valmier, J., *Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha subunits expressed in neuronal and non-neuronal excitable cells*. *Neuroscience*, 2005. **130**(2): p. 389-96.

52. Maier, S.K., Westenbroek, R. E., Schenkman, K. A., Feigl, E. O., Scheuer, T., y Catterall, W. A., *An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 4073-8.
53. Armour, J.A., *The little brain on the heart*. Cleve Clin J Med, 2007. **74**(1): p. S48-51.
54. Huang, M.H., Horackova, M., Negoescu, R.M., Wolf, S., y Armour, J.A., *Polysensory response characteristics of dorsal root ganglion neurones that may serve sensory functions during myocardial ischaemia*. Cardiovascular Research, 1996. **32**(3): p. 503-515.
55. Guo, Z., Yao, T. P., Wang, J. P., y Ding, J. Y., *Acute myocardial ischemia up-regulates nociceptin/orphanin FQ in dorsal root ganglion and spinal cord of rats*. Neurosci Lett, 2008. **433**(3): p. 274-8.
56. Guo, Z., Niu, Y. L., Zhang, J. W., y Yao, T. P., *Coronary artery occlusion alters expression of substance P and its mRNA in spinal dorsal horn in rats*. Neuroscience, 2007. **145**(2): p. 669-675.
57. Glickstein, M., y Doron, K., *Cerebellum: connections and functions*. Cerebellum, 2008. **7**(4): p. 589-94.
58. Manto, M., *The cerebellum, cerebellar disorders, and cerebellar research--two centuries of discoveries*. Cerebellum, 2008. **7**(4): p. 505-16.
59. Saab, C.Y., y Willis, W. D., *The cerebellum: organization, functions and its role in nociception*. Brain Res Brain Res Rev, 2003. **42**(1): p. 85-95.
60. Schaller, K.L., y Caldwell, J. H., *Expression and distribution of voltage-gated sodium channels in the cerebellum*. Cerebellum, 2003. **2**(1): p. 2-9.
61. West, R., J., y Gelderd, J. B., *The cerebellum*, in *Neuroscience in medicine*, C. Michael, Editor. 2003, Humana Press: New Jersey. p. 225.
62. Escobar, A.y.G., G. B., *Barrera hematoencefálica: neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo*. Rev Mex Neuroci, 2008. **9**(5): p. 395-405.
63. Clot-Faybesse, O., Guieu, R., Rochat, H., y Devaux, C., *Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels*. Life Sci, 2000. **66**(3): p. 185-92.
64. Jain, M.K., Indurkar, M., Kastwar, V., y Malviya, S., *Myocarditis and multiple cerebral and cerebellar infarction following scorpion sting*. J Assoc Physicians India, 2006. **54**: p. 491-2.
65. Sengupta, S., Dhanapal, P., Ravindran, R. D., y Devi, N., *Cerebral blindness after scorpion sting*. J Neuroophthalmol, 2009. **29**(2): p. 154-5.

66. Xu, F., y Frazier, D. T., *Role of the cerebellar deep nuclei in respiratory modulation*. *Cerebellum*, 2002. **1**(1): p. 35-40.
67. Nisimaru, N., *Cardiovascular modules in the cerebellum*. *Jpn J Physiol*, 2004. **54**(5): p. 431-48.
68. Alexander-Kaufman, K., Harper, C., Wilce, P., y Matsumoto, I., *Cerebellar vermis proteome of chronic alcoholic individuals*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2007. **31**(8): p. 1286-96.
69. McClatchy, D.B., Liao, L., Park, S. K., Venable, J. D., y Yates, J. R., *Quantification of the synaptosomal proteome of the rat cerebellum during post-natal development*. *Genome Res*, 2007. **17**(9): p. 1378-88.
70. Colombo, G., Rusconi, F., Rubino, T., Cattaneo, A., Martegani, E., Parolaro, D., Bachi, A., y Zippel, R., *Transcriptomic and proteomic analyses of mouse cerebellum reveals alterations in RasGRF1 expression following in vivo chronic treatment with delta 9-tetrahydrocannabinol*. *J Mol Neurosci*, 2009. **37**(2): p. 111-22.
71. Becker, M., Nothwang, H. G., y Friauf, E., *Different protein profiles in inferior colliculus and cerebellum: a comparative proteomic study*. *Neuroscience*, 2008. **154**(1): p. 233-44.
72. Lu, A., Wisniewski, J. R., y Mann, M., *Comparative proteomic profiling of membrane proteins in rat cerebellum, spinal cord, and sciatic nerve*. *J Proteome Res*, 2009. **8**(5): p. 2418-25.
73. Blackstock, W.P., y Weir, M. P., *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*. *Trends Biotechnol*, 1999. **17**(3): p. 121-7.
74. Fey, S.J., y Larsen, P.M., *2D or not 2D*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001. **5**(1): p. 26-33.
75. Adams, L.D., y Gallagher, S. R., *Two-dimensional gel electrophoresis*. *Curr Protoc Immunol*, 2005. **Chapter 8**: p. Unit 8 5.
76. Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., y Weiss, W., *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(6): p. 1037-53.
77. Gorg, A., Weiss, W., y Dunn, M. J., *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. *Proteomics*, 2004. **4**(12): p. 3665-85.
78. Gorg, A.y.W.W., *Protein profile comparison of microorganisms, cells and tissues using 2D gels*, in *Proteome Analysis: interpreting the genome*, D.W. Speicher, Editor. 2004, Elsevier: Filadelfia. p. 374.
79. Friedman, D.B., Hoving, S., y Westermeier, R., *Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis*. *Methods Enzymol*, 2009. **463**: p. 515-40.

80. Rabilloud, T., y Chevallet, M., *Solubilization of proteins in two dimensional electrophoresis*, in *Proteome Research: Two dimensional gel electrophoresis and identification methods*, T. Rabilloud, Editor. 2000, Springer: Nueva York. p. 9-27.
81. Lopez, J.L., *Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **849**(1-2): p. 190-202.
82. Stryer L., B.J.M., y Tymoczko J.L. , *Investigación en proteínas*, in *Bioquímica*. 1995, Reverté: Barcelona, España. p. 77-116.
83. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
84. Rabilloud, T., y Charmont, S., *Detection of proteins in two-dimensional electrophoresis gels*, in *Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*, T. Rabilloud, Editor. 2000, Springer: Nueva York. p. 107-126.
85. Miller, I., J. Crawford, and E. Gianazza, *Protein stains for proteomic applications: which, when, why?* Proteomics, 2006. **6**(20): p. 5385-408.
86. Miller, I., Crawford, J., y Gianazza, E., *Protein stains for proteomic applications: which, when, why?* Proteomics, 2006. **6**(20): p. 5385-408.
87. Dave, G., y Lauri, H., *2-D Electrophoresis for proteomics. A Method and Products Manual*, Bio-Rad, Editor. 2004, Bio-Rad Laboratories.
88. Nordhoff, E., Egelhofer, V., Giavalisco, P., Eickhoff, H., Horn, M., Przewieslik, T., Theiss, D., Schneider, U., Lehrach, H., y Gobom, J., *Large-gel two-dimensional electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: an analytical challenge for studying complex protein mixtures*. Electrophoresis, 2001. **22**(14): p. 2844-55.
89. Possani, L., Steinmetz, W. E., Dent, M. A., Alagon, A. C., y Wuthrich, K., *Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions*. Biochim Biophys Acta, 1981. **669**(2): p. 183-92.
90. Wessel, D., y Flugge, U. I., *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem, 1984. **138**(1): p. 141-3.
91. Jiang, L., He, L., y Fountoulakis, M., *Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis*. J Chromatogr A, 2004. **1023**(2): p. 317-20.
92. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

93. Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., y Righetti, P. G., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1327-33.
94. Rabinovich, G.A., y Rubinstein, N., , *Galectinas: una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune*. Medicina (B Aires), 2001. **61**: p. 85-92.
95. George, J.M., *The synucleins*. Genome Biol, 2002. **3**(1): p. Reviews 3002.
96. Surguchov, A., *Molecular and cellular biology of synucleins*. Int Rev Cell Mol Biol, 2008. **270**: p. 225-317.
97. Peñuela, O.A., *Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador*. Colombia Médica, 2005. **36**(6): p. 215-225.
98. Yan, S.D., Shi, Y., Zhu, A., Fu, J., Zhu, H., Zhu, Y., Gibson, L., Stern, E., Collison, K., Al-Mohanna, F., Ogawa, S., Roher, A., Clarke, S. G., y Stern, D. M., *Role of ERAB/L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase type II activity in Abeta-induced cytotoxicity*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2145-56.
99. Klivenyi, P., Starkov, A. A., Calingasan, N. Y., Gardian, G., Browne, S. E., Yang, L., Bubber, P., Gibson, G. E., Patel, M. S., y Beal, M. F., *Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity*. J Neurochem, 2004. **88**(6): p. 1352-60.
100. Elpeleg, O., Miller, C., Hershkovitz, E., Bitner-Glindzicz, M., Bondi-Rubinstein, G., Rahman, S., Pagnamenta, A., Eshhar, S., y Saada, A., *Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(6): p. 1081-6.
101. Lee, D., y Michalak, M., *Membrane associated Ca²⁺ buffers in the heart*. BMB Rep. **43**(3): p. 151-7.
102. Man, T.K., Li, Y., Dang, T. A., Shen, J., Perlaky, L., y Lau, C. C., *Optimising the use of TRIzol-extracted proteins in surface enhanced laser desorption/ ionization (SELDI) analysis*. Proteome Sci, 2006. **4**: p. 3.
103. Henningsen, R., Gale, B. L., Straub, K. M., y DeNagel, D. C., *Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. Proteomics, 2002. **2**(11): p. 1479-88.
104. Harris, E.L.V., y Angal, S. , *Protein purification methods: a practical approach*. The practical approach series. 1989, Michigan: IRL press. 317.

105. Butt, R.H., y Coorsen, J. R., *Pre-extraction Sample Handling by Automated Frozen Disruption Significantly Improves Subsequent Proteomic Analyses*. Journal of Proteome Research, 2005. **5**(2): p. 437-448.
106. Schroder, S., Zhang, H., Yeung, E. S., Jansch, L., Zabel, C., y Watzig, H., *Quantitative gel electrophoresis: sources of variation*. J Proteome Res, 2008. **7**(3): p. 1226-34.
107. Zhou, S., Bailey, M.J., Dunn, M.J., Preedy, V.R., y Emery, P.W., *A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure*. Proteomics, 2005. **5**(11): p. 2739-2747.
108. Stessl, M., Noe, C. R., y Lachmann, B., *Influence of image-analysis software on quantitation of two-dimensional gel electrophoresis data*. Electrophoresis, 2009. **30**(2): p. 325-8.
109. Westermeier, R., y Scheibe, B., *Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging*. Methods Mol Biol, 2008. **424**: p. 73-85.
110. Ahmed, N., y Rice, G. E., *Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **815**(1-2): p. 39-50.
111. Volker, B., Ulrike, S., Kurt, B., y Albrecht, O., *Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Electrophoresis, 2001. **22**(14): p. 2856-2864.
112. Jensen, O.N., *Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry*. Curr Opin Chem Biol, 2004. **8**(1): p. 33-41.
113. Mann, M., y Jensen, O. N., *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 255-61.
114. Seo, J., y Lee, K. J., *Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches*. J Biochem Mol Biol, 2004. **37**(1): p. 35-44.

ANEXO

1. *Tratamiento de la muestra: detalles de la estandarización*

Para el tratamiento de la muestra se probaron diferentes amortiguadores de lisis celular, diferentes métodos físicos de lisis celular y diferentes métodos de limpieza de la muestra, con el fin de elegir el que presentara una mejor solubilización y mayor concentración de proteína recuperada. Los amortiguadores de lisis probados fueron **1)** CHAPS-Urea-Tiourea, **2)** CHAPS-Urea, **3)** TRIZOL®, **4)** Tritón, **5)** CHAPS 2%, **6)** CHAPS 4% Urea-Tiourea, **7)** CHAPS 4% Urea y **8)** CHAPS 4% (ver sección 14.3).

La determinación del mejor amortiguador de lisis se hizo mediante la cuantificación de proteína total obtenida (por el método de Bradford), así como análisis del perfil proteómico en geles de una y doble dimensión. Los primeros 4 tratamientos fueron analizados en geles de una dimensión. Detectamos que la presencia de bandas fue muy similar en todos y de igual intensidad. Sin embargo en el patrón de bandas del tratamiento con TRIZOL® se resolvieron una mayor cantidad de bandas de alto peso molecular (Fig. 17).

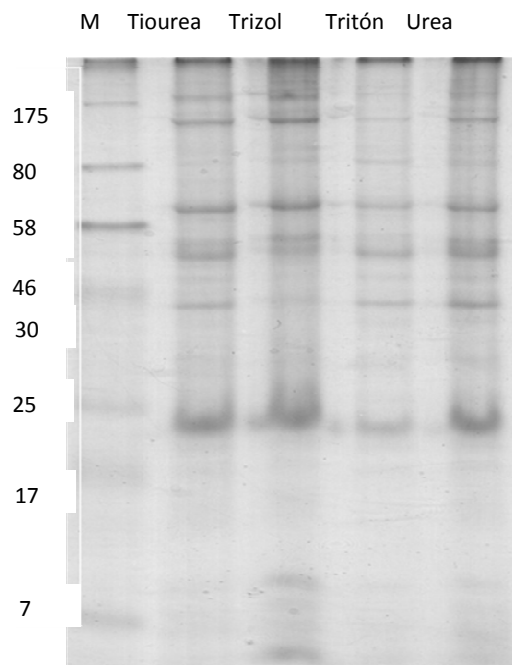


Figura 17. Gel unidimensional de poliacrilamida-SDS al 12% de 4 diferentes amortiguadores de lisis celular*

*En el primer carril está el marcador de peso molecular, en el segundo la muestra tratada con el tratamiento CHAPS Urea-Tiourea, en el tercero con TRIZOL®, el cuarto con tritón y el quinto con CHAPS-Urea. El patrón de bandas fue similar en todos pero en el tratamiento con TRIZOL® se resolvieron algunas bandas de bajo peso molecular que no visualizamos con el resto de los tratamientos.

Después de estos resultados, se examinó el perfil proteómico en geles bidimensionales. Para esta parte del experimento se eligieron dos amortiguadores de lisis el de TRIzol®, ya que en el experimento anterior resultó eficiente (Fig. 17) y un amortiguador de lisis CHAPS 2%. Este último se eligió por que, con este tratamiento se recuperó una cantidad similar de proteína a la obtenida con los otros amortiguadores de lisis (Tabla 7). Además de que el tratamiento con CHAPS 2% resultó ser mucho menos laborioso que el de TRIzol® y no corre riesgos de provocar la formación de modificaciones en las proteínas, como ocurre con los tratamientos que contienen urea. Asimismo, en este mismo experimento se probaron dos métodos de limpieza para la muestra la precipitación con cloroformo-metanol y el paquete comercial *2D clean-up* (GE Healthcare).

Tabla 7. Cuantificación de proteína obtenida con diferentes amortiguadores de lisis a partir de 20 ganglios

Amortiguador de lisis celular	Proteína (µg)
Urea-Tiourea	98
TRIzol®	60
Tritón	48
Urea	86
CHAPS 2% (limpieza con <i>2D clean-up</i> , (GE Healthcare))	86
CHAPS 2% (precipitación con cloroformo-metanol)	96.6

Los geles bidimensionales se hicieron con tiras IPG de 7 cm y con una concentración de acrilamida de 12.5%. Mediante el análisis de los geles observamos que el tratamiento de CHAPS 2%, en combinación con la precipitación con cloroformo-metanol, resultó en una mayor resolución de manchas (Fig. 18)

Continuando con la etapa de optimización de la lisis celular y limpieza de la muestra, se probaron los amortiguadores de lisis CHAPS 4% Urea-Tiourea, CHAPS 4% Urea y CHAPS 4%. En combinación con estos amortiguadores, el rompimiento celular se favoreció con la maceración del tejido congelado en nitrógeno líquido (N₂). Asimismo se probó la limpieza de la muestra con el paquete comercial *2D clean-up* y la precipitación con cloroformo-metanol. Este último experimento fue evaluado únicamente con la cuantificación de proteína obtenida con cada uno de los tratamientos (Tabla 8). De estos tratamientos se eligió el de CHAPS al 4% en conjunto con la precipitación con cloroformo-metanol y macerando en frío ya que fue uno de los tratamientos con el que se obtuvo mayor cantidad de proteína, no es laborioso ya que no requiere de excesiva manipulación de la muestra y no resulta en ningún riesgo de producir modificaciones de la muestra.

Identificación de eventos moleculares asociados a la intoxicación con la toxina Cn2 mediante electroforesis bidimensional

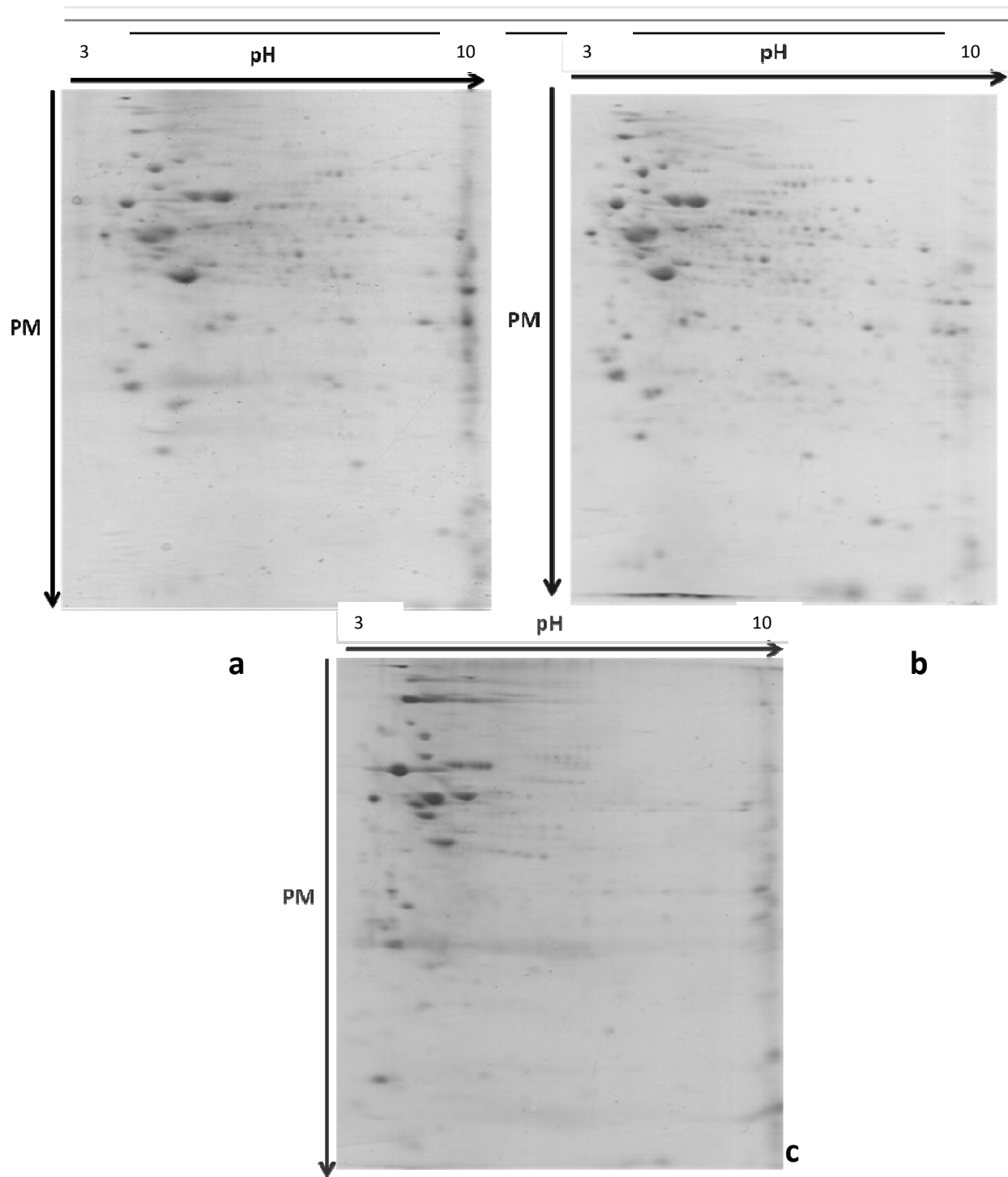


Figura 18. Geles Bidimensionales (tiras de 7 cm) de las muestras tratadas con 2 diferentes amortiguadores de lisis y dos diferentes técnicas de limpieza*

*A) Tratamiento CHAPS 2% y limpieza con *2D clean-up*. B) Tratamiento con lisis CHAPS 2% y limpieza con precipitación con cloroformo-metanol. C) tratamiento con TRIzol® y limpieza con precipitación con cloroformo-metanol. El tratamiento de la figura B resultó en una mayor cantidad de manchas resueltas.

Tabla 8. Cuantificación de proteína obtenida con diferentes amortiguadores de lisis a partir de 15 ganglios*

Tratamiento	µg de proteína obtenida (precipitación cloroformo –metanol)	µg de proteína obtenida (2D cleanup)
CHAPS 4% Urea-Tiourea	42	53
CHAPS 4% Urea	28	38
CHAPS 4%	62	38

*Obtención de proteína con los amortiguadores CHAPS 4% Urea-Tiourea, CHAPS 4% Urea y CHAPS 4%. El rompimiento celular se favoreció con la maceración del tejido congelado en nitrógeno líquido (N₂) y se probó la limpieza de la muestra con el paquete comercial *2D clean-up* y la precipitación con cloroformo-metanol. De acuerdo a la cantidad de proteína recuperada el mejor tratamiento resultó ser CHAPS 4%.

2. Geles de gradiente de DRG y cerebelo

Con el fin de obtener una primera aproximación del perfil proteómico, por medio de la 2D-PAGE, se analizaron los geles de DRG y cerebelo tratados con la Cn2 en geles con tiras de 7 cm y un gradiente de 4%-20% de acrilamida (ver sección 15.4). Sin embargo la distribución de las manchas, en los geles de gradiente se concentró principalmente al centro del gel (Fig. 19) por lo que se optó por geles de una sola concentración (12.5%, ver sección 15.4.1.)

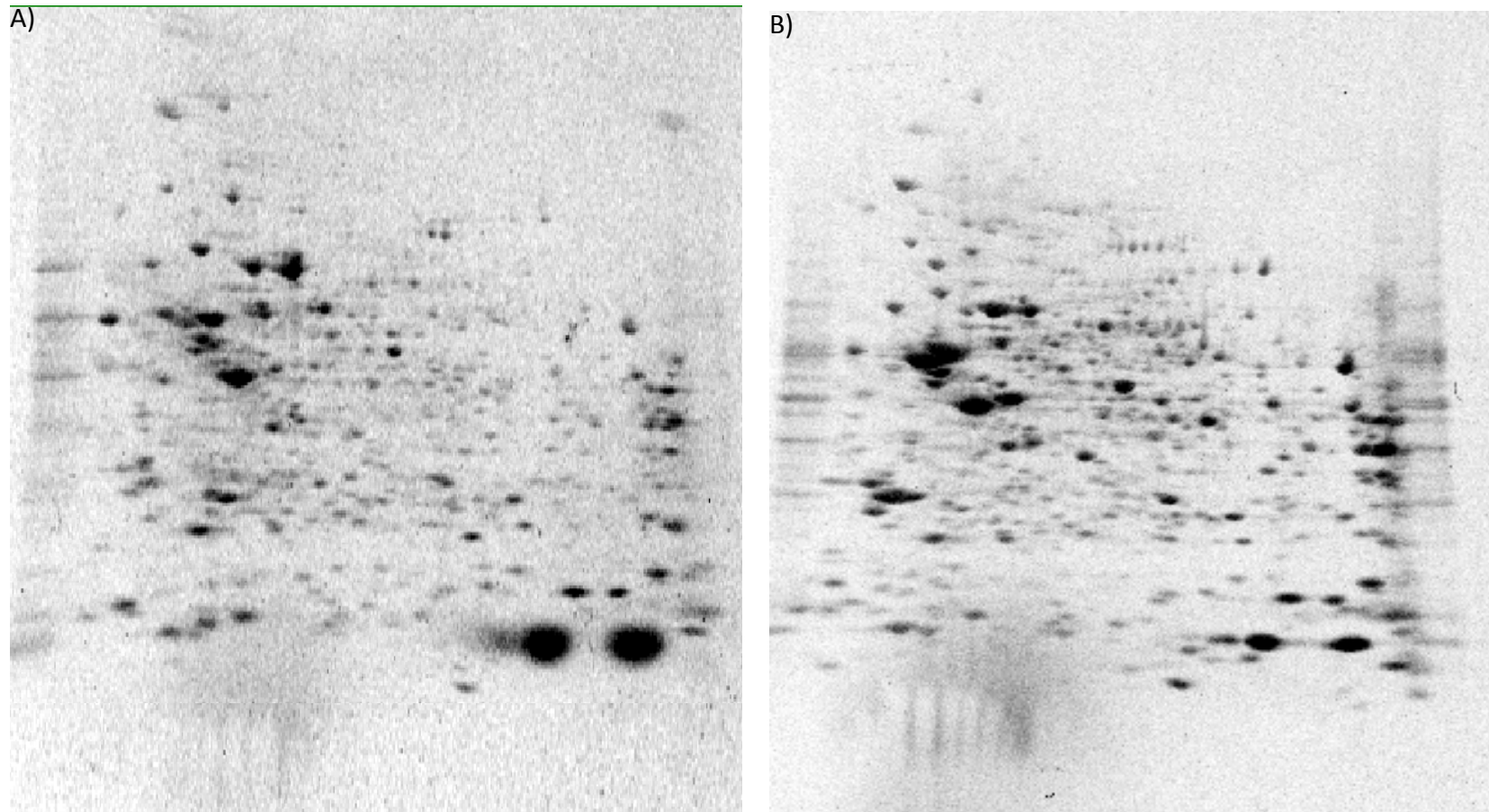


Figura 19. Geles de gradiente (4-20%) de los tejidos A) DRG y B) cerebelo tratados con la toxina Cn2*

*En este gel mostramos que la distribución del patrón de proteínas se agrupa hacia el centro del gel, quedando así la parte superior e inferior del gel prácticamente vacía, lo cual indicó que no era necesario el gel de gradiente y por el contrario, la resolución del patrón de manchas podría mejorarse al elegir geles de una sola concentración. Con esta observación se optó por geles de 12.5% de acrilamida.

3. *Materiales*

Agitador: 2100A (LW scientific)

Bomba peristáltica: MiniPump (LDC/Milton Roy)

Bolsas de diálisis: 3 M con límite de exclusión de 3500 Da (Espectrapor).

Cámara de electroforesis: QSV (IBI)

Cámara de electroforesis: sistema dual Owl P10DS (Thermo Scientific)

Carboximetil-celulosa (CM-32): Whatman

Colector de fracciones: modelo 7000 ultraporac (LKB/BROMMA)

Columna fase reversa C-18: Vydac

Centrífuga: 5418 (Eppendorf)

Detector: Uvicord 2138 (LKB/BROMMA)

Escáner comercial: Perfection 1260 (EPSON)

Escáner: Typhoon Trio (Amersham Biosciences)

Espectrofotómetro: Du-50 (Beckman)

Fuente de poder: 1420 (ISCO)

Graficador: 2210 Recorder (LKB/BROMMA)

Formador de gradiente: SG50 (Hoeffer)

HPLC: Waters

Inhibidores de proteasas: Compleat® (Roche)

Inhibidores fosfatasa: PhosSTOP® (Roche)

Paquete comercial de limpieza de proteína: 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare)

Papel filtro de 150 mm: Whatman

pH-metro: PHM82 (Radiometer Copenhagen)

Pinzas de micro disección: Número 5/45, Catálogo RS-5005 (Roboz)

Sephadex G-50 medio: Pharmacia, Biotech

Sistema de isoelectroenfoque: Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare)

Sistema de análisis de imagen: PDQuest (Bio-Rad)

Tiras IPG: tiras de gradiente de pH inmovilizado 7 y 13 cm (Sigma Aldrich)

Vortex: Super-Mixer No. 1290 (Lab-Line instruments)

Soluciones

Acrilamida (30% T, 2.6% C): 30% Acrilamida, 2.6% N-N'-metilenebisacrilamida. Filtrar la solución con filtro de 0.45 µm (mantener a 4 °C en oscuridad)

Azul de bromofenol: 1% azul de bromofenol, 50 mM Tris-Base

Amortiguador del gel (Tris-HCl): 1.5 M Tris-Base, ajustar con ácido clorhídrico (HCl) a pH 8.8 y filtrar la solución con un filtro de 0.45 µm (mantener a 4 °C)

Amortiguador de corrida: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina (CH₂(NH₂)COOH), 0.1% SDS

Amortiguador de acetato de amonio (solución stock 10X): 0.2 M acetato de amonio y ajustar pH=4.7 con ácido acético al 30%

Amortiguador de equilibrio: 2% SDS, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 6M urea (CH₄N₂O), 30% v/v glicerol, 0.002% de azul de bromofenol. EL DTT (C₄H₁₀O₂S₂) o iodoacetamida se agregan justo antes de su uso.

Amortiguador de fosfato de sodio pH 6 (solución stock 10X): 0.5 M de fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄•H₂O) y ajustar pH a 6 con hidróxido de sodio 1N (NaOH)

Amortiguador de fosfato de sodio pH 8 (solución stock 10X): 0.5 M de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) y ajustar pH a 8

Amortiguador Fosfato Salino (PBS): 20mM de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) y 0.15 M de cloruro de sodio (NaCl). Ajustar pH a 7.4.

Amortiguador de rehidratación (para la muestra): 8 M urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 2 % CHAPS w/v ($\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$) y 0.002% de azul de bromofenol

Amortiguador de rehidratación (para la tira IPG): 8 M urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 2% w/v CHAPS ($\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$), 0.002% azul de bromofenol, 1% anfolitos (IPG Amortiguador/farmalito) y 18 mM DTT (7 mg por cada 2.5 ml)

CHAPS Urea-Tiourea: 7 M urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 2 M tiourea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) y 2% CHAPS ($\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$)

CHAPS-Urea: 8 M urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 4% (w/v) CHAPS ($\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$), 2% anfolitos (IPG Amortiguador/farmalito)

CHAPS 2%: 20 mM HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), 5 mM de sal disódica dihidrato (EDTA), 255 mM sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) y 2% CHAPS ($\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$). El pH se ajusto a 7.2 con NaOH 1M.

CHAPS 4%: 20 mM HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), 5 mM de sal disódica dihidrato (EDTA), 255 mM sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) y 4% CHAPS ($\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$). El pH se ajusto a 7.2 con NaOH 1M.

Cloruro de guanidinio: 0.3 M GuHCl (CH_6ClN_3) en 95% etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)

Dodecil sulfato de sodio (SDS): 10% SDS en agua destilada. Filtrar solución con filtro de 0.45 μm .

Persulfato de amonio: 10% en agua. Preparar justo antes de usar.

Reactivo de Bradford: 0.001% Coomassie G-250, 4.15% etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) y 8.15% de ácido fosfórico (H_3PO_4).

Solución A (HPLC): 0.12 % de ácido trifluoroacético (TFA, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) en agua

Solución B (HPLC): 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) en acetonitrilo (CH_3CN)

Solución fijadora: 40% metanol (CH_3OH) y 10% ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)

Solución selladora: 1% Agarosa, 0.002% de azul de bromofenol

Solución de tinción (coomassie "silver blue"): 10% ácido fosfórico (H_3PO_4), 10% sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.12% coomassie G-250 y 20% metanol (CH_4O).

Tritón: 10 mM Tris-HCL pH 7.4, 50 mM cloruro de sodio (NaCl), 5mM de sal disódica dihidrato (EDTA), 1% Tritón X-100, 0.05% SDS.