



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*.**

## **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

Biól. Santos Ramírez Carreto

DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Baltazar Becerril Luján  
Instituto de Biotecnología (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez  
Instituto de Neurobiología (UNAM)

Dr. Gerardo Corzo Burguete  
Instituto de Biotecnología (UNAM)

MÉXICO, D. F. MAYO, 2013



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

Dr. Baltazar Becerril Luján (IBT, UNAM)

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez (INB, UNAM)

Dr. Gerardo Corzo Burguete (IBT, UNAM)

## JURADO DE EXAMEN

Dr. Lourival Domingos Possani Postay (IBT, UNAM)

Dr. Alejandro Alagón Cano (IBT, UNAM)

Dr. Joel Osuna Quintero (IBT, UNAM)

Dra. Norma Adriana Valdez Cruz (IIB, UNAM)

Dr. Mario Soberón Chávez (IBT, UNAM)

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Baltazar Becerril Luján y la asesoría del Dr. Ernesto Ortiz Suri. Parte de este trabajo fue financiado por el donativo P156 del Instituto Bioclón concedido al Dr. Baltazar Becerril Luján. También, durante la realización de este trabajo recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con numero de beca 16449.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Baltazar Becerril por su apoyo, confianza y paciencia para la realización de este trabajo.

Al Dr. Ernesto Ortiz Suri, por ser mi maestro durante todos estos años.

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Possani por permitirme participar en el área de las toxinas de alacrán.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, en especial al Dr. Gerardo Corzo Burguete y al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, por sus tantas aportaciones durante el desarrollo de este proyecto.

Al jurado de examen por sus aportaciones en la escritura de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca para la realización de este proyecto.

A los integrantes de la unidad de docencia, Gloria Villa Herrera, Lic. Antonio Bolaños Guillen y al Ing. Jalil Saab Hassanille, por todo su apoyo.

A el M. en C. Timoteo Olamendi Portugal, al Dr. Fernando Zamudio, al Sr. Fredy Coronas y al Biol. Cipriano Balderas, por su apoyo técnico brindado en el laboratorio.

A la Sra. Maria del Carmen Martínez Segura por su gran apoyo en el área administrativa.

A la Dra. Verónica Quintero y a la Dra. María J. Jiménez Vargas, por su apoyo en la realización de este proyecto y por su amistad, muchas gracias.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio: Lidia Riaño, Everardo, Guille, Francia, Lilu, Juan, Miryam, Oscar, Omar, Alexis, Kenya, Georgina Gurrola, Fernando Zamudio, Fredy, Timo, Rosby, Mary, Lidia González, Itzel, Martitha, Rita, Leo, Irán, Vero, Chano, Linda y Polo.



Dedico este trabajo a mi Madre y a mi Padre.  
Muchas gracias por todo.

## INDICE

<b>0.0 ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>1.0 RESUMEN</b> .....	8
<b>2.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	9
2.1 Biología del Alacrán.....	9
2.2 Componentes del veneno del Alacrán.....	11
2.2.1 Toxinas .....	11
2.2.2 Péptidos sin puentes disulfuro .....	15
<b>3.0 ANTECEDENTES</b> .....	18
<b>4.0 HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>5.0 OBJETIVOS</b> .....	19
5.1 Objetivo general .....	19
5.2 Objetivos particulares .....	19
<b>6.0 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
6.1 Soluciones y medios de cultivo .....	19
6.2 Cepas y vectores.....	20
6.3 Preparación de células electrocompetentes.....	20
6.4 Construcción de librerías de ADNc a partir de ARN total.....	21
6.4.1 Extracción de ARN total.....	21
6.4.2 Síntesis y amplificación de ADNc .....	22
6.4.3 Digestión con Sfil .....	22
6.4.4 Clonación en DH5 $\alpha$ .....	24
6.4.5 Lisis Alcalina (Minipreps) .....	24
6.4.6 Secuenciación de ADN .....	25
6.4.7 Predicción de secuencias de Aminoácidos <i>in silico</i> .....	25
6.5 Ensayos de actividad antibacteriana .....	25
6.5.1 Síntesis de péptidos.....	25
6.5.2 Cepas Bacterias .....	26
6.5.3 Ensayos Antibacterianos .....	26
6.5.4 Ensayos de hemólisis .....	26
6.5.5 Dicroísmo Circular (DC).....	26
<b>7.0 RESULTADOS</b> .....	27
<b>8.0 DISCUSIÓN</b> .....	54

<b>9.0 CONCLUSIONES</b> .....	57
<b>10.0 PERSPECTIVAS</b> .....	58
<b>11.0 REFERENCIAS</b> .....	58
<b>12.0 ANEXO</b> .....	64

## 0.0 ABREVIATURAS

aa	Aminoácido(s)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
°C	Grados centígrados
Ca <sup>2+</sup>	Ion Calcio
Cl <sup>-</sup>	Ion Cloro
Da	Daltons
DC	Dicroísmo circular
DO	Densidad óptica
E-value	Valor Esperado: describe el número de coincidencias que cabe “esperar” hallar por azar cuando se consulta una base de datos de cierto tamaño.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HCl	Ácido Clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
K <sup>+</sup>	Ion Potasio
KDa	Kilo Daltons
Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje
LB	Medio Luria Bertani
mg	Miligramos
MIC	Concentración Mínima inhibitoria
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mV	Milivoltios
N	Normalidad
NDBP	“Non-Disulfide-Bridged Peptides”
nm	Nanómetros
Na <sup>+</sup>	Ion Sodio
nM	Nanomolar
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
PI	Punto Isoelectrico
RPHPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
Tx	Toxina
Vm	<i>Vaejovis mexicanus</i>
Vp	<i>Vaejovis punctatus</i>
Vs	<i>Vaejovis subcristatus</i>
VpTx	Toxina de <i>Vaejovis punctatus</i>

## AMINOÁCIDOS

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

## 1.0. RESUMEN

El presente trabajo comprende la obtención y el análisis de los transcritos generados en la glándula venenosa de los alacranes mexicanos, *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*, con el fin de obtener información acerca de la composición del veneno de estos alacranes y prestando especial atención aquellos transcritos que codifican para péptidos con una probable actividad biológica que pueda ser de utilidad en el área de la farmacología y la biotecnología. Para tal fin, se generó una biblioteca de ADNc por cada alacrán, cada una de tales bibliotecas fueron generadas a partir del ARNtotal extraído de las células de la glándula venenosa de *V.punctatus* y *V.subcristatus*. El título de las bibliotecas no amplificadas fue de  $1.3 \times 10^5$  para *V.subcristatus* y de  $1.03 \times 10^6$  para *V. punctatus* con una eficiencia del 95 y 97% de clonas recombinantes, respectivamente. De cada una de estas bibliotecas se mandaron a secuenciar 100 clonas al azar logrando la obtención de nuevas secuencias de genes que codifican para péptidos presentes en el veneno de otras familias de alacranes.

En este trabajo reportamos 26 nuevas secuencias de precursores peptídicos correspondientes a toxinas de  $K^+$ , toxinas de  $Na^+$ , scorpine-like, péptidos antimicrobianos, La1-like y toxinas de  $Ca^{2+}$ . El análisis transcripcional nos indica que la cantidad y tipos de toxinas presentes en el veneno de los *Vaejovis* difiere de aquellos presentes en los miembros de la familia Buthidae. Esto podría estar vinculado al hecho de que la familia Vaejovidae no representa alto grado de peligrosidad para los humanos.

Uno de los resultados más significativos fue la obtención de varios precursores de péptidos antimicrobianos y citotóxicos de los cuales se seleccionaron algunos para su síntesis química y evaluación de su actividad biológica. De la biblioteca de *V.subcristatus* se eligieron a VsCT1 y VsCT2, al mismo tiempo de una librería de *Vaejovis mexicanus* (librería generada por la Dra. Verónica Quintero Hernández) fueron aislados VmCT1 y VmCT2 los cuales también se sintetizaron para caracterizarlos y compararlos con VsCT1 y VsCT2. Estos últimos, no presentaron actividad antimicrobiana, pero sí actividad hemolítica cuando fueron expuestos a eritrocitos en suspensión, mientras que, VmCT1 y VmCT2 mostraron actividad antimicrobiana sobre Gram(+) y Gram(-), con MIC's que van de los 5-25  $\mu M$ .

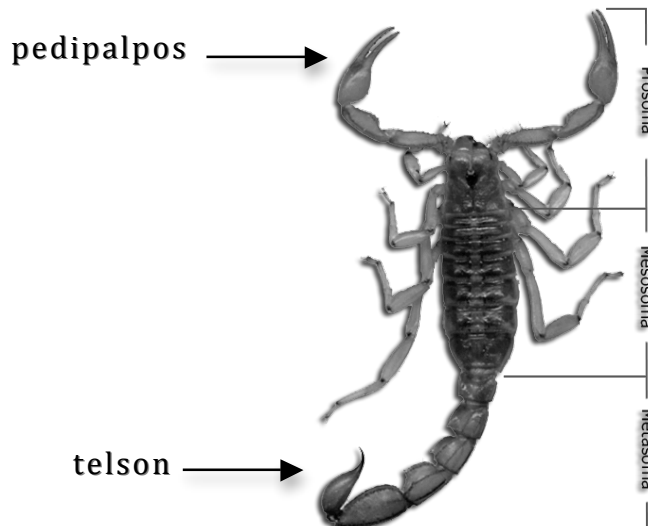
En general, este estudio abona al conocimiento general sobre los componentes del veneno de alacranes mexicanos no Buthidos, proporciona una visión particular sobre la composición molecular del veneno de los *Vaejovis* y expone además el valor biotecnológico y farmacológico que podrían generar los componentes peptídicos presentes en el veneno de estos alacranes.

## 2.0. INTRODUCCIÓN

Algunos animales son productores de veneno que utilizan principalmente para la captura de sus presas y para la defensa contra depredadores. La diversidad de los componentes que constituyen el veneno de estos animales (serpientes, arañas, alacranes, lagartos, anémonas marinas y caracoles marinos) y su alta especificidad son el resultado de un complejo proceso de evolución molecular y de interacciones ecológicas que se han suscitado en su entorno durante millones de años. La especificidad de estas toxinas sobre sus blancos biológicos ha permitido que algunas de ellas sean empleadas como herramientas moleculares en investigaciones de tipo farmacológico y han generado expectativas sobre su aplicación como fármacos[5].

### 2.1. Biología del alacrán

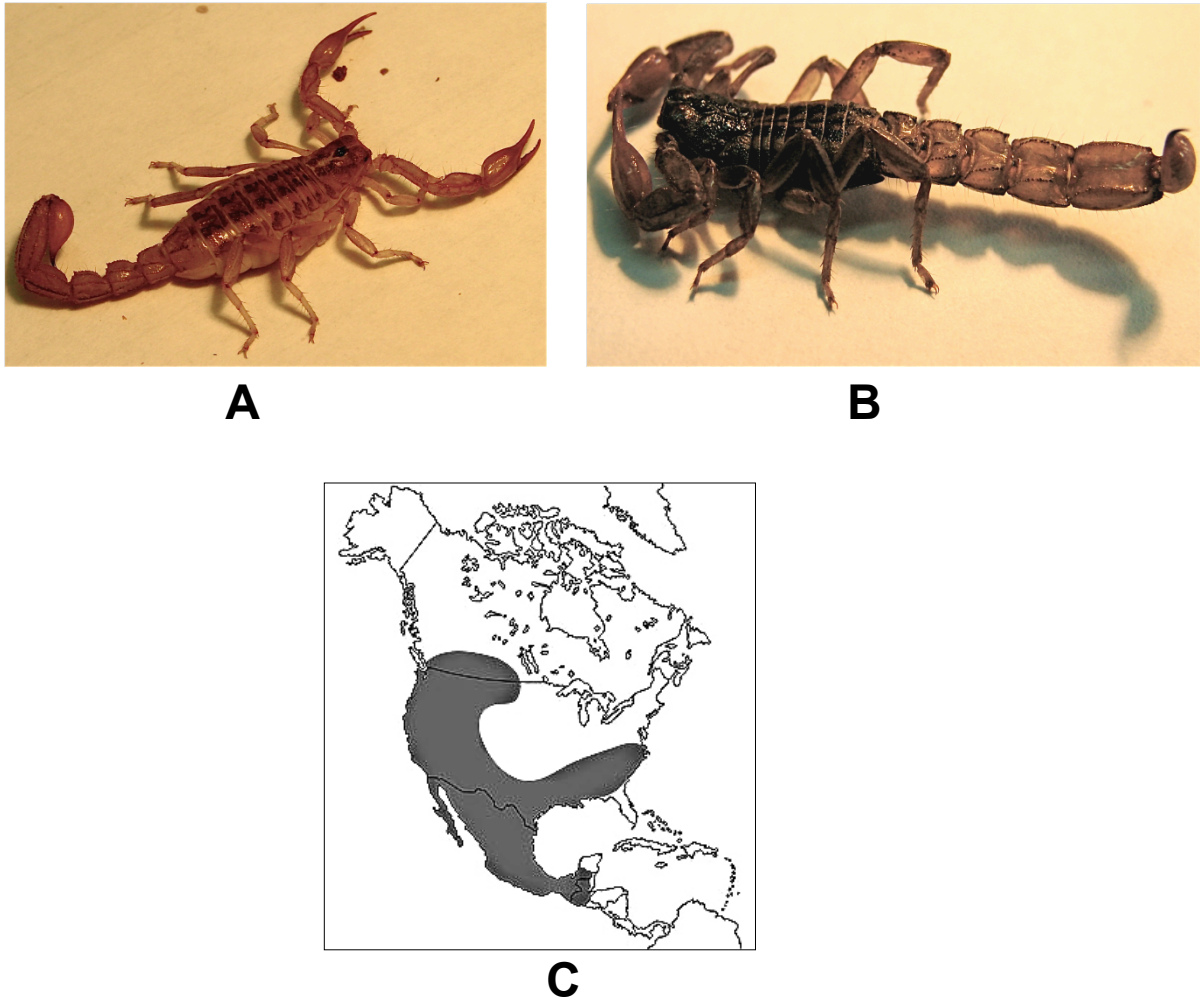
Todas las variedades de alacranes son depredadores, especialmente de arácnidos, crustáceos e insectos, aunque algunas especies pueden alimentarse de presas más grandes. El veneno de los alacranes es producido en dos glándulas localizadas en el extremo distal del metasoma llamado telson. Las presas son típicamente sujetadas con los pedipalpos (quillas o pinzas) del alacrán e inyectadas con el veneno mediante la inserción del aguijón que se encuentra en el telson (Fig. 1). El veneno es liberado de manera voluntaria a través de dos conductos que conectan las glándulas venenosas con el aguijón el cual actúa como una aguja hipodérmica.



**Fig.1. Vista dorsal del cuerpo de un alacrán.** En esta figura se muestran las tres regiones en las cuales está delimitado el cuerpo de los alacranes: Prosoma, Mesosoma y Metasoma. En el extremo distal del Metasoma se indica la presencia del telson en el cual se encuentran las dos glándulas productoras del veneno y un aguijón que actúa como una aguja hipodérmica para la inyección del veneno.

Los alacranes pertenecen a uno de los órdenes de artrópodos terrestres más antiguos que se conocen, sus registros fósiles datan desde el periodo Silúrico lo que corresponde aproximadamente a 400 millones de años atrás [1]. Los alacranes pertenecen al Reino Animalia (Subreino Metazoa), Phylum Arthropoda (Subphylum Chelicerata), Clase Arachnidae y al Orden Scorpionidae[1]. Este grupo de animales venenosos está constituido por aproximadamente 1500 especies distribuidas en todo el mundo [2]. Actualmente son reconocidas 18 familias de alacranes [2], y en México se encuentran las familias Buthidae, Chactidae, Diplocentridae, Euscorpiidae, Iuridae, Superstitionidae y Vaejovidae [9].

Los alacranes son de hábitos nocturnos y viven la mayor parte del tiempo en lugares escondidos generalmente bajo la corteza de árboles, troncos huecos y pedregales. Pueden habitar desde zonas boscosas, regiones selváticas hasta zonas urbanizadas, donde suelen realizar guaridas subterráneas [1].



**Fig.2.** A) *Vaejovis subcristatus*. B) *Vaejovis punctatus*. C) Mapa de America del Norte en el que se representa de manera aproximada la distribución territorial de la familia Vaejoidea. México es uno de los países con mayor cantidad de especies de alacranes. Se estima que la familia Vaejoidea se distribuye desde el suroeste de Canada hasta el sur de Guatemala. La región del mapa delimitada en color obscuro corresponde al territorio de distribución de la familia Vaejoidea[1,10-13].

En México se encuentran distribuidas aproximadamente 220 especies de alacranes de las cuales sólo siete, todas pertenecientes al género *Centruroides* (Familia Buthidae), pueden producir intoxicación en humanos por medio de la inyección de su veneno. Uno de los géneros más ampliamente distribuido en México y que no representa alto grado de peligro para los humanos es el género *Vaejovis* perteneciente a la familia Vaejoidea (Fig. 2). En el estado de Morelos podemos encontrar, entre otras especies del género *Vaejovis*, a: *Vaejovis punctatus* Karsch, 1879; *Vaejovis granulatus* Pocock, 1898; *Vaejovis curvidigitus* Sissom, 1991; *Vaejovis nigrescens* Pocock, 1898; *Vaejovis mexicanus* C. L. Koch, 1836, este último endémico de la zona urbana del estado [13].

## 2.2. Componentes del Veneno del Alacrán

Los análisis bioquímicos y de actividad biológica del veneno de varias especies de alacranes han proporcionado información muy importante sobre la estructura y función de los componentes del veneno. Hoy en día se sabe que, en general, los alacranes son capaces de producir en sus glándulas venenosas cientos de diferentes moléculas bioactivas como aminas, lípidos, mucopolisacáridos, RNA, proteínas de alto peso molecular y por supuesto péptidos. Estos últimos no sólo presentan actividad tóxica, sino que también se han encontrado péptidos con otras actividades tales como la antimicrobiana, antiepiléptica, fosfolipásica e insecticida [3-6,66]; también se han encontrado péptidos que pueden actuar como moduladores de la respuesta inmune y como desencadenantes de señalización celular [7,8].

En base a la estructura primaria de los péptidos presentes en el veneno de los alacranes, se pueden clasificar en dos grandes grupos: péptidos ricos en puentes disulfuro y péptidos sin puentes disulfuro [14]. Dentro de los primeros destacan los componentes responsables de la toxicidad. La mayoría de las toxinas contienen de tres a cuatro puentes disulfuro y pueden reconocer e interactuar de manera específica con canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  inhibiendo el mecanismo de cierre y apertura de los mismos en células excitables y no excitables [15,16].

### 2.2.1 Toxinas

El componente principal del veneno de los alacranes lo constituyen las toxinas peptídicas. La mayoría de las toxinas descritas tienen como moléculas receptoras una gran variedad de canales iónicos. Esto sugiere que durante la evolución de las toxinas, éstas se diversificaron hasta cubrir una gran variedad de blancos moleculares, asegurando su éxito biológico. De acuerdo con la especificidad de las toxinas hacia los canales iónicos, pueden ser clasificadas en cuatro familias:

#### 1) Toxinas de $\text{Na}^+$ (*NaScTx*s).

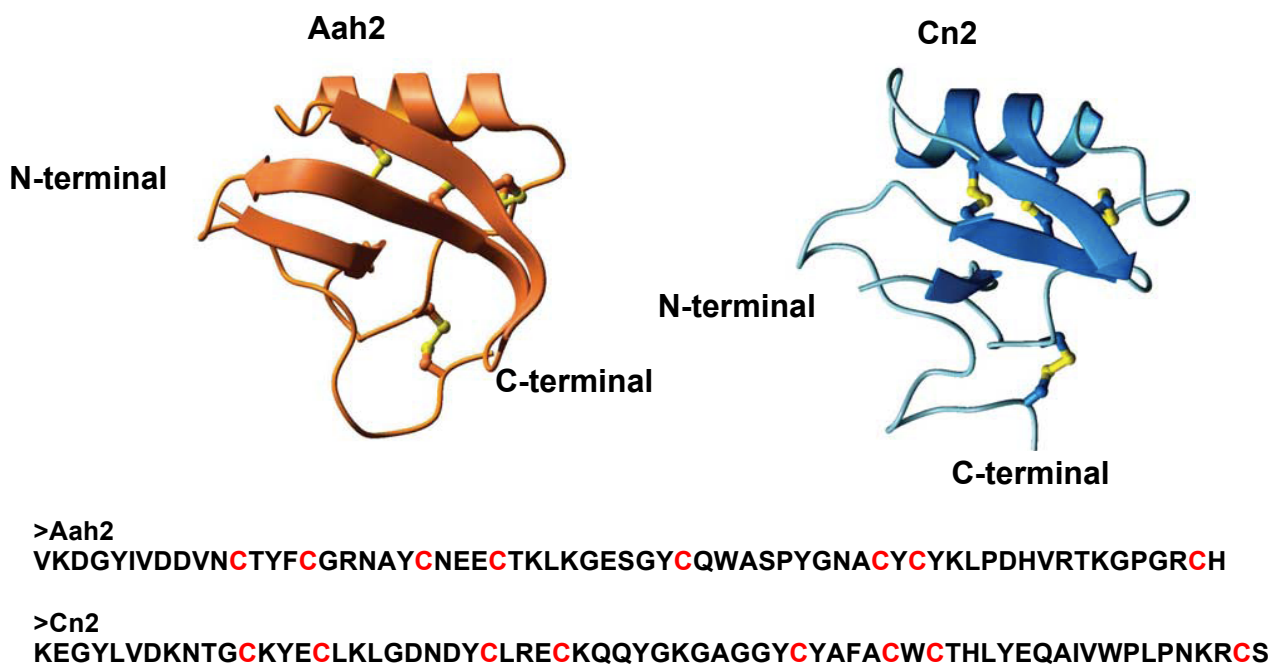
Son péptidos de cadena larga constituidos por 58 a 76 residuos de aminoácidos y masas moleculares que varían entre 6.5 y 8.5 kDa [17]. Estas toxinas actúan modulando el mecanismo de cierre y apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  y son consideradas como las responsables de los efectos neurotóxicos que se desarrollan durante el envenenamiento por la picadura del alacrán [17]. La estructura tridimensional ha mostrado un núcleo estructural común con una topología  $\beta\alpha\beta\beta$  siendo estabilizadas por cuatro puentes disulfuro (Fig. 3). Tres de los puentes disulfuro se encuentran conservados en todas las toxinas, mientras que el cuarto puede modificar su posición [17,18].

Las toxinas de  $\text{Na}^+$  son clasificadas en dos grupos: toxinas  $\alpha$  y  $\beta$ . Las primeras se unen al sitio 3 del dominio 4 del canal retardando o inhibiendo el mecanismo de inactivación del canal, mientras que las toxinas  $\beta$  se unen al sitio 4 asignado en el dominio 2 del canal produciendo cambios en la activación del canal hacia potenciales de membrana más negativos [26] y reduciendo la cantidad de corriente.

Las toxinas tipo  $\alpha$  de  $\text{Na}^+$  son clasificadas en tres grupos:



- Toxinas  $\alpha$  “clásicas”, las cuales son altamente activas sobre mamíferos, pero presentan baja toxicidad sobre algunos insectos y baja afinidad sobre membranas neuronales de insectos. Una de las toxinas  $\alpha$  clásicas más potentes es Aah2 (Fig. 3) aislada del veneno del alacrán *Androctonus australis* Hector del Norte de África [17,34].
- Toxinas  $\alpha$  “anti-insecto”. Estas no compiten contra las toxinas  $\alpha$  “clásicas”, sin embargo, se unen a los sinaptosomas de cerebro de rata y muestran baja toxicidad en mamíferos al ser administradas por vía intracerebroventricular y son altamente activas por vía subcutánea. Estos péptidos son altamente tóxicos para algunos insectos [17].
- Las toxinas “ $\alpha$ -like”, tienen una alta toxicidad al ser administradas vía intracerebroventricular en ratas y ratones, aunque su actividad es baja por vía subcutánea y son moderadamente tóxicas para algunos insectos. Compiten contra las toxinas “anti-insecto” en la unión a membranas sinaptosomales de insecto [17,27].



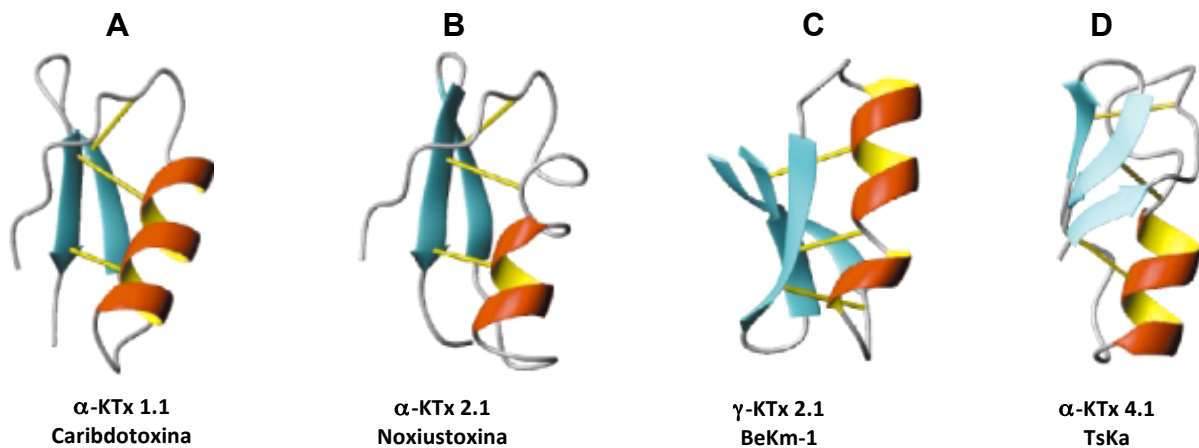
**Fig. 3. Toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  de canales de  $\text{Na}^+$ .** En la parte superior de la figura se muestran los elementos de la estructura secundaria tanto de la  $\alpha$ -toxina Aah2 (color naranja) de *Androctonus australis* Hector, como de Cn2 (color azul) una  $\beta$ -toxina de *Centruroides noxius*. En ambos casos los puentes disulfuro son remarcados en color amarillo. En la parte inferior de la figura se muestran las secuencias de aminoácidos de ambas toxinas, los residuos de Cys son resaltados en rojo. Las figuras fueron tomadas de la referencia [17].

Las toxinas  $\beta$  de  $\text{Na}^+$  reconocen tanto tejidos de mamíferos como de artrópodos. En el caso de los artrópodos estas toxinas se han clasificado en dos tipos: depresantes y excitatorias [28-30]. Actúan selectivamente sobre canales de  $\text{Na}^+$  de insectos, induciendo síntomas opuestos sobre las larvas de mariposa [30,31] ya que se unen a sitios distintos en el receptor [32]. Una de las  $\beta$  toxinas más estudiadas es la toxina 2 del alacrán mexicano

*Centruroides noxius*, mejor conocida como Cn2 (Fig. 3). Algunos estudios han demostrado que Cn2 tiene preferencia por un subtipo especial de canal de Na<sup>+</sup>, el Na<sub>v</sub> 1.6 [33].

## 2) Toxinas de K<sup>+</sup> (KScTxS).

Son péptidos de cadena corta de entre 22 a 48 residuos de aminoácidos, estabilizados por tres o cuatro puentes disulfuro que bloquean canales de K<sup>+</sup>. Su estructura tridimensional presenta un plegamiento  $\alpha/\beta$ , que comprende una  $\alpha$ -hélice conectada a una doble o triple lámina  $\beta$  plegada por puentes disulfuro. La primer toxina específica para canales de potasio, denominada como Noxiustoxina, fue identificada en el veneno del alacrán *Centruroides noxius* en 1982 y es capaz de bloquear la permeabilidad del K<sup>+</sup> en el axón gigante del calamar *Loligo vulgaris* [84,85].

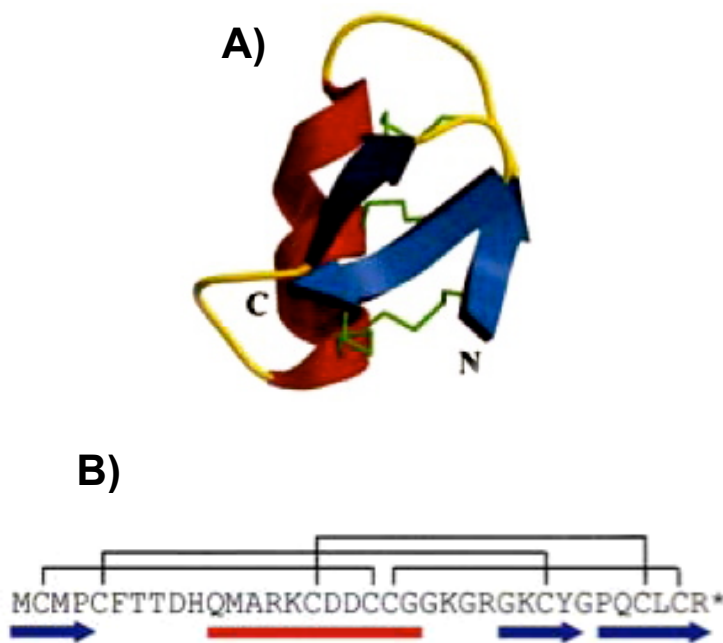


**Fig. 4. Estructuras de cuatro toxinas pertenecientes a la familia de toxinas específicas de canales de K<sup>+</sup>.** Esta figura muestra dos grupos de estructuras diferentes, A y B muestran una estructura  $\alpha$ -hélice (color rojo y amarillo) y dos láminas  $\beta$ -plegadas (color azul); mientras que C y D muestran una  $\alpha$ -hélice y tres láminas  $\beta$ -plegadas. En las cuatro estructuras se muestran los puentes disulfuro como líneas en color amarillo. Los nombres sistemáticos y los nombres o abreviaciones por las que comúnmente se conocen estas toxinas también se muestran debajo de cada una de las estructuras. BeKm-1 fue aislada de *Mesobuthus eupeus*, Noxiustoxina de *Centruroides noxius*, Caribdotoxina de *Leiurus quinquestratus* y TsKa de *Tityus serrulatus*. Las imágenes fueron tomadas de la referencia [25].

Hasta la fecha, se han caracterizado más de 140 toxinas de K<sup>+</sup> las cuales son clasificadas en tres familias ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y bajo una numeración sistemática [16,21]. La mayoría de las toxinas de K<sup>+</sup> conocidas han sido aisladas de alacranes pertenecientes a la familia Buthidae [21]. Las  $\alpha$ -KTx's han resultado ser herramientas adecuadas en ensayos asociados con la caracterización estructural del canal de K<sup>+</sup> y sus corrientes iónicas. Actualmente se conocen 23 diferentes subfamilias de Toxinas alfa de K<sup>+</sup> [23]. La estructura terciaria de las  $\alpha$ -KTx's es similar, por lo que su mecanismo de acción, afinidad y especificidad sobre su blanco molecular depende del tipo de aminoácidos que se encuentren situados en la superficie externa de la toxina y de la forma en que interactúen estos aminoácidos con las moléculas del canal [21,25].

### 3) Toxinas de Cl<sup>-</sup>.

Estas toxinas de bajo peso molecular están constituidas por 35 a 38 residuos de aminoácidos con cuatro puentes disulfuro que producen la inhibición de los canales de Cl<sup>-</sup>. El ejemplo más mencionado en la literatura es el de la Clorotoxina de *Leiurus quinquestriatus* (Fig. 5), este péptido posee 36 aminoácidos de longitud, ocho de ellos son Cys que interaccionan para formar cuatro puentes disulfuro (Fig. 5). La Clorotoxina presenta un plegamiento tipo  $\beta\alpha\beta\beta$ , puede bloquear canales de Cl<sup>-</sup> de células epiteliales de ratón y de manera específica reconocer canales de Cl<sup>-</sup> en células cancerígenas [5,19,20].



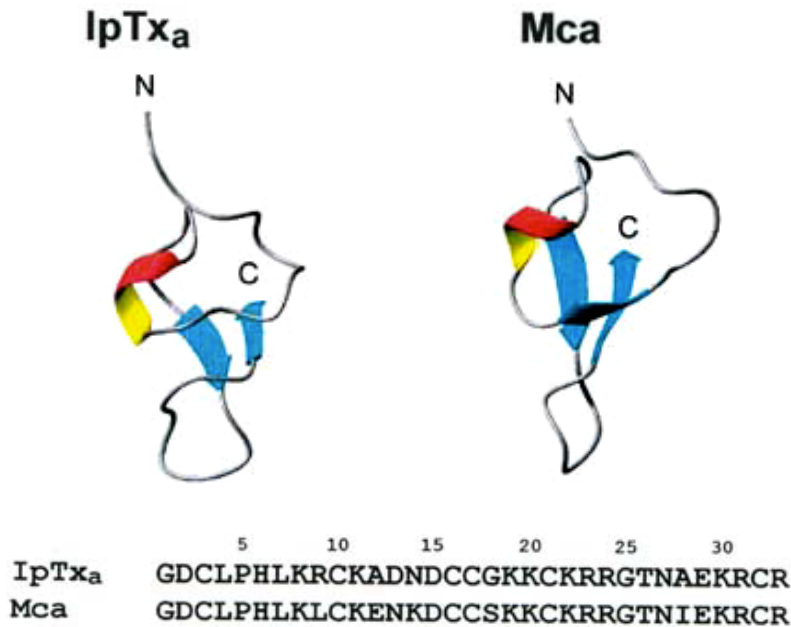
**Fig. 5. Estructura primaria y secundaria de la Clorotoxina.** A) Estructura secundaria en la que se muestra el plegamiento tipo  $\beta\alpha\beta\beta$  de la Clorotoxina. La región  $\alpha$ -hélice se muestra en color rojo, las tres láminas  $\beta$ -plegadas se muestran en color azul y los puentes disulfuro en color verde, tanto el C-terminal como el N-terminal son indicados en la figura. En B) se muestra la estructura primaria de la Clorotoxina en la que se indica las conexiones de los residuos de Cys mediante líneas negras, también se muestra a lo largo de la secuencia las posiciones relativas a la región de la  $\alpha$ -hélice y de las láminas  $\beta$ -plegadas siguiendo el mismo código de color que en A). [39]

### 4) Toxinas de Ca<sup>2+</sup>.

Estas toxinas, también denominadas como calcinas, modulan la sensibilidad de los canales de Ca<sup>2+</sup> y están constituidas por 27 a 104 residuos de aminoácidos. En el veneno de algunos alacranes se han aislado componentes que actúan sobre receptores de Rianodina. Este tipo de receptores conforman una familia de canales de Ca<sup>2+</sup> que participan en la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular y se encuentran distribuidos tanto en músculo esquelético (RyR1), como en cardíaco (RyR2).

La Imperatoxina I y la Imperatoxina A han sido aisladas del alacrán *Pandinus imperator* [35-37]. La Imperatoxina I es una proteína heterodimérica que consiste de una subunidad larga (104 residuos de aminoácidos) y una subunidad corta de 17 aminoácidos mantenida de forma covalente por un puente disulfuro. El heterodímero manifiesta una actividad fosfolipásica de tipo A2. Esta proteína tiene un efecto inhibitorio en el pegado de la Rianodina al canal de calcio [35]. La imperatoxina A (IpTx<sub>a</sub>) es un péptido de 33 aminoácidos que activa la liberación de calcio para el pegado de la Rianodina al canal, presenta 6 residuos de Cys que interaccionan para formar tres puentes disulfuro [36, 37]. La toxina Maurocalcina (Mca), aislada de *Scorpio maurus palmatus*, también posee tres puentes disulfuro, tiene una longitud de 33 aminoácidos, comparte un 82%

de identidad con IpTx<sub>a</sub> y presenta actividad sobre receptores de Rianodina tipo 1 (RyR1). Tanto IpTx<sub>a</sub> como Mca son péptidos ricos en residuos de Arg y Lys, lo cual les confiere un carácter básico (Fig. 6). Otros péptidos con una gran similitud a IpTx<sub>a</sub> y Mca han sido subsecuentemente aislados, tal es el ejemplo de Opicalcina 1 y 2 de *Opisthophthalmus carinatus*, y la Hadrucalcina del alacrán endémico del estado de Guerrero (México), *Hadrurus gertschi* [38].



**Fig. 6. Calcinas.** Estructura primaria y secundaria de la IpTx<sub>a</sub> de *Pandinus imperator* y de la Maurocalcina de *Scorpio maurus palmatus*.

### 2.2.2. Péptidos sin puentes disulfuro

Aunque poco estudiados, los péptidos carentes de puentes disulfuro son parte importante del veneno de los alacranes. Se ha descubierto que estos péptidos exhiben varias funciones tales como antimicrobianos, inmunomoduladores, hemolíticos, así como la de potenciales antihipertensivos (potenciadores de bradicinina). La estructura que presentan estos péptidos, sus actividades farmacológicas y su evolución difieren considerablemente de aquellos péptidos estabilizados por puentes disulfuro presentes en el veneno de los alacranes [14]. En el 2005, Xian-Chun Zeng y colaboradores generaron una forma de clasificar los péptidos libres de puentes disulfuro presentes en el veneno de los alacranes. Esta nomenclatura tiene como base las características estructurales y funcionales de estos péptidos (Tabla 1).

#### 1) Péptidos Antimicrobianos y Citotóxicos.

Es posible que la sobrevivencia de los alacranes como especie se deba, al menos en parte, a la eficiencia de su sistema inmune. En los alacranes se han aislado distintos péptidos antimicrobianos, algunos presentan residuos de cisteínas (Defensinas) en su secuencia primaria y otros presentan uno o ningún residuo de cisteína. Dentro de los péptidos antimicrobianos libres de cisteínas, podemos encontrar péptidos con una variedad de longitudes que van de los 13 a los 47 residuos de aminoácidos, son de naturaleza anfipática, presentan secuencias y estructuras diferentes. Estos péptidos presentan un amplio intervalo de inhibición de crecimiento

en microorganismos como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras, hongos y protozoarios. Debido al amplio espectro antimicrobiano que poseen estos péptidos están siendo estudiados como fármacos potenciales.

Actualmente, ya se han aislado varios péptidos antimicrobianos del veneno de alacranes. Los miembros de la subfamilia NDBP-5 (Tabla1) son péptidos catiónicos que poseen actividad antimicrobiana y hemolítica. El análisis de su estructura secundaria predice que contienen estructuras alfa-hélice, son de carácter anfipático y se cree que estos péptidos forman poros en la membrana celular [6,14,44-47]. IsCT, el miembro más popular de esta subfamilia, fue aislado del veneno de *O. madagascariensis*. Este péptido presenta actividad antibacteriana tanto para Gram-positivas como para Gram-negativas con rangos de MIC de 0.7-17.0  $\mu\text{M}$  [6,14,44]. A la fecha se han caracterizado cerca de 15 péptidos, homólogos del IsCT, aislados del veneno por métodos bioquímicos clásicos o por clonación de los genes mediante bibliotecas de ADNc, este tipo de péptidos se encuentra distribuidos en todas las familias de alacranes hasta ahora estudiadas. Otro grupo de péptidos antimicrobianos que se encuentra en los alacranes es la subfamilia NDBP-3 (Tabla 1) conformada por la Hadrurina de *H. aztecus* [48], Parabutoporina de *P. schlechteri* [49], Pandinina 1 de *P. imperator* [50], Opistoporina 1 y 2 de *O. carinatus* [51] y BmKbpp de *B.martensii* [43].

En base al alineamiento de secuencias en Clustal W, se ha observado una región conservada en el extremo N-terminal [14]. El consenso de esta región es S(X)<sub>3</sub>KXWXS(X)<sub>5</sub>L, en donde X representa cualquiera de los 20 aminoácidos (Tabla 1).

La Hadrurina es un péptido de 41 aa de longitud, posee siete residuos básicos de los cuales tres se encuentran agrupados como un triplete Lys-Arg-Lys, esta composición posee el carácter más básico entre los NDBP's [48]. La secuencia de este péptido es única, puesto que en su segmento N-terminal presenta 10 residuos que representan un 70% de similitud con las regiones correspondientes de los péptidos antimicrobianos Gaegurin 4 y Brevirin 2e, aislados de la piel de Rana [14,48]. Sin embargo, sus extremos C-terminal de los tres péptidos son diferentes. La concentración a la cual la Hadrurina es capaz de inhibir el desarrollo bacteriano de Gram-positivas y de Gram-negativas se encuentra en el rango de 10-50  $\mu\text{M}$  [48]. La pandinina 1 está constituida por 44 aminoácidos [50], presenta una capacidad de inhibición sobre Gram-positivas a concentraciones de 1.3-5.2  $\mu\text{M}$  y de 20.8  $\mu\text{M}$  o más para Gram-negativas [14]. Las opistoporinas 1 y 2 están constituidas por 44 residuos de aa y las secuencias sólo difieren en una posición. La opistoporina 1 inhibe el crecimiento bacteriano en un rango de concentración que va de 1.6 a 50  $\mu\text{M}$  para Gram-negativas, mientras que para Gram-positivas va de 12.5 a 50  $\mu\text{M}$ . La Parabutoporina posee 45 aa y presenta un alto porcentaje de aminoácidos básicos (26.6%) en su región N-terminal, mientras que su región C-terminal es rica en residuos ácidos, esta característica estructural también es compartida por el péptido BmKbpp [43]. La parabutoporina, inhibe el crecimiento bacteriano de Gram-negativas con MIC's menores a 6.5  $\mu\text{M}$ , pero presenta una actividad mucho más débil contra Gram-positivas con MIC's de 6.3-50  $\mu\text{M}$ . Este péptido también posee actividad antifúngica, con una IC<sub>50</sub> de 0.3-3.5  $\mu\text{M}$ . Tanto la parabutoporina como la opistoporina 1 presentan actividad hemolítica y además pueden actuar sinérgicamente con antibióticos convencionales tales como la amoxicilina, cefuroxima y eritromicina [14].

La pandinina 2 y BmKb1 conforman la subfamilia 4 de NDBP's y ambos péptidos poseen actividad antimicrobiana. Con una composición de 24 aa, la Pandinina 2 tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en un rango de concentración de 2.4 – 4.8 y de 19.1 – 38.2 µM, respectivamente. Además, a concentraciones de 19.1 µM puede inhibir el crecimiento de *Candida albicans*[14,50]. La BmKb1 presenta un contenido de 18 aa y a concentraciones de 16.0-81.5 µM puede inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas, mientras que en el rango de 18.1-90.8 µM inhibe el crecimiento de Gram-negativas [14].

	Subfamilia	Secuencia	NDBP-x.y nombre
1	Péptido T K12	KKDGY-VEYDR---AY----	1.1
		LRDYANRVINGGPVEAAGPPA	1.2
2	Bs10	VTMGYIKDGDGKKIAKKKNKNGRKHVEIDLNRVG	2.1
3	Hadrurina	-GILKTIKSIASKVWNSKTVQDLKRRGINWVANKLGVSPQAA-----	3.1
	Parabutoporina	----FKLGSFLKKAWKSKLAKKLRAKGEMLKDYAKGLLEGGSEEVPGQ--	3.2
	BmKbpp	----FRFGSFLKKVWKS KLAKKLRSKGLKDYANKVNLNGPEEEAAPAE	3.3
	Pandinina 1	GKVWDWIKSAAKTIWSEPVSQLKGVNLNAAKNYVAEKIGATPT-----	3.4
	Opistoporina 1	GKVWDWIKSTAKKLWNSKELKNTALNAAKNLVAEKIGATPS-----	3.5
	Opistoporina 2	GKVWDWIKSTAKKLWNSKELKNTALNAAKNFVAEKIGATPS-----	3.6
4	Pandinina 2 BmKb1	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD-	4.1
		-----FLFSLIPSAISGLISAFK	4.2
5	BmKn1	FIGAVAGLLSKIF	5.1
	IsCT	ILGKIWEGIKSLF	5.2
	IsCT2	IFGAIWNGIKSLF	5.3
	BmKn2	FIGAIARLLSKIF	5.4
6	BmKa1	--ESEEN-----EEGSNESGKSTEAKNTDASVDN-----EDSDIDGDSD	6.1
	BmKa2	YPASMDNSDDALEELDNLDLD-DYFDLEPADFVLLDMWANMLESDFDDME	6.2

**Tabla1. Clasificación de 17 péptidos sin puentes disulfuro aislados del veneno de Alacranes.** Péptido T (*T.serrulatus*), Péptido K12 (*B.occitanus*), Bs10 (*B.sindicus*), Pandinin 1 y Pandinin 2 (*P. Imperator*), Hadrurin (*H. aztecus*), IsCT e IsCT2 (*O.madagascariensis*), Parabutoporin (*P.schlecteri*) Opistoporin 1 y Opistoporin 2 (*O. carinatus*), BmKbpp, BmKn1, BmKn2, BmKa1, BmKa2 y BmKb1 (*B. Martensii* Karsch). Esta tabla fue tomada de la referencia [14].

## 2) Péptidos potenciadores de Bradicinina

La Bradicinina, así como la Angiotensina, son factores humorales cruciales para la regulación de la presión sanguínea. La enzima clave en el sistema Angiotensina-Bradicinina es la enzima convertidora de Angiotensina, la cual genera Angiotensina II a partir de Angiotensina I y degrada la Bradicinina. El descubrimiento de el primer inhibidor natural para esta enzima, el péptido potenciador de Bradicinina (Bpp, bradykinin potentiating peptide), ha hecho posible el desarrollo de medicamentos para el control de la presión sanguínea [40]. Se ha documentado que en el veneno de algunos alacranes existe una actividad potenciadora de Bradicinina. Dos péptidos libres de puentes disulfuro llamados péptido T y K12 (Tabla 1), fueron aislados del veneno de *Tityus serrulatus* y *Buthus occitanus*, respectivamente [41,42]. El péptido T está compuesto de 13 aa y

fue el primer péptido libre de puentes disulfuro (NDBP) descubierto en alacranes. El péptido T puede potenciar la actividad contráctil de la Bradicinina sobre el ileon aislado de cobayos e inhibe la hidrólisis de Bradicinina por la enzima convertidora de Angiotensina aislada del plasma de serpiente. Este péptido también puede inhibir la conversión de Angiotensina I a Angiotensina II por Cinasa II e incrementar el efecto depresor de la Bradicinina sobre la presión arterial sanguínea en ratas anestesiadas [41]. El péptido K12 contiene 21 aa y no presenta homología con el péptido T (Tabla1), pero los dos péptidos poseen actividad potenciadora de Bradicinina [42]. En base a la secuencia de aminoácidos de K12 un péptido denominado BmKbpp fue identificado partir de una librería de ADNc de *B. martensii* Karsch [43]. Este péptido está conformado por 47 aa y los últimos 21 residuos de la región C-terminal presentan un 57% de similitud con el péptido K12.

### 3.0. ANTECEDENTES

La creciente información generada de la clonación y secuenciación de genes aislados de librerías de ADNc generadas de la glándula venenosa, así como de los perfiles proteómicos de los venenos de los alacranes indican claramente que estos son mezclas bastante complejas [18-20]. Se ha estimado que se pueden encontrar un promedio de 150 formas moleculares distintas en cada una de las especies que existen en el mundo. Como se mencionó en la sección 2.1, en México existen aproximadamente 220 de las 1500 especies que existen alrededor del mundo. Se estima que existen 100 000 péptidos diferentes en el veneno de todas las especies de alacranes [86] y que sólo se han aislado y caracterizado algunos cientos de ellos.

Con el fin de aislar y caracterizar nuevos péptidos provenientes del veneno de los alacranes mexicanos y de otras partes del mundo en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani se han obtenido varias toxinas y los genes que codifican para ellas mediante la generación de bancos de ADNc y métodos de análisis proteómico. Ejemplo de ello son las librerías de *Opistacantus cayaporum* [52], *Hadrurus gerschi* [53], *Tityus discrepans* [54], *Rhopalurus junceus* [55] y los perfiles proteómicos de *Opisthacanthus cayaporum* [56], *Tityus cambridgei* [57], *Tityus stigmurus* [58] y *Tityus discrepans*[59].

Además del interés médico, existe el interés por descubrir nuevas herramientas bioquímicas que ayuden a entender el funcionamiento del sistema nervioso y de las membranas celulares, por lo cual, la investigación sobre venenos no sólo se centra en el conocimiento de los componentes relacionados con los efectos letales para el hombre, sino que también en muchas otras moléculas que presentan actividades biológicas que nos puedan permitir utilizarlas en áreas como la farmacología y la agricultura.

La familia Vaejovidae ha sido muy poco explorada en cuanto a los componentes de los venenos, sin embargo trabajos preliminares sobre el veneno de alacranes del genero *Vaejovis* han revelado una importante complejidad de componentes moleculares en su veneno [23]. También se ha logrado aislar y caracterizar un péptido con actividad antimicrobiana denominado Vejovina [60], de *Vaejovis mexicanus smithi*, lo cual incrementa nuestro interés sobre este grupo de alacranes para la realización de un escrutinio exhaustivo sobre los componentes de su veneno.



## 4.0. HIPÓTESIS

Mediante la generación de librerías de ADNc que representen los ARNm presentes en la glándula venenosa de los alacranes del género *Vaejovis* y con base en estudios previos en diferentes familias de alacranes, se espera identificar secuencias que representen nuevas toxinas y/o péptidos no tóxicos con posibles actividades biológicas.

## 5.0. OBJETIVOS

### ❖ Objetivo general

Construir y analizar bibliotecas de ADNc a partir del RNAm de la glándula venenosa de alacranes del género *Vaejovis* con el fin de identificar nuevos péptidos que representen potenciales actividades farmacológicas.

### ❖ Objetivos particulares

- Purificar RNA total del telson de *Vaejovis subcristatus* y *V. punctatus*.
- Sintetizar ADNc a partir del ARN total mediante RT-PCR.
- Amplificar ADNc por PCR y clonarlo en células DH5 $\alpha$  utilizando el vector pDNR-LIB.
- Caracterizar las bibliotecas por secuencia de los insertos.
- Realizar la expresión y/o síntesis de péptidos candidatos y probar su actividad biológica.

## 6.0. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. Soluciones y medios de cultivo.

**LB** (1L: 10g bacto-triptona, 5g de extracto de levadura, 5g NaCl, pH 7.0)

**2xYT** (1L: 16g bacto-triptona, 10g de extracto de levadura, 5g NaCl, pH 7.0)

**SB** (1L: 35g bacto-triptona, 20g de extracto de levadura, 5g NaCl, pH 7.0)

**SOB** (1L: 5g bacto-triptona, 125g de extracto de levadura, 0.125g NaCl, 2.5 ml KCl 0.25 M, pH 7.0)

**SOC** (10.2 ml: 10 ml SOB, 0.1 ml glucosa 2M, 0.1 ml MgCl<sub>2</sub> 1M)

**Caldo de Mueller Hinton** (Fórmula en gramos por litro: Infusión de carne 300.0, Peptona ácida de caseína 17.5, Almidón 1.5, pH 7.3  $\pm$  0.2). Para 1L suspender 22 g del medio.

**Agar de Mueller Hinton** (Fórmula en gramos por litro: Infusión de carne 300.0, Peptona ácida de caseína 17.5, Almidón 1.5, Agar 15.0, pH 7.3  $\pm$  0.2). Para 1L suspender 37 g del medio.

**TBE 10X** (Tris-Base 890mM, Borato 890mM, EDTA 20mM)

#### Lisis Alcalina:

Solución I (100 ml: 0.9g dextrosa, 2mL EDTA 0.5M pH 8, 1.25 ml Tris 2M pH 8)

Solución II (10 ml: 1 ml SDS 10%, 0.2 ml NaOH 10 N)

Solución III (100 ml: 60 ml acetato de potasio 5M, 40 ml ácido acético)

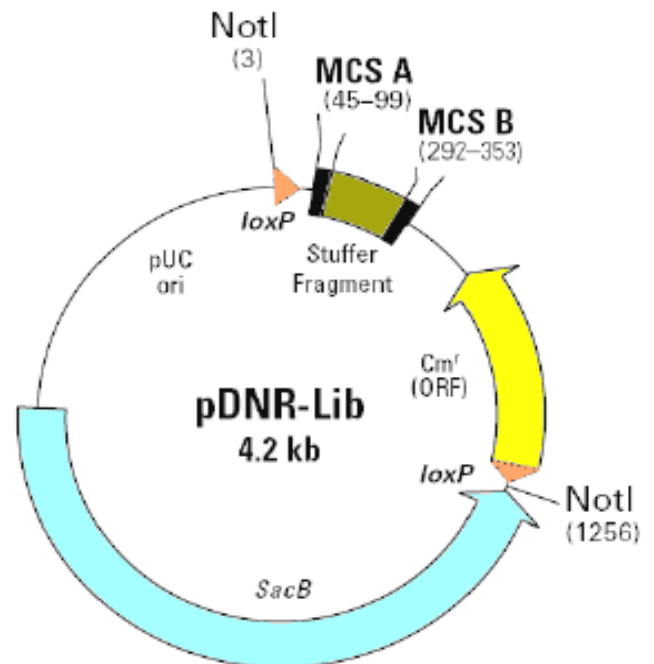


## 6.2. Cepas y vectores.

La cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* fue utilizada para las clonaciones realizadas en este estudio. El genotipo de esta cepa es:  $\Delta(mcrA)183$ ,  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, [*F'proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZAM15*, *Tn10(tet<sup>r</sup>)*].

El vector utilizado para la clonación de las bibliotecas de *Vaejovis subcristatus* y *V. punctatus* es el plásmido pDNR-lib (Fig.7). Este vector tiene un tamaño de 4.2 kb, posee un gen de resistencia al antibiótico Cloramfenicol, el cual será para seleccionar las bacterias transformadas de las no transformadas. Flanqueado por dos sitios múltiples de clonación (MCS A y MCS B), se encuentra el "Stuffer Fragment" el cual es remplazado por el fragmento de ADNc insertado en el vector mediante una reacción de ligación mediante los sitios SfiI A y B (Ver 6.4.3 y 6.4.4). Este vector permite la transferencia de los insertos a un vector de expresión mediante los sitios loxP que son reconocidos por una recombinasa Cre la cual media el intercambio de secuencias de ADN. También presenta el gen *SacB*, el cual permite seleccionar entre recombinantes incorrectas y aquellas del vector donador parental después de la reacción de recombinación con un vector aceptor.

**Fig.7: Representación esquemática del vector de clonación pDNR-LIB.** El pDNR-LIB es el vector de clonación utilizado para la construcción de librerías por el sistema SMART cDNA libraries utilizado en este trabajo.



## 6.3. Preparación de células electrocompetentes.

Se inoculó una colonia aislada de la cepa DH5 $\alpha$  en 20 mL de medio LB previamente suplementado con Ácido Nalidíxico (25  $\mu$ g/mL) y se incubó el medio a 37°C y 250 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron 5 mL del cultivo y fueron inoculados en 500 mL de medio SB estéril, el cual se incubó a 37°C y 2500 rpm, hasta alcanzar una D.O.600 de 0.6-0.8. Los siguientes pasos fueron realizados a 4°C. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, el cultivo fue centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas cuidadosamente en 150 mL de HEPES 1mM frío. Se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos. Al final se desechó el sobrenadante y el "pellet" fue recuperado en 100 mL de glicerol al 10%

frío. Se llevó a cabo un tercer paso de centrifugación a 4500 rpm durante 15 minutos y después de eliminar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 20 mL de glicerol al 10% frío. Las células fueron centrifugadas a 4700 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células recuperadas se resuspendieron en 1 mL de glicerol al 10% frío. La suspensión fue alicuotada en volúmenes de 50 µL en tubos Eppendorf estériles y pre-enfriados. Las alícuotas fueron almacenadas a -70°C. Todo el material y soluciones que se utilizaron fueron previamente esterilizados. Para determinar la eficiencia de transformación de las células, se electroporó una alícuota con 10 ng del plásmido súper-enrollado pUC19 (1 ng/µL) y se obtuvo la relación entre el número de colonias obtenidas y la cantidad de ADN utilizado.

#### **6.4. Construcción de librerías de ADNc a partir de ARN total.**

Todos los métodos comúnmente usados en la síntesis de ADNc se basan en la capacidad de transcriptasas reversas (RT) de transcribir el ARNm a moléculas de ADNc de cadena sencilla. En algunos casos, la RT termina antes de transcribir la totalidad de la secuencia de ARNm, sobre todo cuando las secuencias son largas y/o se emplea como primer oligo dT y/o el ARNm está muy estructurado. En consecuencia las poblaciones de ADNc tienden a tener subrepresentados los extremos 5'. Es por ello de vital importancia cuando se construyen bibliotecas de ADNc, el contar con un sistema que optimice la generación de ADNc's con regiones 5' íntegras. Para la generación de ADNc's íntegros, con los extremos 5' completos, se ha recurrido en este trabajo al uso de los kits "Creator™ SMART™ cDNA Library Constuction Kit" (Fig.8) y "BD Advantage™ 2 PCR Enzyme System", ambos de BD Biosciencias/Clontech.

##### **6.4.1. Extracción de ARN total.**

El ARN total se aisló de acuerdo al protocolo del Kit RNAgents Total ARN Isolation System (Promega®). El primer paso para la obtención del ARN total fue la homogenización del telson disectado a partir de un sólo individuo de cada una de las especies de alacranes, *Vaejovis punctatus* y *V. subcristatus*. La homogenización fue realizada con un homogenizador manual y se utilizó una solución desnaturizante en la que en un amortiguador de citratos se encuentra presente un detergente suave (N-lauril sarcosina), un potente inhibidor de las RNAsas ( $\beta$ -mercaptoetanol) y un agente caotrópico o desnaturizante (tiocianato de guanidinio) a alta concentración. En este punto se disuelven las membranas celulares y se desnaturalizan las proteínas celulares y el ADN. El siguiente paso fue la realización de una extracción orgánica en la cual la mezcla en solución desnaturizante se mezcla con solventes orgánicos (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, en una proporción 25:24:1, a un pH ácido) para extraer las proteínas, ADN y lípidos del medio, de manera tal que sólo queden azúcares, nucleótidos y ARN total. El último paso consistió en la precipitación del ARN total con isopropanol. En este paso se recuperó el ARN total de la célula con muy pocos contaminantes, con una pureza suficiente para realizar el RT-PCR.

#### 6.4.2. Síntesis y amplificación de ADNc.

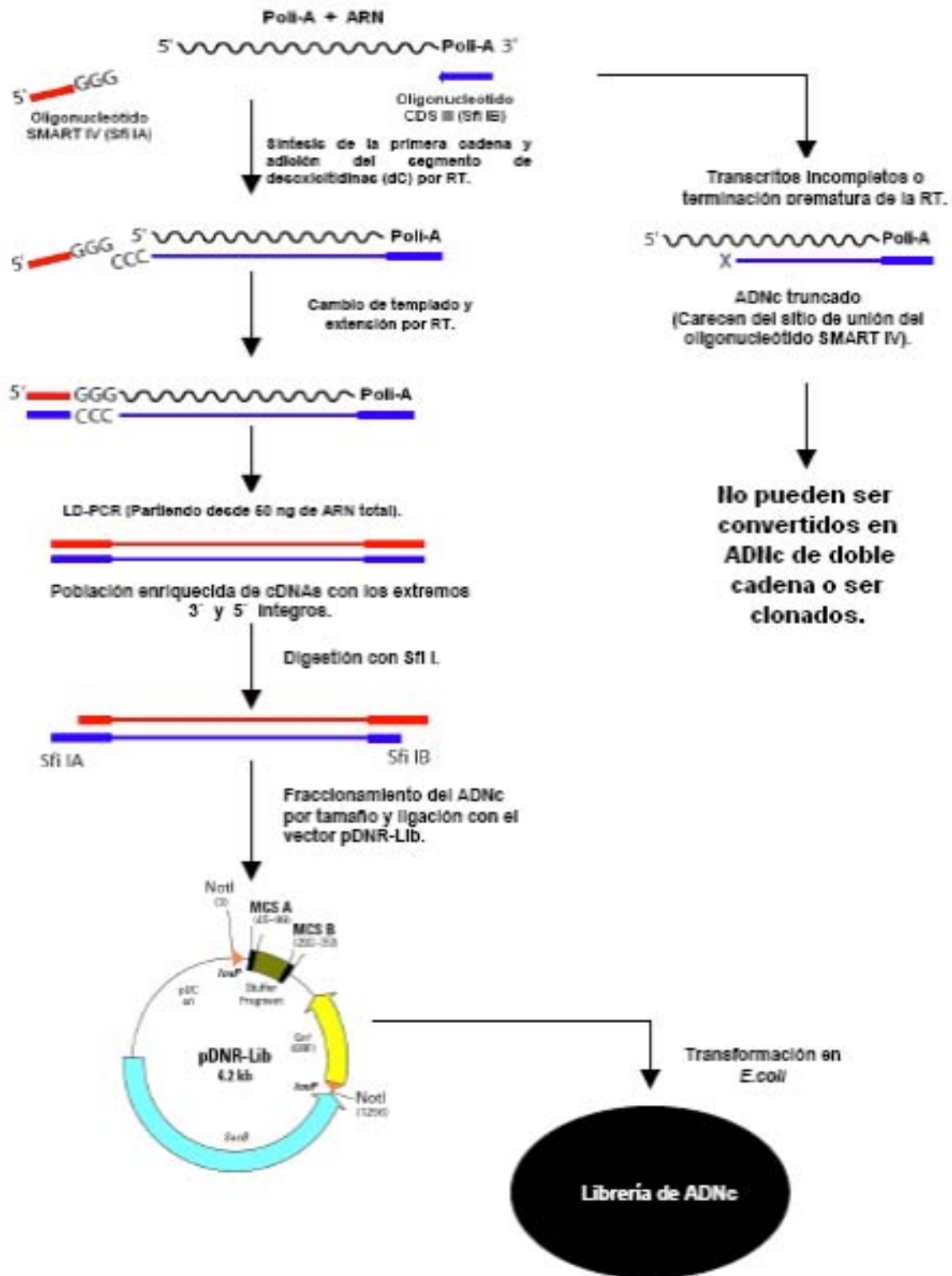
Este es un proceso de transcripción reversa en el que se utiliza la enzima MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), esta enzima es una transcriptasa reversa deficiente de actividad RNasa H y además posee actividad de transferasa terminal. En la reacción de RT-PCR se utiliza como templado el ARNm y los oligos CDS III/3' y SMART IV™ para generar la cadena de ADN complementaria (ADNc). El oligo CDS III/3' (5'ATTCTAGAGCCGAGGCCGCGGACATG-d(T)30N-1N-3') se ancla al extremo 3' no traducido del mRNA y sirve para amplificar cualquier secuencia de mRNA eucariótico que termine en poli-A (Fig.8). El oligo SMART IV™ (5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3') se ancla a 3 ó 5 residuos de citocina que son agregados a la cadena nascente del ADNc por la actividad transferasa terminal de la MMLV, la adición de estos nucleótidos se realiza cuando la enzima encuentra el final del extremo 5' conocido como "cap". Al aparearse el triplete GGG presente en el oligo SMART IV™ con el triplete CCC adicionado por la enzima, entonces la MMLV-RT cambia de templado para sintetizar la cadena complementaria hasta llegar una vez más al poli-A (Fig.8). El ADNc de doble cadena generado en el paso anterior se amplifica con el oligo 5' PCR Primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') y con el CDS III/3' utilizado en el RT-PCR. La enzima utilizada en esta reacción es la TITANIUM™ *Taq* DNA polimerasa. Las cantidades de los componentes de reacción así como de las condiciones de reacción se tomaron según recomendaciones presentadas en el manual de Creator™ SMART™ cDNA library construction Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Una vez culminada la reacción de amplificación, el producto de PCR fue tratado con Proteinasa K para inactivar la DNA polimerasa (TITANIUM™ *Taq* polymerase).

#### 6.4.3. Digestión con SfiI

Los sitios de restricción son introducidos en los productos de PCR desde la reacción de síntesis del ADNc, ya que tanto el oligo CDS III/3' como el SMART IV™ contienen en su secuencia los sitios SfiI. Los productos de PCR son digeridos con la enzima de restricción SfiI. La asimetría que presentan los sitios de restricción SfiIA y SfiIB permite generar una clonación directa (Fig.9).



**Fig.9. Sitios de restricción SfiI A y B.** En esta figura se muestran los sitios de restricción SfiI utilizados para clonar los genes de las bibliotecas de *V.punctatus* y *V. subcristatus* en el vector pDNR-lib. Nótese la asimetría que presentan estos dos sitios entre sí, esto permite realizar clonaciones direccionales, ya que el sitio SfiI A sólo podrá ligarse a otro sitio SfiIA, pero no a un sitio SfiIB.



**Fig.8:** Diagrama de flujo que representa el protocolo de síntesis de cDNA utilizando el método de **Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit protocols**. En el extremo derecho del esquema se representa la transcripción incompleta de moléculas de RNAm debido a que están muy estructuradas o en proceso de degradación.

#### 6.4.4. Clonación en DH5 $\alpha$

En esta etapa se ligan los productos de ADNc al vector seleccionado, se transforman los plásmidos recombinantes en *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes y se titula la biblioteca. La reacción de ligación se realizó a 16 °C durante toda la noche. En la tabla 2 se muestran los componentes de la reacción de ligación. La transformación se realizó utilizando un electroporador Micropulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en las siguientes condiciones: 2.5kV, 25 $\mu$ F y 200 $\Omega$ . Los 5 $\mu$ l de la reacción de ligación se pusieron en contacto con 50 $\mu$ l de células electrocompetentes en una celda de 0.2 mm, después de la electroporación, se adicionó 1ml de medio SOC a la celda para recuperar las células transformadas. La recuperación se realizó a 37 °C durante 1hr a 2500 rpm.

**Tabla. 2. Componentes de la reacción de ligación.**

<b>ADNc</b>	<b>1.0 (<math>\mu</math>l)</b>
<b>pDNR-LIB (0.1 <math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l)</b>	<b>1.0 (<math>\mu</math>l)</b>
<b>Buffer de Ligación 10X</b>	<b>0.5 (<math>\mu</math>l)</b>
<b>ATP (10mM)</b>	<b>0.5 (<math>\mu</math>l)</b>
<b>T4 DNA ligasa</b>	<b>0.5 (<math>\mu</math>l)</b>
<b>H<sub>2</sub>O Desionizada</b>	<b>1.5 (<math>\mu</math>l)</b>
<b>Volumen Total (<math>\mu</math>l)</b>	<b>5.0 (<math>\mu</math>l)</b>

#### 6.4.5. Lisis Alcalina (Minipreps)

Se purificó plásmido de 100 colonias de cada una de las bibliotecas (100 “minipreps”) por el método de lisis alcalina. Para una “miniprep”: se inocularon 3 mL de LB con una colonia aislada, más 3  $\mu$ L de Cloramfenicol (30 mg/mL) y se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación, 250 rpm. Al día siguiente el cultivo fue centrifugado, durante 2 minutos a temperatura ambiente y 600 rpm. Se descartó el sobrenadante y el “pellet” fue resuspendido, en 200  $\mu$ l de la solución I, con ayuda de un agitador tipo vortex. Después, se adicionaron a las células 200  $\mu$ L de la **solución II** fresca (**ver sección 6.1**). Se mezcló por inversión y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Después se agregaron 200  $\mu$ L de la **solución III** fría, se mezcló por inversión y se volvieron a incubar en hielo pero esta vez durante 10 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación se centrifugó la muestra por 10 minutos a una velocidad de 12000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionaron 800  $\mu$ L de etanol al 100%, se mezcló por inversión o vortex y después de incubar la muestra a temperatura ambiente durante 2 minutos se centrifugó por un tiempo de 10 minutos a 12000 rpm. Se decantó y se adicionaron 500  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifugó 1 minuto a 12000 rpm y se descartó el sobrenadante, este

paso se realizó dos veces. Una vez realizado lo anterior el ADN fue incubado a 37°C con el objetivo de secarlo y eliminar restos de etanol. Ya seco el ADN, se resuspendió en 50µL de agua tetradestilada y se le adicionó 1 µL de RNasa a una concentración de 4mg/mL. Cada una de las minipreps fueron verificadas y cuantificadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para posteriormente mandar a secuenciar el inserto clonado.

#### **6.4.6. Secuenciación de ADN**

La secuenciación del DNA fue realizada utilizando un equipo automatizado (Model CG1-96, Corbett Research Pty Ltd; Sydney, Australia) y los oligonucleótidos estándar: T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3') y el M13rev (5'-AACAGCTATGACCATGTTTAC-3'). Para la caracterización de las bibliotecas se recurrió a la secuenciación de las clonas con inserto previamente verificadas por PCR de colonia.

#### **6.4.7. Análisis de secuencias de ADN y predicción de secuencias de Aminoácidos *in silico*.**

Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas con ayuda del programa ApE- A plasmid Editor v1.12 y comparadas con la base de datos del BLAST, utilizando los algoritmos Blastn, Blastx y Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Los alineamientos múltiples presentados en el presente trabajo fueron realizados utilizando el programa CLUSTALX (2.0) y para la presentación de los datos utilizamos CLC Sequence Viewer 6.3. La predicción del péptido maduro, el péptido señal y el propéptido de los productos génicos fue hecha con el programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

### **6.5. Ensayos de actividad antibacteriana**

Con el fin de caracterizar la probable actividad de los productos peptídicos codificados por algunos de los genes aislados de la biblioteca de *Vaejovis subcristatus* (identificados en este trabajo) y compararlos con sus homólogos aislados de una biblioteca de *Vaejovis mexicanus smithi*, se sintetizaron químicamente los péptidos VmCT1, VmCT2 (de *Vaejovis mexicanus smithi*), VsCT1 y VsCT2 (de *Vaejovis subcristatus*). Estos péptidos fueron caracterizados funcional y estructuralmente bajo la metodología que a continuación se detalla.

#### **6.5.1. Síntesis de péptidos**

Los péptidos sintéticos fueron manufacturados con el extremo C-terminal amidado por GenScript USA Inc (New Jersey, USA) y entregados crudos. Para los ensayos de actividad, los péptidos fueron purificados por HPLC de fase reversa utilizando una columna C<sub>4</sub> (Vydac, Hysperia CA) analítica con un gradiente de 20 a 80% de B en 80 min (Solvente A: 0.12% de TFA en agua, solvente B: 0.10% TFA en Acetonitrilo). Los datos fueron registrados a 230 nm. El peso molecular de los péptidos puros (>95% de pureza) fue confirmado por espectrometría de masas utilizando un equipo Finnigan LCQDUO electrospray ionization ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA) (Tabla 1).

### 6.5.2. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 6399, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Streptococcus agalactiae* la cual fue un aislado clínico.

### 6.5.3. Ensayos antibacterianos

Las curvas de inhibición de crecimiento bacteriano y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) fueron realizadas utilizando el método de micro-dilución en medio Mueller–Hinton líquido siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, <http://www.clsi.org>). La concentración mínima inhibitoria fue definida como la concentración más baja del péptido a la cual se inhibe el 100% de crecimiento bacteriano observado. Se prepararon viales con las siguientes concentraciones de cada uno de los péptidos puros (VmCT1, VmCT2, VsCT1 y VsCT2): 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 50  $\mu$ M. Los viales fueron secados y los péptidos resuspendidos en 5  $\mu$ l de Acetonitrilo+H<sub>2</sub>O a una proporción 1:1. A cada uno de los viales se les adicionó una suspensión de 195  $\mu$ l de caldo Mueller–Hinton con una concentración celular, de la cepa a analizar, de  $5.95 \times 10^6$  UFC /ml obteniendo un volumen final de 200  $\mu$ l los cuales fueron adicionados a uno de los 96 pozos de una placa de cultivo tipo ELISA. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el monitoreo de la inhibición del crecimiento bacteriano fue realizado cada 4 hrs, durante 16 horas de incubación, por absorbancia a 620 nm en un lector de micro-placas (BIO-RED, Model 450). Como control positivo se utilizó sólo la suspensión de bacterias correspondiente a cada una de las cepas y como control negativo se utilizó medio Mueller–Hinton estéril.

### 6.5.4. Ensayos de hemólisis

La actividad hemolítica fue determinada incubando una suspensión de eritrocitos humanos, proveniente de un individuo sano, con varias concentraciones de cada uno de los péptidos. Las células rojas fueron lavadas centrifugando varias veces a 3,000 g durante 5min con PBS 1X pH 7.4. Los eritrocitos fueron contados en un hemocitómetro y se ajustaron a una concentración de  $6 \times 10^8$  cel/ml. Los eritrocitos fueron entonces incubados a 37 °C durante una hora en Tritón X-100 al 10% (Control positivo), en PBS 1X pH 7.4 (Blanco) y con los péptidos sintéticos en las concentraciones de: 1, 5, 12.5, 25 y 50  $\mu$ M. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000g durante 5 min, el sobrenadante fue utilizado para medir la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 V3.5.2 (9,12). La densidad óptica relativa comparada con la del control positivo (Tritón X-100 al 10%) define el porcentaje de hemólisis (9,12). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

### 6.5.5. Dicroísmo Circular (DC)

El espectro de Dicroísmo Circular (DC) de los péptidos fue realizado con un Espectropolarímetro Jasco J-710 (Jasco, Japan). El espectro fue medido en un rango de 260 a 190 nm en 60% de TFE (Trifluorohetanol), pH 7.1, a temperatura ambiente y utilizando una celda de 1 mm de longitud. Los datos fueron colectados a 0.1nm con

una velocidad de "scan" de 20 nm/min. La concentración de los péptidos fue de 80 µg/250 µl. Las mediciones fueron hechas por triplicado.

## 7.0. RESULTADOS

Se lograron generar dos bibliotecas de ADNc correspondiente al ARNtotal presente en las glándulas venenosas de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*, ambas especies distribuidas en territorio mexicano. El título de las bibliotecas no amplificadas fue de  $1.3 \times 10^5$  para *V. subcristatus* y de  $1.03 \times 10^6$  para *V. punctatus* con una eficiencia del 95 y 97% de clonas recombinantes respectivamente. La diversidad y abundancia por tamaño de los RNAm puede ser observada en la Fig.10, en la cual los transcritos con un tamaño de aproximadamente 500 bp (0.5 Kb) son los más abundantes en ambas especies. En el caso de *V. punctatus* se observa una banda muy prominente entre 1.0 y 1.5 Kb. En general, se observa que los transcritos más abundantes (bajo las condiciones de trabajo aquí realizadas), se ubican en un tamaño que va de los 2.0 a los 0.5 Kb, rango en el cual pueden estar los transcritos correspondientes a los precursores de toxinas y péptidos antimicrobianos.

Una vez clonadas las bibliotecas y calculado el título de cada una de ellas, se aislaron clonas al azar de las cuales se realizaron PCR's de colonia para verificar la presencia de los insertos (Fig.11) y el tamaño aproximado de los mismos. Posteriormente se purificó el DNA plasmídico de 100 clonas, aisladas al azar de cada una de las bibliotecas, para su secuenciación.

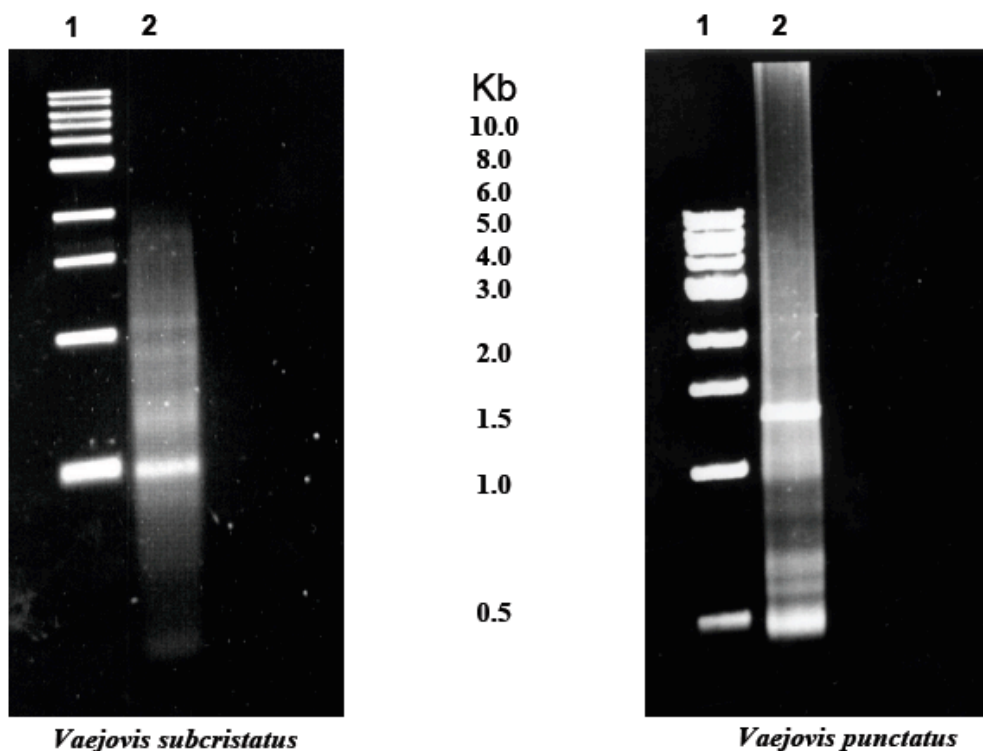
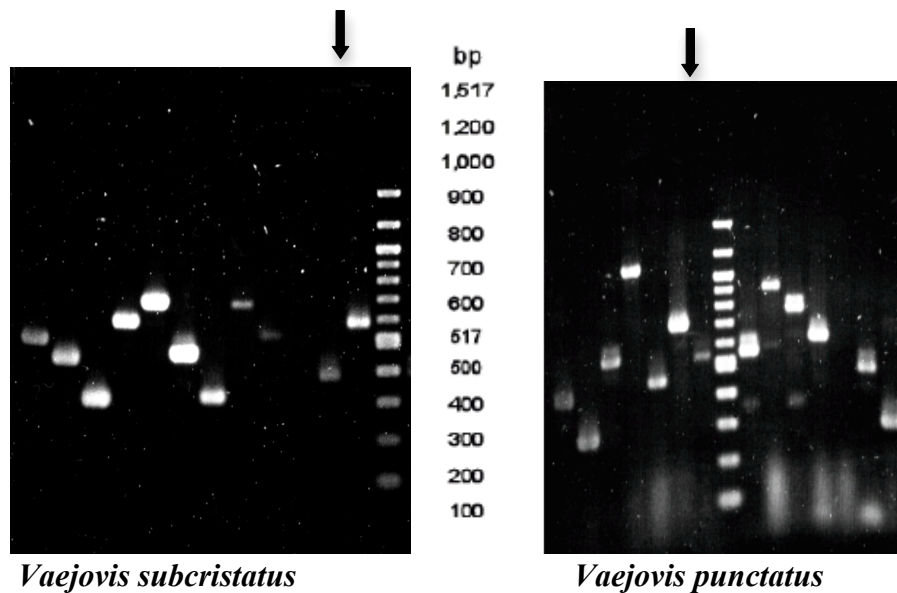


Fig. 10. Electroforesis de los productos de cDNA amplificados por PCR de *V. subcristatus* y *V. punctatus*. 1: Marcador de peso molecular: 1Kb, 5µl (New England). 2: cDNA doble cadena: 5 µl de 100 µl.

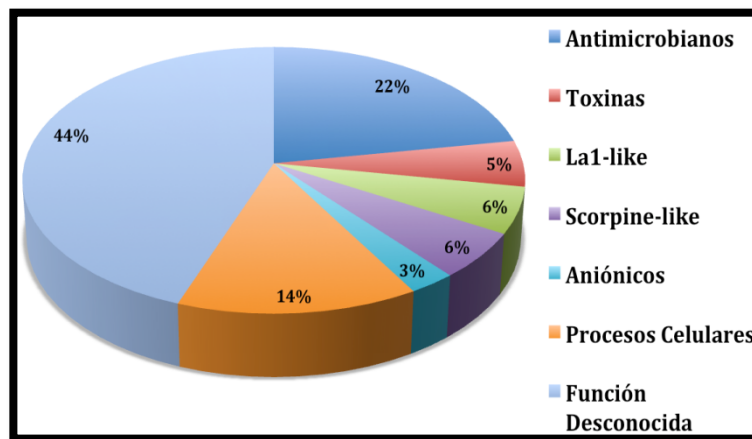




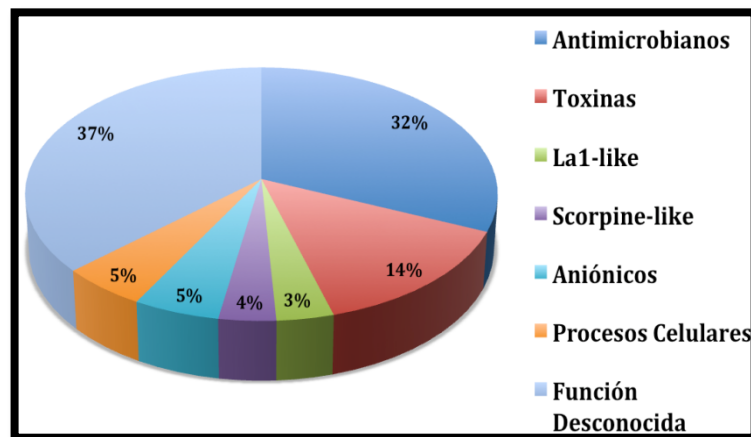
**Fig. 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR de colonia.** Las fotografías de los geles muestran la diversidad de tamaños de los insertos de las librerías de *Vaejovis subcristatus* y *V. punctatus*. El tamaño del vector pDNR-LIB es de 4.2 Kb y el tamaño del fragmento sin inserto que se amplifica utilizando los oligonucleótidos T7 y M13 es de aproximadamente 455 bp (Ver Materiales y métodos). Por lo tanto, fragmentos menores a 500 pb son descartados para secuenciar. Productos de PCR de colonia con tamaños menores a los 400pb representan clones recombinantes con insertos muy cortos de aproximadamente entre 60 y 100 pb los cuales cuando son ligados al vector dan origen a productos de entre 275 y 315 pb. Esta última población de productos es muy pequeña, alrededor del 3%, sin embargo está presente. Las flechas indican el marcador de peso molecular: 100 bp, 5µl (New England). En cada pozo se cargaron 3 µl de una reacción de PCR.

Las secuencias de ADNc obtenidas fueron analizadas con el programa ApE- A plasmid Editor v1.12, con este mismo programa se obtuvieron las secuencias de aminoácidos correspondientes a las secuencias de ADNc. Tanto las secuencias de ADNc como las de aminoácidos fueron sometidas a la base de datos del BLAST, utilizando los algoritmos Blastn, Blastx y Blastp. El análisis comparativo de las secuencias indica que los transcritos aislados de las bibliotecas de *V.punctatus* y *V.subcristatus* presentan similitud e identidad en su secuencia con componentes aislados previamente de otras especies de alacranes Bútidios y no Bútidios. En base a la similitud que presentan las secuencias obtenidas en este trabajo con estos péptidos previamente identificados y a la función que presentan estos últimos, hemos agrupado a las secuencias obtenidas en siete grupos: Antimicrobianos, Toxinas, Péptidos aniónicos, Scorpine-like, La1-Like, Procesos celulares y Función desconocida (Fig.12). Los transcritos agrupados dentro de la categoría de procesos celulares representan el 14 y el 5% en la glándula venenosa de *V.subcristatus* y *V.punctatus*, respectivamente. Este grupo contempla proteínas ribosomales, estructurales y enzimáticas. Los transcritos correspondientes al grupo de toxinas representan el 5 y 14% en la glándula venenosa de *V.subcristatus* y *V.punctatus*, respectivamente. En este grupo ubicamos a las secuencias que presentan similitud con toxinas de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. La categoría de los péptidos antimicrobianos está representada por 22 y 32% en la glándula venenosa de *V.subcristatus* y *V.punctatus*, respectivamente. En este grupo encontramos secuencias que presentan similitud con integrantes de las subfamilias NDBP-3, NDBP-4 y NDBP-5. La categoría de péptidos con función desconocida está constituida, tanto por secuencias que no

presentaron similitud alguna con secuencias previamente descritas, así como por aquellas que presentaron similitud con secuencias previamente descritas pero que su función no ha sido determinada; esta categoría representa el mayor número de secuencias en ambas bibliotecas con el 44% de los transcritos para *V.subcristatus* y de 37% para *V.punctatus*. El resto de las categorías (péptidos aniónicos, Scorpine-like y La1-Like) representan juntas el 15 y el 12% de los transcritos en la glándula venenosa de *V.subcristatus* y *V.punctatus*, respectivamente (Fig.12).



*Vaejovis subcristatus*



*Vaejovis punctatus*

**Fig.12. Proporción relativa de las diferentes categorías de los transcritos obtenidos de las bibliotecas de *V.subcristatus* y *V.punctatus*.** En la parte superior se presenta en una gráfica de pastel la proporción relativa de los transcritos de *V.subcristatus* y en la parte inferior los transcritos de *V.punctatus*. Los transcritos fueron agrupados en siete categorías dependiendo su similitud con secuencias previamente caracterizadas y depositadas en la base de datos. Los transcritos asignados en la categoría de péptidos sin función conocida representan el mayor porcentaje en ambas bibliotecas y representan aquellos transcritos para los cuales no se encontró similitud con alguna otra secuencia previamente reportada. En esta categoría también son agrupadas aquellas secuencias que presentaron similitud con secuencias previamente descritas pero de las cuales se desconoce su función. Los valores porcentuales para cada categoría y para cada biblioteca son: *V.subcristatus*: Antimicrobianos 22%, Toxinas 5%, La1-like 6%, Scorpine-like 6%, Péptidos Aniónicos 3%, Procesos celulares 14% y Función desconocida 44%. *V. punctatus*: Antimicrobianos 32%, Toxinas 14%, La1-like 3%, Scorpine-like 4%, Péptidos Aniónicos 5%, Procesos celulares 5% y Función desconocida 37%.

## Secuencias representativas obtenidas de ambas bibliotecas:

### Péptidos homólogos a La1

La1 es el péptido más abundante del veneno del alacrán *Liocheles australasiae* y aunque su función no ha sido definida [61], se han encontrado homólogos de este péptido tanto en alacranes del viejo como del nuevo mundo. Algunos de los alacranes que presentan en su veneno péptidos homólogos a La1 pertenecen a las familias Ischnuridae, Euscorpiidae, Scorpionidae, Buthidae y ahora también Vaejovidae. La1 contiene 73 aa con una masa molecular de 7781.6 Da. y ocho residuos de cisteínas [61]. En la figura 13, se presenta la secuencia nucleotídica de tres transcritos (obtenidos en este trabajo) que codifican para precursores peptídicos homólogos a La1. Tanto Vp<sub>1</sub>-La1 como Vp<sub>2</sub>-La1 pertenecen a *Vaejovis punctatus*, mientras que Vs<sub>1</sub>-La1 pertenece a *Vaejovis subcristatus*. En la figura 14, se comparan las secuencias de aminoácidos correspondientes a homólogos del péptido La1, aislados de varias especies de alacranes, con los obtenidos en este trabajo. Aunque el porcentaje de identidad entre los péptidos de *Vaejovis* y La1 es relativamente bajo (entre 32.5 y 27.3%) la ubicación de los residuos de cisteínas están conservados, incluyendo las dos cisteínas continuas.

Un dato interesante es el hecho de que a nivel de estructura primaria y por la posición de los residuos de Cys este tipo de péptidos también se encuentran en otros arácnidos diferentes de los alacranes como es el caso de *Ixodes scapularis* y además también se encuentran en insectos como en el caso de *Drosophila melanogaster* lo cual sugiere que tal vez los péptidos homólogos a La1 poseen un origen ancestral común [61].

En la figura 14A, se muestra el porcentaje de identidad entre Vp<sub>1</sub>-La1 y Vs<sub>1</sub>-La1(86.2%) es mayor que el que se presenta entre Vp<sub>1</sub>-La1 y Vp<sub>2</sub>-La1 (23.8%). Por otro lado Vp<sub>1</sub>-La1 y Vs<sub>1</sub>-La1 presentan mayor identidad con el péptido La1 de *Liocheles australasiae* y su homólogo aislado de *Pandinus cavimanus* [62]. Adicionalmente Vp<sub>2</sub>-La1 presenta mayor identidad con OcyC11 de *Opisthacanthus cayaporum* y TXLP1 de *Mesobuthus martensii* como se muestra en la figura 16B. Pese a que la función específica de este péptido no ha sido determinada, La1 puede ser considerado como un componente ubicuo del veneno de los alacranes.

### Toxinas de Sodio (NaScTxS).

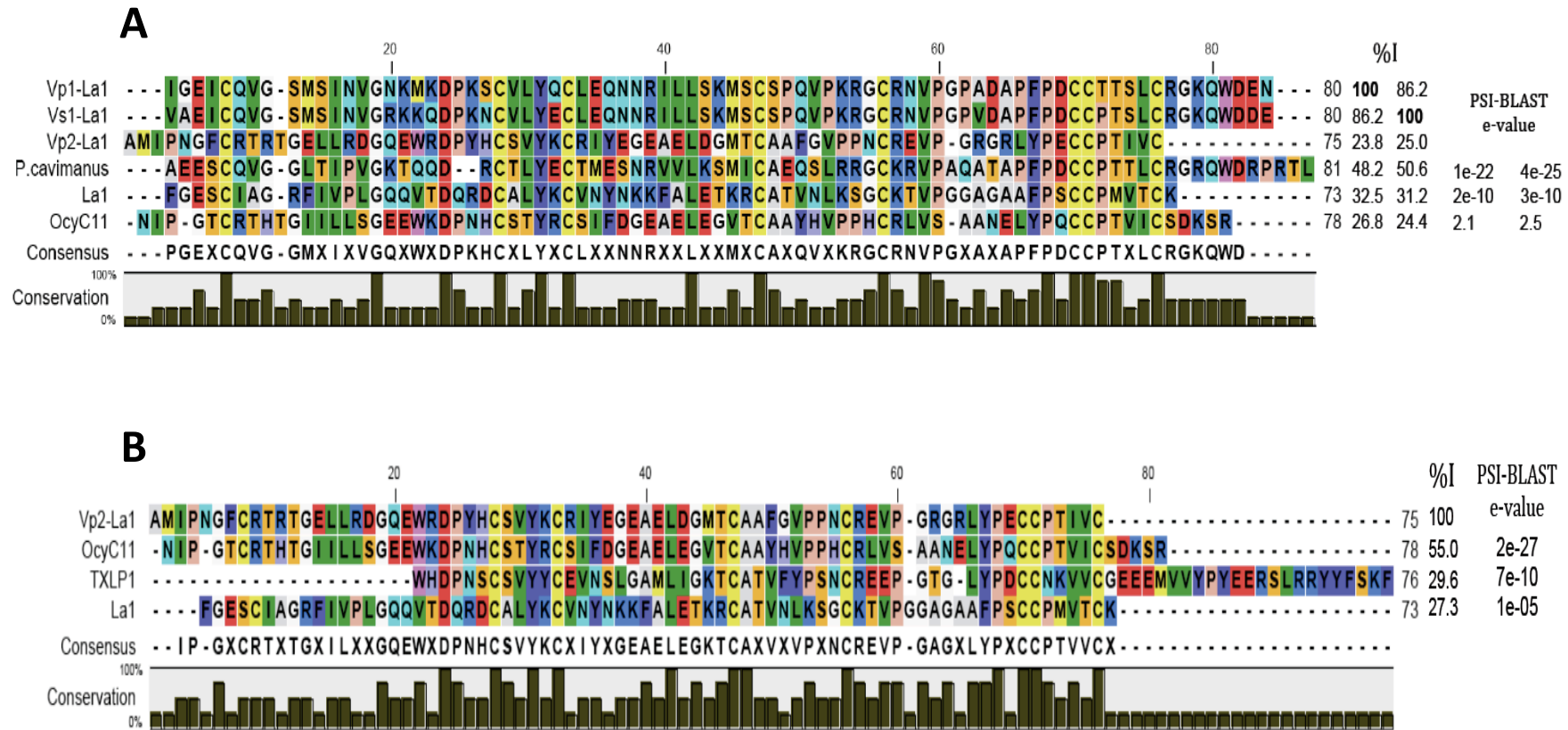
Como se mencionó en la sección 2.2.1, las NaScTxS son polipéptidos de 58 a 76 residuos de aminoácidos (6500-8500 Da) que presentan un núcleo estructural conservado con una topología  $\beta\alpha\beta\beta$  estabilizada por cuatro puentes disulfuro. Dos de los puentes disulfuro se encuentran uniendo la región  $\alpha$ -hélice a una de las láminas  $\beta$ -plegadas y un tercer puente disulfuro une otra lámina  $\beta$  a un segmento extendido que precede la  $\alpha$ -hélice. En cuanto al cuarto puente disulfuro, este puede variar de posición e incluso puede estar ausente en algunos casos como el de algunas  $\beta$ -toxinas no clásicas. Ejemplo de estas es la Birtoquina y sus homólogos [17, 63, 64]. En este trabajo presentamos las secuencias de 4 transcritos que codifican para péptidos que presentan cierta similitud en su estructura primaria con homólogos de la Birtoquina y con péptidos activadores de lipólisis (Fig.15 y 16). De estos cuatro transcritos, dos han sido aislados de la biblioteca de *Vaejovis punctatus* y nombrados como VpNaTx1 y VpNaTx2, mientras que VsNaTx1 y VsNaTx2 fueron aislados de la biblioteca de *V.subcristatus*.

### Péptidos homólogos a La1.

Vs <sub>1</sub> -La1	1	ATG	AAG	CAT	TTT	TGC	GTA	GTT	GTT	CTT	TTT	GGT	TGT	TTA	TCA	TTA	TGC	ACT	CTT	TTC	TCT	60		
Vp <sub>1</sub> -La1	1	ATG	AGG	CAT	TTG	TGC	ATC	GTT	GTT	CTT	TTT	GGT	TGT	TTA	TCA	TTT	TGC	ACT	CTT	TTC	TCT	60		
Vp <sub>2</sub> -La1	1	ATG	AAA	GCA	ACT	TGC	TCC	ATT	TTA	ATA	TTC	TTG	GTG	GTG	TTT	TAC	GCT	GTA	AAT	GCA	GCT	60		
Vs <sub>1</sub> -La1	1	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>H</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	20		
Vp <sub>1</sub> -La1	1	<u>M</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	20		
Vp <sub>2</sub> -La1	1	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	20		
Vs <sub>1</sub> -La1	61	TTT	TCA	AAA	GGA	GTT	GCA	GAG	ATT	TGC	CAA	GTG	GGG	AGC	ATG	TCA	ATA	AAT	GTT	GGA	AGA	120		
Vp <sub>1</sub> -La1	61	TTT	TCA	AAA	GGA	ATT	GGA	GAA	ATT	TGC	CAA	GTG	GGG	AGC	ATG	TCA	ATA	AAT	GTT	GGA	AAC	120		
Vp <sub>2</sub> -La1	61	ATG	ATC	CCG	AAC	GGA	TTC	TGC	AGA	ACA	AGA	ACA	GGA	GAA	CTT	TTA	CGA	GAT	GGT	CAA	GAA	120		
Vs <sub>1</sub> -La1	21	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	40		
Vp <sub>1</sub> -La1	21	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	40		
Vp <sub>2</sub> -La1	21	<u>M</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	40		
Vs <sub>1</sub> -La1	121	AAG	AAG	CAA	GAT	CCT	AAA	AAC	TGC	GTC	CTT	TAT	GAA	TGT	CTT	GAG	CAA	AAC	AAT	CGA	ATA	180		
Vp <sub>1</sub> -La1	121	AAG	ATG	AAG	GAT	CCT	AAA	AGC	TGC	GTC	CTT	TAT	CAA	TGT	CTT	GAG	CAA	AAC	AAT	CGA	ATA	180		
Vp <sub>2</sub> -La1	121	TGG	AGG	GAC	CCC	TAT	CAT	TGT	TCT	GTA	TAT	AAA	TGT	AGA	ATA	TAC	GAA	GGT	GAA	GCT	GAA	180		
Vs <sub>1</sub> -La1	41	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>I</u>	60		
Vp <sub>1</sub> -La1	41	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>I</u>	60		
Vp <sub>2</sub> -La1	41	<u>W</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>H</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	60		
Vs <sub>1</sub> -La1	181	CTA	CTC	AGT	AAA	ATG	AGT	TGT	TCT	CCA	CAA	GTA	CCA	AAA	CGT	GGA	TGC	AGA	AAT	GTG	CCT	240		
Vp <sub>1</sub> -La1	181	TTG	CTT	AGT	AAG	ATG	AGT	TGT	TCT	CCG	CAA	GTA	CCA	AAA	CGT	GGA	TGC	AGA	AAT	GTG	CCT	240		
Vp <sub>2</sub> -La1	181	CTT	GAT	GGC	ATG	ACA	TGC	GCA	GCA	TTT	GGT	GTC	CCA	CCT	AAT	TGT	AGA	GAA	GTT	CCA	GGT	240		
Vs <sub>1</sub> -La1	61	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	80		
Vp <sub>1</sub> -La1	61	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	80		
Vp <sub>2</sub> -La1	61	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	80		
Vs <sub>1</sub> -La1	241	GGT	CCA	GTT	GAT	GCT	CCA	TTC	CCT	GAC	TGC	TGT	CCC	ACG	TCT	CTT	TGC	CGA	GGA	AAA	CAA	300		
Vp <sub>1</sub> -La1	241	GGT	CCA	GCT	GAT	GCT	CCA	TTC	CCT	GAC	TGC	TGT	ACC	ACG	TCT	CTT	TGC	CGA	GGA	AAA	CAA	300		
Vp <sub>2</sub> -La1	241	AGA	GGA	AGA	CTT	TAC	CCA	GAA	TGC	TGC	CCC	ACC	ATA	GTG	TGC	TAA	GAAAAAAAAATCACAGTCAACAA							
Vs <sub>1</sub> -La1	81	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	100		
Vp <sub>1</sub> -La1	81	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	100		
Vp <sub>2</sub> -La1	81	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<b>stop</b>								
Vs <sub>1</sub> -La1	301	TGG	GAT	GAT	GAA	TAA	GGAATCCAAATGATATCCAAGCGATTTCTGTGTTTTAAATCTCCAACACACTATTCATTTTATTT																	
Vp <sub>1</sub> -La1	301	TGG	GAT	GAA	AAT	TAA	GGAATCCAAATGATATCCAAGCAATTTCTGTGTTTTAAATCTCCAACACACTACTAATTTTATTT																	
Vp <sub>2</sub> -La1		TATAATGAAGAAATTGGAAATGCTTGTTACATTTATTTCTGAATTAATAATCCAGATATATGTAGTAACTGTCTG <u>AAATAAAA</u> TATAAGGGGTAT																						
Vs <sub>1</sub> -La1	101	<u>W</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<b>stop</b>																		
Vp <sub>1</sub> -La1	101	<u>W</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<b>stop</b>																		
Vs <sub>1</sub> -La1		GAAATTTTAAACAATTGTTATTTTAAAAG <u>AAATAAAA</u> TATATTGT-polyA 3'																						
Vp <sub>1</sub> -La1		GAAATTTTAAACAATTGTTATTTTAAAAG <u>AAATAAAA</u> TGTATTGCAAAAATTTAATTTTCATTATTTCTCGATACTATCTTCTACTGTGGTTT																						
Vp <sub>2</sub> -La1		TCCCATATGATGCGG-polyA 3'																						
Vp <sub>1</sub> -La1		AGAAAAGTGATANGTGGGATTACGCTAATATTTAAACTAATAG-polyA 3'																						

**Fig.13. Secuencia del cDNA y de aminoácidos correspondiente a los precursores peptídicos homólogos al péptido La1.** Vs<sub>1</sub>-La1 corresponde a la secuencia obtenida de *V.subcristatus* y Vp<sub>1</sub>-La1 y Vp<sub>2</sub>-La1 fueron obtenidas de *V.punctatus*. Los primeros aminoácidos subrayados corresponden a la secuencia del péptido señal (24 aa de longitud para Vs<sub>1</sub>-La1 y Vp<sub>1</sub>-La1; y de 19 aa de longitud para Vp<sub>2</sub>-La1). La secuencia del péptido maduro se presenta en negritas y los residuos de Cys se muestran subrayados para las tres secuencias. Las tres secuencias de nucleótidos presentan en letras subrayadas el probable sitio de poliadenilación.

## Péptidos homólogos a La1.



**Fig. 14. Alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes al péptido maduro de Vs1-La1, Vp1-La1 y Vp2-La1.** En A se comparan Vs1-La y Vp1-La con La1, Vp2-La y otros péptidos La1-like. En B se muestra un alineamiento independiente para Vp2-La1 con otros péptidos La1-like. En ambos alineamientos se muestran los porcentajes de identidad global de las secuencias. También se muestran los valores de “E-value” obtenidos utilizando el algoritmo PSI-BLAST. En la parte inferior de cada alineamiento se presenta una secuencia consenso y una grafica de porcentaje de conservación de cada residuo. OcyC11 fue aislado de *Opisthacanthus cayaporum* y TXLP1 de *Mesobuthus martensii*.

Estos péptidos presentan un péptido señal de 23 aa de longitud, a excepción de VpNaTx1 que tiene 21 aa. Poseen un péptido maduro que va de los 57 a los 62 aa de longitud y presentan seis residuos de Cys, lo cual sugiere que su estructura se encuentra estabilizada por tres puentes disulfuro.

La Birtoxina y sus homólogos representan un grupo de péptidos similares a las toxinas de Na<sup>+</sup> típicas, con la excepción de que estos péptidos sólo presentan tres puentes disulfuro en lugar de cuatro como es el caso de la mayoría de las toxinas de Na<sup>+</sup> [65]. La Birtoxina y sus péptidos análogos han sido agrupados y considerados como un grupo hermano de las dos principales familias de toxinas de Na<sup>+</sup>, las alfa y las beta toxinas.

Actualmente existen más de 25 secuencias descritas y que componen la familia de las Birtoxinas[64]. La Birtoxin, Altitoxin, Bestoxin, Ikitoxin y Dortoxin son péptidos aislados del alacrán *Parabuthus transvaalicus*. Estos péptidos exhiben actividades farmacológicas diversas, pero en general se les ha considerado desde el punto de vista electrofisiológico como  $\beta$ -toxinas de Na<sup>+</sup> [63, 64]. La Dortoxin y Altitoxin son toxinas letales en ratones a cantidades de 200ng cada una; tanto Bestoxin como Ikitoxin son toxinas potentes pero no letales en ratones. En cuanto a la Birtoxin, es letal en ratones a bajas concentraciones[63,64]. *Parabuthus transvaalicus* es un alacrán del sur de África perteneciente a la familia Buthidae, algunos autores han propuesto que el principal componente tóxico presente en el veneno de este alacrán son los péptidos homólogos a la Birtoxina y por lo tanto son también los principales causantes de los efectos tóxicos en mamíferos [63].

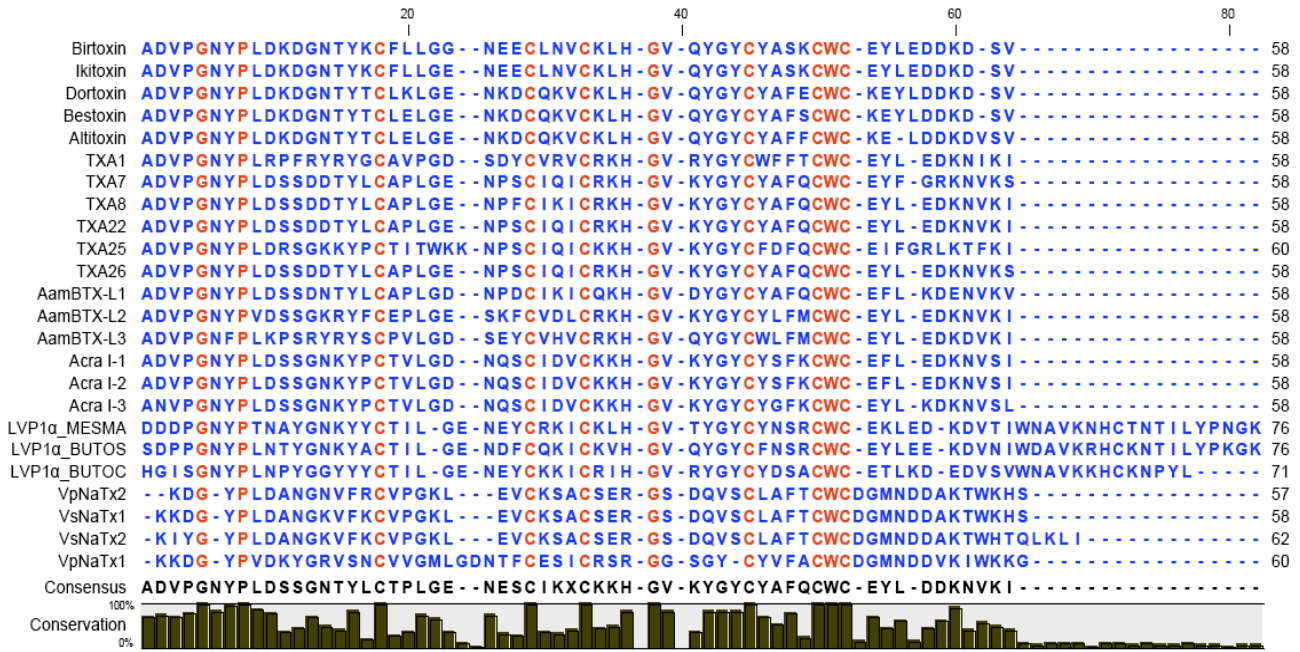
A excepción de la phaiodotoxina, aislada del alacrán mexicano *Anuroctonus phaiodactylus* (Familia Iuridae), todas las NaScTx's han sido aisladas de alacranes pertenecientes a la familia Buthidae [66]. Es muy interesante el hecho de que péptidos, homólogos a toxinas de canales de Na<sup>+</sup> estén presentes en alacranes no Buthidos, como los *Vaejovis*. Tanto las secuencias de VsNaTx1 y VsNaTx2, como la de VpNaTx1 y VpNaTx2 presentan también cierta similitud con las secuencias de la cadena  $\alpha$  de péptidos activadores de lipólisis (LVP's). Sin embargo, estos péptidos (LVP's) presentan en su secuencia siete residuos de Cys, ya que este séptimo residuo sirve para formar un enlace disulfuro intermolecular entre la cadena- $\alpha$  y la cadena- $\beta$  del péptido activador de lipólisis [67]. Dado que VsNaTx1, VsNaTx2, VpNaTx1 y VpNaTx2 presentan sólo seis residuos de Cys parece más probable que estas secuencias representen péptidos homólogos a la Birtoxin, por supuesto que esto tendría que ser probado mediante la búsqueda de estos péptidos en el veneno de los *Vaejovis* y probar su actividad mediante electrofisiología.



### Péptidos homólogos a NaScTx.

<b>VsNaTx1</b>	1	ATG	AAG	TGT	TTT	ACC	TTT	CTC	ACA	GTT	TGC	CTG	GCT	GTC	GTC	CTT	TTT	GAA	TTC	ACT	GAG	60
<b>VsNaTx2</b>	1	ATG	AAG	TGT	TTT	ACC	TTT	CTC	ACA	GTT	TGC	CTG	GCT	GTC	GTC	CTT	TTT	GAA	TTC	ACT	GAG	60
<b>VpNaTx1</b>	1	ATG	AAG	TGT	TAC	GCC	TTC	CTC	ACA	TTT	TGC	TTA	ATT	GTC	CTC	TTT	TTC	GAA	AGT	TCT	GAC	60
<b>VpNaTx2</b>	1	ATG	AAG	TGT	TTT	GCC	TTT	CTC	ACA	GTT	TGC	CTG	GCT	GTC	GTC	CTT	TTT	GAA	TTT	ACT	GAG	60
<b>VsNaTx1</b>	1	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	20
<b>VsNaTx2</b>	1	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	20
<b>VpNaTx1</b>	1	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	20
<b>VpNaTx2</b>	1	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	20
<b>VsNaTx1</b>	61	GTG	GAA	GGA	AAG	AAG	GAT	GGA	TAT	CCA	TTG	GAT	GCG	AAT	GGA	AAG	GTT	TTC	AAA	TGC	GTT	120
<b>VsNaTx2</b>	61	GTG	GAA	GGA	AAG	ATT	TAT	GGA	TAT	CCA	TTG	GAT	GCG	AAT	GGA	AAG	GTT	TTC	AAA	TGC	GTT	120
<b>VpNaTx1</b>	61	GGG	AAA	AAG	GAT	GGC	TAT	CCT	GTG	GAT	AAA	TAT	GGA	AGG	GTA	AGC	AAC	TGC	GTC	GTG	GGC	120
<b>VpNaTx2</b>	61	GTG	GAA	GGA	AAG	GAC	GGA	TAT	CCA	TTG	GAT	GCA	AAT	GGA	AAT	GTT	TTC	AGA	TGC	GTT	CCA	120
<b>VsNaTx1</b>	21	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	40
<b>VsNaTx2</b>	21	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	40
<b>VpNaTx1</b>	21	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	40
<b>VpNaTx2</b>	21	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	40
<b>VsNaTx1</b>	121	CCA	GGG	AAG	TTA	GAA	GTT	TGT	AAA	TCT	GCC	TGT	AGT	GAG	CGT	GGA	TCT	GAC	CAA	GTT	TCC	180
<b>VsNaTx2</b>	121	CCA	GGG	AAG	TTA	GAA	GTT	TGT	AAA	TCT	GCC	TGT	AGC	GAG	CGT	GGA	TCT	GAC	CAA	GTT	TCC	180
<b>VpNaTx1</b>	121	ATG	TTA	GGT	GAC	AAC	ACA	TTC	TGC	GAA	TCG	ATA	TGT	AGA	AGC	CGT	GGT	GGG	AGT	GGC	TAT	180
<b>VpNaTx2</b>	121	GGG	AAG	TTA	GAA	GTT	TGT	AAA	TCT	GCT	TGT	AGT	GAG	CGT	GGA	TCT	GAC	CAA	GTT	TCC	TGT	180
<b>VsNaTx1</b>	41	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	60
<b>VsNaTx2</b>	41	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	60
<b>VpNaTx1</b>	41	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	60
<b>VpNaTx2</b>	41	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	60
<b>VsNaTx1</b>	181	TGC	CTC	GCA	TTC	ACT	TGC	TGG	TGT	GAC	GGG	ATG	AAC	GAT	GAT	GCC	AAA	ACA	TGG	AAA	CAC	240
<b>VsNaTx2</b>	181	TGC	CTC	GCA	TTC	ACT	TGC	TGG	TGT	GAC	GGG	ATG	AAC	GAT	GAT	GCC	AAA	ACA	TGG	CAT	ACA	240
<b>VpNaTx1</b>	181	TGC	TAT	GTA	TTC	GCT	TGT	TGG	TGT	GAT	GGA	ATG	AAC	GAT	GAT	GTC	AAG	ATA	TGG	AAA	AAG	240
<b>VpNaTx2</b>	181	CTC	GCA	TTC	ACT	TGC	TGG	TGT	GAC	GGG	ATG	AAC	GAT	GAT	GCC	AAA	ACA	TGG	AAA	CAC	AGC	240
<b>VsNaTx1</b>	61	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>W</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>W</u>	<u>K</u>	<u>H</u>	80
<b>VsNaTx2</b>	61	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>W</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>W</u>	<u>H</u>	<u>T</u>	80
<b>VpNaTx1</b>	61	<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>W</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>W</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	80
<b>VpNaTx2</b>	61	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>W</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>W</u>	<u>K</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	80
<b>VsNaTx1</b>	241	AGC	TAA	<small>ATTGATATAGTCATTACTGGAATGATACGCACAAGGTTCTTATTGTCATAAGATAACATATTTTAAGCAAAATAAGTTTACTG-polyA</small>	<small>3'</small>																	
<b>VsNaTx2</b>	241	CAG	CTT	<small>AAA TTG ATA TAA TCATCACTGGGAAGGTTCTTATTGNNCCATAAAATAAAATATTTTAAGCAATTTACTGCACACACT-polyA</small>	<small>3'</small>																	
<b>VpNaTx1</b>	241	GGC	TAA	<small>AATCAATATTATTCTTTACCAGAAAACATGTGACCGATGTTTATGTTTCGTAAATAAAGTTTTCGCAAGCAATT-polyA</small>	<small>3'</small>																	
<b>VpNaTx2</b>	241	TAA	<small>ATTGATATAGTCATTACCGAATGATACGCACAAGGTTCTTATTGTCATAAATAAAATATTTTAAGCAAAATAATTTTCATTGCACAT-polyA</small>	<small>3'</small>																		
<b>VsNaTx1</b>	81	<b>S</b>																				<b>stop</b>
<b>VsNaTx2</b>	81	<b>Q</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>L</b>																	<b>I stop</b>
<b>VpNaTx1</b>	81	<b>G</b>																				<b>stop</b>
<b>VpNaTx2</b>	81																					<b>stop</b>

**Fig.15. Secuencias nucleotídicas y de aminoácidos del precursor de probables toxinas de Na<sup>+</sup> aisladas de *V.punctatus* y *V.subcristatus*.** En letras subrayadas se indican los residuos del péptido señal de cada una de las cuatro secuencias. En negritas se indica el péptido maduro con los residuos de Cys resaltados por una línea. La región 3' no codificante se muestra en letras más pequeñas con respecto a la región codificante, también se muestra el probable sitio de reconocimiento para la poliadenilación.



**Fig.16. Alineamiento múltiple del péptido maduro de probables toxinas de Na<sup>+</sup> de *V.punctatus* y *V.subcristatus* con un grupo de péptidos conocidos como “Birtoxin-like” y péptidos activadores de lipólisis (LVP1 $\alpha$ ).** En color rojo se resaltan los residuos conservados en todas las secuencias, nótese el patrón de Cys conservado en todas las secuencias incluyendo el motivo “CWC”. VpNaTx1 y VpNaTx2 fueron aisladas de *V.punctatus* (obtenidas en este trabajo), VsNaTx1 y VsNaTx2 fueron obtenidas de *V. subcristatus* (obtenidas en este trabajo), Birtoxin, Altitoxin, Bestoxin, Ikitoxin y Dortoxin son péptidos aislados del alacrán *Parabuthus transvaalicus*. Acra I-1, I-2 y I-3 fueron obtenidos del alacrán *Androctonus crassicauda* [65]. Las secuencias nombradas como TXA fueron obtenidas de *Androctonus australis*. LVP1 $\alpha$ \_MESMA se aisló de *Mesobuthus martensii*, LVP1 $\alpha$ \_BUTOC se aisló de *Buthus occitanus tunetanus* y LVP1 $\alpha$ \_BUTOS de *Buthus occitanus israelis*. Las secuencias aquí mostradas a excepción de las de *Vaejovis* fueron tomadas del alineamiento que se presenta en la referencia [64].

### Toxinas de Potasio (KScTx<sub>s</sub>).

Las  $\alpha$ -KTx son una familia de toxinas bloqueadoras de canales de K<sup>+</sup>. Estos péptidos están presentes en todos los alacranes estudiados hasta la fecha. Tienen una longitud de 22 a 48 aa y presentan una estructura tridimensional conservada constituida por una  $\alpha$ -hélice y dos o tres láminas  $\beta$ -plegadas estabilizadas por 3 ó 4 puentes disulfuro. De la biblioteca de ADNc de *Vaejovis punctatus* se logró aislar dos genes que, según los resultados del análisis de las secuencias de ADN y de los resultados obtenidos en la base de datos utilizando PSI-BLAST, codifican para el precursor peptídico de dos diferentes  $\alpha$ -KTx. En las figuras 17 y 18 se muestran las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de los dos transcritos. Las dos probables toxinas presentan similitud con miembros de la familia alfa de toxinas de K<sup>+</sup>. Sin embargo, estos dos péptidos denominados como VpKTx1 y VpKTx2 son diferentes entre sí. Una de las diferencias más notables es el número de residuos de Cys que presenta cada uno de estos péptidos. VpKTx1, a diferencia de VpKTx2, presenta ocho residuos de Cys mientras que VpKTx2 sólo presentan seis, lo cual significa que la estructura terciaria de VpKTx2 estaría estabilizada por tres puentes disulfuro y la de VpKTx1 lo estaría por cuatro puentes disulfuro. El resultado de la búsqueda con PSI-BLAST utilizando la secuencia de aminoácidos correspondiente a el péptido maduro, nos



indica que VpKTx1 posee una mayor similitud con algunos miembros de la subfamilia 6 de las  $\alpha$ -KTx. Como se muestra en la figura 17B, VpKTx1 comparte entre el 50 y 64% de identidad con péptidos bloqueadores de canales de  $K^+$  pertenecientes a la subfamilia  $\alpha$ -KTx-6, siendo la Hemitoxina del alacrán Iraní *Hemiscorpius lepturus* [68] con quien comparte una mayor identidad en su secuencia. VpKTx1 posee un péptido señal compuesto de 26 aa y un péptido maduro conformado por 37 aa de longitud (Fig.17A). Algunos miembros de la familia  $\alpha$ -KTx-6 actúan sobre la familia KV1.x de canales de  $K^+$ , además la Maurotoxina y Pi1 también actúan sobre canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  [69, 21].

VpKTx2, presenta un péptido maduro más largo (43 aa) en comparación con VpKTx1. En la figura 18A, se puede observar que VpKTx2 presenta un péptido señal de 18 aa de longitud. El péptido maduro presenta similitud con toxinas de  $K^+$  pertenecientes a las subfamilias  $\alpha$ -4,  $\alpha$ -7 y a un miembro de la familia  $\alpha$ -1 (Fig.18B). A pesar de que los porcentajes de identidad global que se presentan en el alineamiento son bajos (de 37.5 a 44.2 %), el patrón de Cys se conserva.

## Calcinas

Las calcinas son toxinas presentes en baja proporción en el veneno de alacranes Bútidios y no Bútidios. Estas toxinas han mostrado actividad sobre receptores de rianodina los cuales son un tipo de canales de calcio distribuidos tanto en músculo cardiaco como en músculo esquelético [35-38]. Estas toxinas ricas en residuos de Arg y Lys poseen la capacidad de penetrar las células vía interacción con la membrana lipídica [38]. Estructuralmente estas toxinas presentan tres puentes disulfuro, la conectividad que presentan es topológicamente clasificada como un plegamiento del tipo “inhibitor cystine knot” el cual también es presentado por un amplio número de polipéptidos de diversas especies de animales [70]. En la figura 19A, se presenta la secuencia de ADNc y de aminoácidos de VpTx4 un precursor de una probable calcina presente en la glándula venenosa de *V.punctatus* identificada en este trabajo.

La estructura del precursor de VpTx4 presenta un péptido señal de 27 aa, un propéptido de 10 aa y el péptido maduro de 33 aa. Esta conformación del precursor está presente en otros precursores correspondientes a calcinas aisladas en otras especies de alacranes [36-38]. La secuencia del péptido maduro correspondiente a VpTx4 fue sometido a la base de datos utilizando el algoritmo PSI-BLAST. El resultado fue una considerable similitud con secuencias correspondientes a calcinas de alacrán. Como se puede ver en la figura 19B, VpTx4 presenta un 81.8% de identidad con la Maurocalcina de *Scorpio maurus palmatus*, 78.8% con la Opicalcina-1 y 75.8% con la Opicalcina-2 ambas aisladas de *Opisthophthalmus carinatus*, 69.7% con la Imperatoxina-A de *Pandinus imperator* y 68.6% con la Hadrucalcina de *Hadrurus gertschi* (Familia Caraboctonidae), este último endémico de México[53]. Como se puede apreciar en el alineamiento, el péptido maduro correspondiente a VpTx4 presenta el patrón de cisteínas característico de las calcinas de alacranes, el cual es  $CX_6CX_5CCX_3CX_{10}C$ , en donde X puede ser cualquier aminoácido.

## VpKTx1: $\alpha$ -KTx de *Vaejovis punctatus*

**A**

```

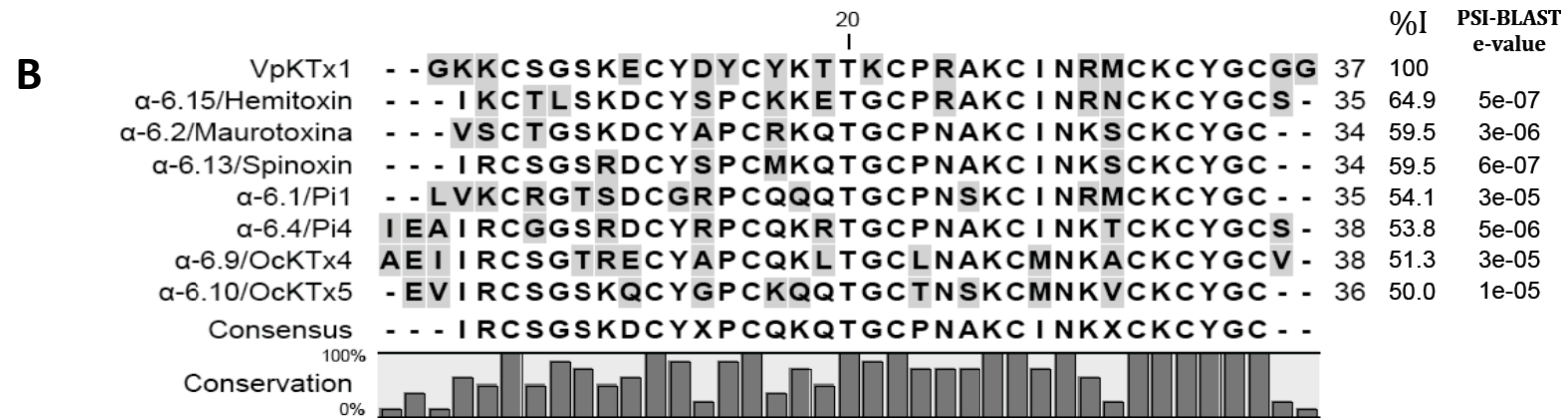
1 ATG GGT ACA AAA TTC GTC TTC ATC ATA CTC TTG GCC ACC ACT GTG ATA TTA ACG TTT GGT 60
1  M  G  T  K  F  V  F  I  I  L  L  A  T  T  V  I  L  T  F  G  20

61 GCA TTG ACA GTT GAA GGA GGG AAG AAA TGC AGT GGA TCT AAA GAA TGT TAT GAT TAT TGT 120
21  A  L  T  V  E  G  G  K  K  C  S  G  S  K  E  C  Y  D  Y  C  40

121 TAT AAG ACA ACT AAA TGT CCT CGT GCA AAA TGC ATA AAC AGG ATG TGT AAA TGT TAC GGT 180
41  Y  K  T  T  K  C  P  R  A  K  C  I  N  R  M  C  K  C  Y  G  60

181 TGT GGT GGA TAA TACGTTTTTAATTCTTTCCATTGATATGAACCATTTTCATCTGAAATTATGTAACGAAATAAAG
61  C  G  G  stop
    
```

*CTATTCTCTCAAT-polyA 3'*



**Fig.17. Secuencia de VpKTx1** (Toxina 1 de potasio aislada de *V. punctatus*). A. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del precursor de VpKTx1. El péptido señal se presenta en código de una sola letra y se encuentra subrayado. Las letras en negritas representan el péptido maduro, los residuos de Cys también están subrayados para una mejor identificación. El sitio de poliadenilación (AATAAAA) se muestra subrayado en el extremo 3' no traducido. En B, se presenta el alineamiento múltiple entre VpKTx1 y toxinas de potasio pertenecientes a la familia  $\alpha$ KTx6. En el lado derecho del alineamiento se presentan los valores de "E-value" obtenidos mediante PSI-BLAST y el porcentaje de identidad global obtenido con LALIGN v. 2.1.30. Los residuos diferentes en el alineamiento son presentados con fondo gris. El péptido Hemitoxin fue obtenido de *Hemiscorpius lepturus* [68], Maurotoxin de *Scorpio maurus* [69], Spinoxin de *Heterometrus spinifer*, Pi 1 y 4 de *Pandinus imperator* [87,88] y OckTx 4 y 5 de *Opisththalmus carinatus* [89].

## VpKTx2: $\alpha$ -KTx de *Vaejovis punctatus*

**A**

```

1 ATG AGC ATA AAA TTT TTC ATC CTT ATG CTT ATG GTC AGC TCT GTT ATA TTG ACA TTT GAT 60
1  M  S  I  K  F  F  I  L  M  L  M  V  S  S  V  I  L  T  F  D  20

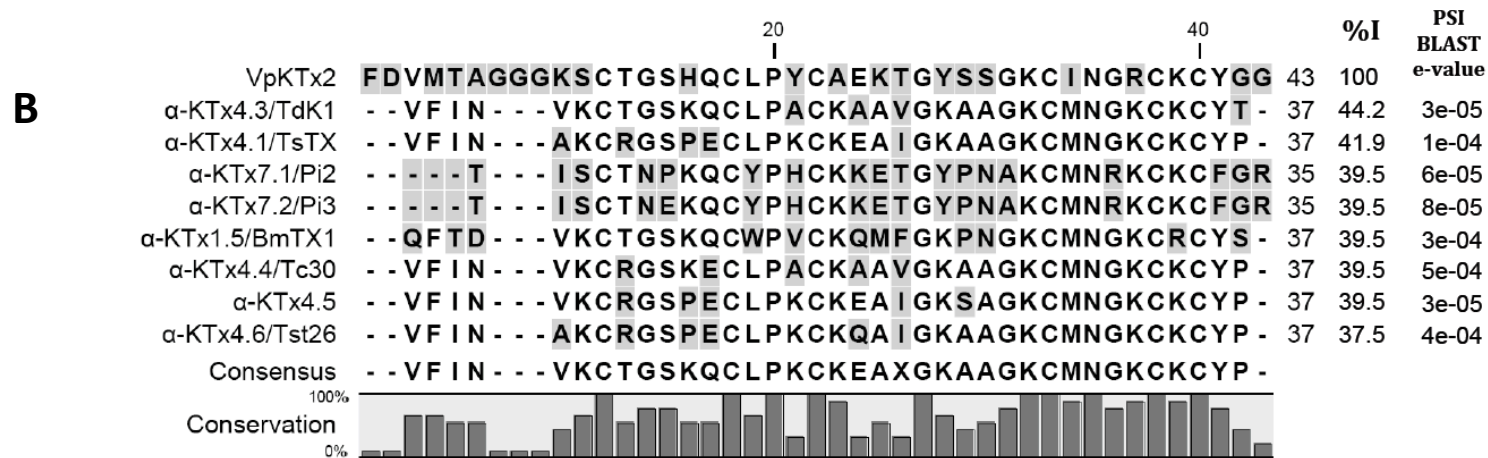
61 GTA ATG ACT GCT GGA GGA GGA AAA TCT TGC ACT GGA AGT CAC CAA TGT TTG CCA TAT TGT 120
21  V  M  T  A  G  G  G  K  S  C  T  G  S  H  Q  C  L  P  Y  C  40

121 GCA GAG AAG ACT GGA TAT AGT AGT GGA AAA TGT ATA AAC GGA AGA TGC AAA TGC TAT GGA 180
41  A  E  K  T  G  Y  S  S  G  K  C  I  N  G  R  C  K  C  Y  G  60

181 GGT TAA TACTGCTGTTATGTTAACTGTTTACAATGATGTGAAATCTTTTTGACTGGAATGGTGAATAATAAAAAATACAAGATTTCACTTTT
61  G  stop

TCTAAACATGGACGTAAACTATTTTTGATCCTTGC-polyA 3'

```



**Fig.18. Secuencia de VpKTx2** (Toxina 2 de potasio aislada de *V. punctatus*). A. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del precursor de VpKTx2. El péptido señal se presenta en código de una sola letra y se encuentra subrayado. Las letras en negritas representan el péptido maduro, los residuos de Cys también están subrayados para una mejor identificación. El sitio de poliadenilación (AATAAAAA) se muestra subrayado en el extremo 3' no traducido. En B, se presenta el alineamiento múltiple entre VpKTx2 y toxinas de potasio pertenecientes a la familia  $\alpha$ KTx4,  $\alpha$ KTx7 y  $\alpha$ KTx1. En el lado derecho del alineamiento se presentan los valores de "E-value" obtenidos mediante PSI-BLAST y el porcentaje de identidad global obtenido con LALIGN v. 2.1.30. Los residuos diferentes en el alineamiento son presentados con fondo gris. El péptido TdK1 fue obtenido de *Tityus discrepans* [90], TsTX de *Tityus serrulatus* [91], Tst26 de *Tityus stigmurus* [92], Pi2 y Pi3 de *Pandinus imperator* [93], BmTX1 de *Mesobuthus martensii* [94], Tc30 de *Tityus cambridgei* [57] y  $\alpha$ -KTx 4.5 de *Tityus costatus* [73].

## VpTx4/CALCINA

**A**

```

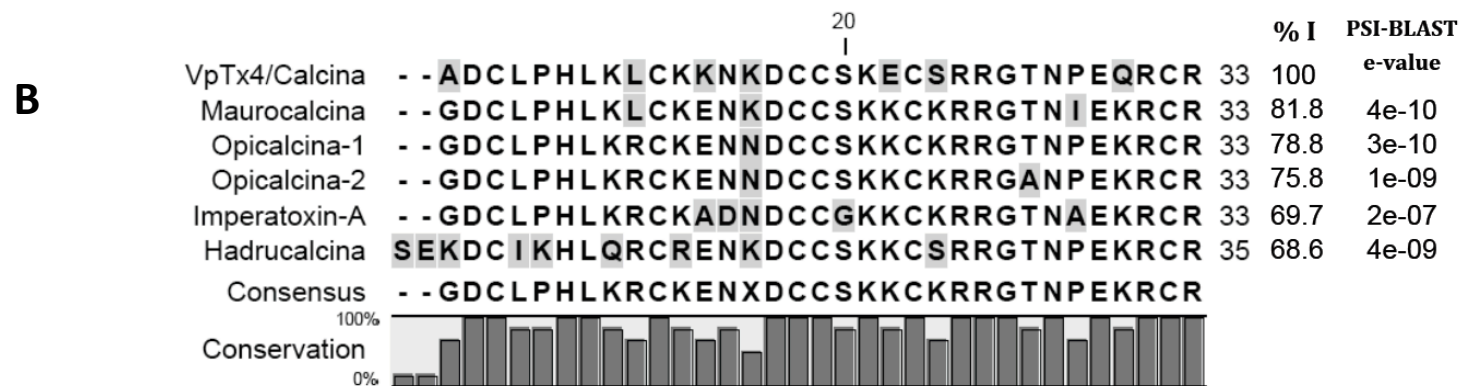
1 ATG AAA CAA AAT ACA ATG ACC ATT ATG TTT ATT GTT TTC TTT ATC ACA TTT GCT TCA TTG 60
1 M K Q N T M T I M F I V F F I T F A S L 20

61 GCC ATC TAT GGT GCA GAA GCA AGT GAA GAA GCC AAC TTT TTG GAG AGA AGG GCA GAC TGC 120
21 A I Y G A E A S E E A N F L E R R A D C 40

121 TTA CCA CAT CTT AAA CTC TGT AAA AAG AAC AAG GAT TGT TGC AGC AAG GAA TGT TCG AGA 180
41 L P H L K L C K K N K D C C S K E R 60

181 AGA GGA ACA AAT CCT GAG CAG AGA TGC AGA TAA AAAGATAATGGCTACTGAAATGGCAAAGATGTAACCTCAATCC
61 R G T N P E Q R C R STOP

TAAAGCTTTAAACGACAACCACACTGAATACTCTGTATTGAGTTATTCCATTCTTTCTCTTCTGTACTTTGCATATTGACTTAATACGTAAAA
TTAAAGATATGTTCTATCAGTG-polyA 3'
    
```



**Fig.19. VpTx4/Calcina.** A) Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del precursor de VpTx4. El péptido señal de 27 aa se muestra en letras cursivas, seguido por el propéptido de 10 aa los cuales se presentan subrayados y el péptido maduro de 33 aa presentado en letras negras. Los residuos de Cys se presentan subrayados para una más fácil identificación. También se presenta el sitio probable de poliadenilación indicado por letras subrayadas (AAAAATTA). B) Alineamiento múltiple de la región del péptido maduro de VpTx4 con toxinas de Ca<sup>2+</sup> aisladas del veneno de alacranes. En el lado derecho del alineamiento se presentan los valores de “E-value” obtenidos mediante PSI-BLAST y el porcentaje de identidad global obtenido con LALIGN v. 2.1.30. Los residuos diferentes en el alineamiento son presentados con fondo gris. El péptido Maurocalcina fue obtenido de *Scorpio maurus*, Opicalcina-1 y Opicalcina-2 de *Opisthophthalmus carinatus*, Imperatoxin-A de *Pandinus imperator* y la Hadrucalcina de *Hadrurus gertschi*.

## Escorpinas

Este péptido es sumamente interesante por su multifuncionalidad desde el punto de vista farmacológico. Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani han demostrado que la Escorpina, péptido aislado del veneno del alacrán *Pandinus imperator* (Familia Scorpionidae), puede ser utilizado como un anti-malárico ya que inhibe el desarrollo biológico de *Plasmodium berghei* en su estadio de gameto y oocineto [71]. También posee actividad antibacteriana, antiviral y puede funcionar como bloqueador de canales de K<sup>+</sup> [71,72]. La escorpina posee 75 aa de longitud con 6 residuos de Cys que a su vez conforman tres puentes disulfuro, además presenta un péptido señal de 19 aa de longitud. Varios péptidos homólogos a la Escorpina, denominados en grupo como Scorpine-like, han sido aislados tanto de alacranes Bútidos y no Bútidos. En la figura 20A presentamos dos secuencias de ADN que codifican para péptidos homólogos de la familia de las escorpinas, Vp-Scpl y Vs-Scpl. El péptido Vp-Scpl fue obtenido de la biblioteca de *Vaejovis punctatus*, éste presenta un péptido señal de 19 aa de longitud y un péptido maduro de 78 aa de longitud. El péptido maduro de Vp-Scpl, presenta desde un 41.8% hasta un 61.5% de identidad con miembros de la familia de las escorpinas (Fig.20B). Con la Escorpina de *Pandinus imperator* comparte un 48.7% de identidad, mientras que con la Scorpine-like 1 de *Hadrurus gertschi* comparte un 61.5% (Fig.20B). Vs-Scpl, aislada de *Vaejovis subcristatus*, presenta una secuencia similar a Vp-Scpl pero incompleta en la región N-terminal. Como se puede ver en la figura 20A, Vs-Scpl carece del péptido señal y de los primeros 19 residuos de aa del péptido maduro. Sin embargo, Vs-Scpl presenta una secuencia muy parecida a Vp-Scpl ya que sólo difieren en un aminoácido en la posición 73 (Fig.20A). La Escorpina es un péptido con una secuencia única, ya que su región N-terminal presenta cierta similitud con péptidos de la familia de las cecropinas (péptidos antimicrobianos con estructuras alfa hélice) y en su extremo C-terminal presenta una región rica en residuos de Cys la cual es similar a la que presentan algunas toxinas de K<sup>+</sup> y defensinas de insectos [71,72].

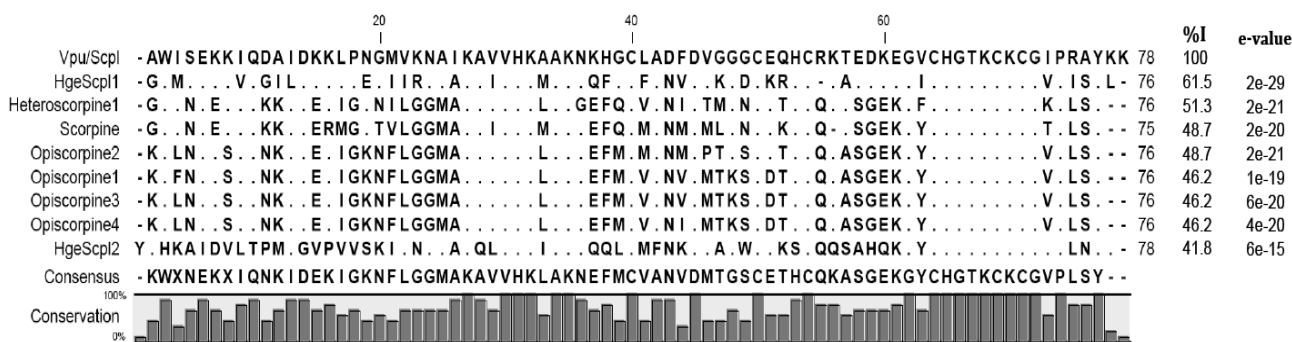
## Péptidos Aniónicos

Los péptidos aniónicos han sido aislados de *Mesobuthus martensii* y *Tityus costatus*, dos especies de alacranes de la familia Buthidae [15,73]. Estos péptidos contienen un alto contenido de residuos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico). BmKa1 y BmKa2 fueron los primeros péptidos aniónicos reportados y aislados de la glándula venenosa de *Mesobuthus martensii* [15]. Estos péptidos presentan precursores constituidos por un péptido señal que va de 19 a 24 aa de longitud. BmKa1 presenta un péptido maduro de una longitud de 38 aa con un porcentaje de 39% de aminoácidos ácidos en su secuencia (Asp+Glu), mientras que BmKa2 presenta un péptido maduro de 50 aa de longitud con 36% de residuos ácidos (Asp+Glu). BmKa1 y BmKa2 presentan puntos isoeléctricos (IP) de 3.39 y 2.69, respectivamente. Estos puntos isoeléctricos son los más bajos entre los péptidos identificados hasta ahora en el veneno de alacranes.

## A Péptidos homólogos a la Escorpina

Vp-Scpl	1	ATG AAC GCT AAA ATA ACT GTC CTA TTT TTT CTG GTA GCC ATT ACA ATT GCT TCT TGT GCC	60	
Vs-Scpl	1	---	60	
Vp-Scpl	1	<u>M N A K I T V L F F L V A I T I A S C A</u>	20	
Vs-Scpl	1	* *	20	
Vp-Scpl	61	TGG ATA AGC GAG AAA AAA ATA CAA GAT GCC ATC GAT AAG AAA TTG CCA AAC GGA ATG GTG	120	
Vs-Scpl	61	---	120	
Vp-Scpl	21	<u>W I S E K K I Q D A I D K K L P N G M V</u>	40	
Vs-Scpl	21	* M V	40	
Vp-Scpl	121	AAG AAC GCA ATC AAA GCC GTA GTG CAC AAA GCT GCC AAA AAT AAG CAT GGC TGT CTA GCT	180	
Vs-Scpl	121	AAG AAC GCA ATC AAA GCC GTA GTG CAC AAA GCT GCC AAA AAT AAG CAT GGC TGT CTA GCT	180	
Vp-Scpl	41	<u>K N A I K A V V H K A A K N K H G C L A</u>	60	
Vs-Scpl	41	K N A I K A V V H K A A K N K H G C L A	60	
Vp-Scpl	181	GAT TTT GAT GTA GGA GGT GGA TGC GAA CAG CAC TGC <u>AGA</u> AAA ACT GAA GAT AAG GAA GGA	240	
Vs-Scpl	181	GAT TTT GAT GTA GGA GGT GGA TGC GAA CAG CAC TGC <u>AAA</u> AAA ACT GAA GAT AAG GAA GGA	240	
Vp-Scpl	61	<u>D F D V G G G C E Q H C R K T E D K E G</u>	80	
Vs-Scpl	61	D F D V G G G C E Q H C K K T E D K E G	80	
Vp-Scpl	241	GTC TGC CAC GGA ACC AAG TGC AAA TGC GGT ATT CCC CGT GCA TAT AAA AAA TAA ATC ACT	300	
Vs-Scpl	241	GTC TGC CAC GGA ACC AAG TGC AAA TGC GGT ATT CCC CGT GCA TAT AAA AAA TAA ATC ACT	300	
Vp-Scpl	81	<u>V C H G T K C K C G I P R A Y K K stop</u>		
Vs-Scpl	81	V C H G T K C K C G I P R A Y K K stop		
Vs-Scpl	301	GATTAATATTAATAGTGATTACATATGATATTTCTCTTCAAATTTGTGTTTAAACTAAAATTTATTAGACACACAAATGAATTCTGTGTACTAT AGATAAATAAAACGTATTTAAAAATTTG-polyA 3'		
Vp-Scpl	301	GATTAATATTAATAGTGATTATATAAAAATTTATTTCTCTTCAAATTTGTGTTTAAACACTAAAATTTAATAGACACACAAATGAATTCTGTGT ACTATAGATAAATAAAACGTATTTAAAAATTT-polyA 3'		

## B



**Fig.20. Secuencia del cDNA de dos probables homólogos de la Escorpina de *Pandinus imperator* y su secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos.** A. Vp-Scpl fue obtenida de la biblioteca de *V.punctatus*, codifica para un precursor de 97 aa, el cual está conformado por un péptido señal de 19 aa (posición 1-19, subrayado) y un péptido maduro de 78 aa (posición 20-97, mostrado en negritas). Vs-Scpl fue obtenida de *V.subcristatus*, esta es muy parecida a Vp-Scpl sin embargo, Vs-Scpl está incompleta en su región N-terminal. En la posición 73 se encuentra resaltado en fondo gris el único residuo de aminoácido diferente entre Vp-Scpl y Vs-Scpl. En ambas secuencias se muestra subrayado el probable sitio de poliadenilación (AAAATAAAA). En B se muestra un alineamiento múltiple entre Vp-Scpl, la Escorpina y un grupo de péptidos considerados como scorpine-like (HgeScpl 1 y 2 de *Hadrurus gertschi*, Heteroscorpine 1 de *Heterometrus laoticus*, Opiscorpine 1-4 de *Opisthophthalmus carinatus* y Scorpine de *Pandinus imperator*). En el lado derecho del alineamiento se presentan los porcentajes de identidad global obtenidos con LALIGN v. 2.1.30 y los "E-value" obtenidos usando PSI-BLAST.



Algunos autores proponen la hipótesis de que estos péptidos podrían funcionar como amortiguadores del pH del veneno líquido [74] ya que la mayoría de los péptidos presentes en el veneno de los alacranes son de carácter básico.

A pesar de que los péptidos aniónicos pueden presentar secuencias diferentes, sus contenidos de aminoácidos ácidos y valores de PI son muy parecidos. Otros autores proponen que estos péptidos tal vez podrían tener actividad antimicrobiana, sin embargo su función en el veneno del alacrán, así como su probable actividad farmacológica, aún no ha sido comprobada.

La figura 21 presenta la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente al precursor aniónico aislado de *V.punctatus*. Este precursor presenta un péptido señal de 24 aa y un péptido maduro rico en Glu y Asp de 51 aa de longitud.

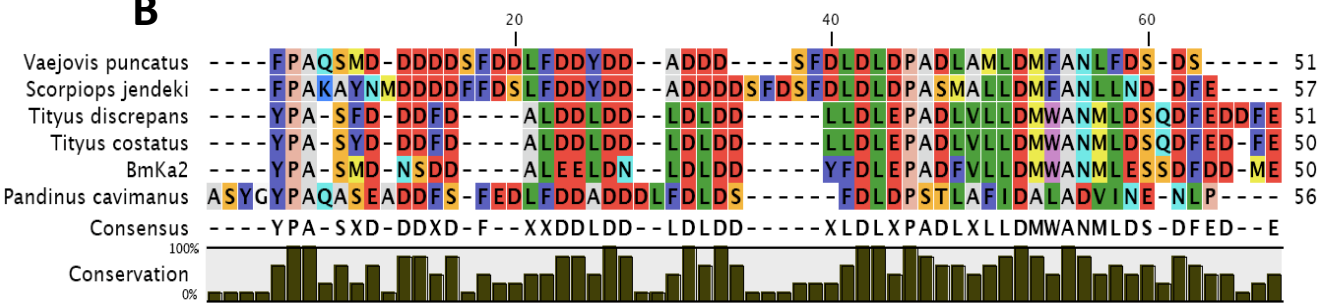
### PÉPTIDO ANIÓNICO

**A**

1	ATG	GTA	TCA	AAG	ACA	CTA	ATT	TTC	CTG	ATG	GTA	GTG	GCT	CTG	TTA	GCA	ACC	ACC	TTT	ACC	60	
1	<u>M</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>M</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	20	
61	TCA	TCT	TAT	GGT	TTT	CCA	GCT	CAA	AGT	ATG	GAC	GAT	GAT	GAT	GAC	TCG	TTT	GAT	GAC	TTG	120	
21	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	40	
121	TTT	GAT	GAC	TAT	GAC	GAT	GCC	GAT	GAT	GAT	TCC	TTT	GAT	CTA	GAC	CTT	GAT	CCT	GCT	GAC	180	
41	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	60	
181	CTA	GCA	ATG	CTG	GAC	ATG	TTT	GCA	AAT	TTA	TTT	GAC	AGT	GAC	AGC	TAG	AAAAA	TAATCACTTGACAT				
61	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>M</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	STOP						

TATATACGTTACCCATGTATTTATTGAAATATTGCAAACTAGATTCTTCGTTTTTGTAAACAAAACATTAGATGCTTTTCTTGATTTTCAC  
 AGGTTTCAACGAAAATGTAATAATTGATTTTCAGAGCTAAAACTGCTATACTTTTGTATTATAGTGAGACTGAAAAAAGTAAAAACTGTATTT  
 TATAGTCCAAAAGTTATGCAATAAAATCAATGTTCACT

**B**



**Fig.21. Péptido Aniónico.** A) Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del precursor de un péptido aniónico aislado de la biblioteca de *V.punctatus*. El péptido señal de 24 aa se muestra en letras subrayadas, seguido por el péptido maduro de 51 aa presentado en letras negritas. También se presenta el sitio probable de poliadenilación indicado por letras subrayadas (AAAAATTA). B) Alineamiento múltiple de la región madura del péptido aniónico de *V.punctatus* con otros péptidos de características semejantes aislados del veneno de otras especies de alacranes, tales como *Tityus discrepans*, *Tityus costatus*, *Pandinus cavimanus*, *Mesobuthus martensii* (BmKa2) y *Scorpiops jendeki*.

## Péptidos Antimicrobianos (NDBP-3)

La subfamilia NDBP-3 (non-disulfide-bridged peptides), está constituida por péptidos tales como la Hadrurina, Parabutoporina 1 y 2, Pandinina 1 y Opistoporinas [14]. Estos péptidos presentan actividad antimicrobiana y hemolítica, algunos miembros de esta familia también poseen actividad potenciadora de Bradicinina [14].

Uno de los antecedentes más importantes para nosotros fue la reciente caracterización del péptido Vejovina aislado del alacrán *Vaejovis mexicanus* [75]. La Vejovina posee la capacidad de inhibir el crecimiento de cepas Gram-negativas multiresistentes aisladas clínicamente (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter baumannii*) con concentraciones de 4.4  $\mu$ M a 50  $\mu$ M [75]. Los precursores peptídicos de subfamilia NDBP-3 están constituidos por tres regiones: 1) El péptido señal el cual posee 22 aa de longitud, 2) el péptido maduro que va de 39 a 50 aa de longitud, esta región del precursor es rica en residuos de Lys y Arg. Además, se ha propuesto que el péptido maduro presenta el siguiente consenso: S(X)<sub>3</sub>KXWXS(X)<sub>5</sub>L, en donde X representa cualquiera de los 20 aminoácidos; y 3) un propéptido de entre 16 y 17 aa de longitud [14,75].

De la biblioteca de *V.punctatus* se aislaron dos moléculas de ADNc que codifican para precursores de péptidos pertenecientes a la subfamilia NDBP-3, los cuales fueron nombrados como Vp1/NDBP-3 y Vp2/NDBP-3. En la figura 22 se muestra la secuencia de ADNc y su correspondiente secuencia de aminoácidos del precursor de Vp1/NDBP-3 y Vp2/NDBP-3. Ambos precursores presentan un péptido señal de 22 aa de longitud que flanquea el extremo N-terminal del péptido maduro, el cual está constituido por 47 aa en el caso de Vp1/NDBP-3 y 39 aa en el caso de Vp2/NDBP-3. El extremo C-terminal del péptido maduro está flanqueado por un propéptido de 13 aa para Vp1/NDBP-3 y de 16 aa para el caso de Vp2/NDBP-3. A pesar de que ambos péptidos maduros presentan características en su secuencia que nos hace ubicarlos dentro de la familia NDBP-3, sólo Vp2/NDBP-3 presenta la región consenso antes mencionada (S(X)<sub>3</sub>KXWXS(X)<sub>5</sub>L). Sin embargo, Vp1/NDBP-3 también conserva cierta porción de este consenso (KXWXS(X)<sub>5</sub>L) y su porcentaje de identidad global con otros péptidos antimicrobianos perteneciente a esta familia es mayor que el que presenta Vp2/NDBP-3 (Fig.22B). Cabe mencionar que el porcentaje de identidad entre la región del péptido maduro de Vp1/NDBP-3 y Vp2/NDBP-3 es de apenas 40.4%. Este mismo porcentaje es compartido entre Vp2/NDBP-3 y la Vejovina; mientras que entre Vp1/NDBP-3 y la Vejovina hay 89.4% de identidad. Ambos péptidos maduros presentan una longitud de 47 aa de los cuales sólo hay 5 cambios entre las dos secuencias y de ellos, un cambio es entre residuos con características fisicoquímicas semejantes (Ser<sup>5</sup>Thr) (Fig.22B).

En base al resultado del alineamiento realizado en Clustal W (Fig.22C y 22B), de secuencias pertenecientes a la subfamilia NDBP-3, nosotros proponemos que al incorporar nuevas secuencias tales como Con13 de *Opisthacanthus cayaporum* [52], Vejovina [75] y Vp1/NDBP-3, podemos proponer un nuevo consenso en el péptido maduro el cual sería: **G**X<sub>(5-6)</sub>**K**X<sub>8</sub>**S**X<sub>5</sub>**L**X<sub>(7-11)</sub>**V**X<sub>2</sub>**K**<sub>(I/L)</sub>**G**X<sub>(T/S)</sub>**P**, donde X puede ser cualquiera de los 20 diferentes aminoácidos comúnmente presentes en las proteínas (Fig.22C). Nótese que este alineamiento excluye los péptidos BmKbpp y Parabutoporin. Además, Vp2/NDBP-3 presenta una secuencia única al ser más corta que



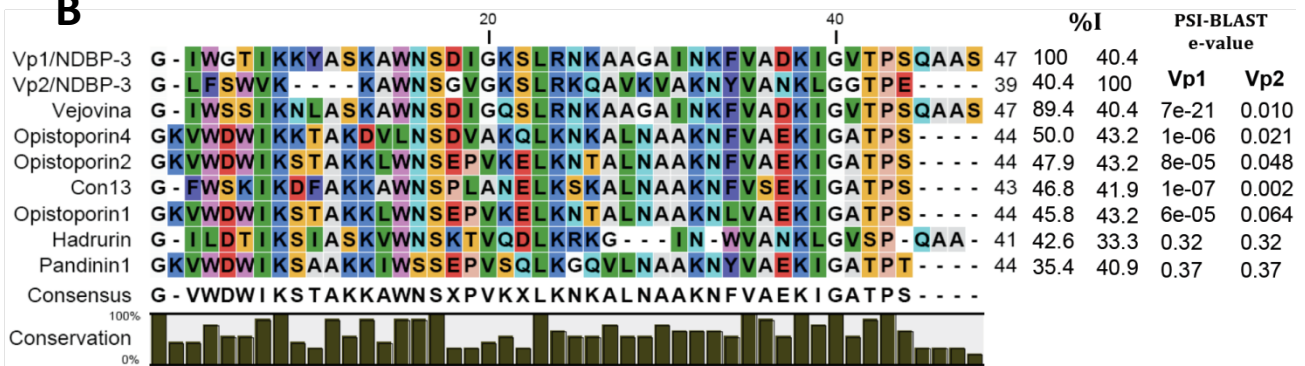
el resto de las demás secuencias presentadas en el alineamiento de la figura 22B.

### Antimicrobianos (NDBP-3)

#### A

Vp1/NDBP-3	1	ATG	AAT	GCA	AAA	ACC	ATC	TTC	GCT	ATT	TTC	TTG	ATT	GGG	ATG	CTC	GTG	ACT	GAA	CAA	GCA	60
Vp2/NDBP-3	1	ATG	AAC	GGA	AAA	GCA	CTC	CTC	GTT	GTT	TTC	TTG	GTT	ACC	ATG	CTT	GTA	ATG	GAG	CCT	ACT	60
Vp1/NDBP-3	1	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	20
Vp2/NDBP-3	1	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	20
Vp1/NDBP-3	61	GAA	GCA	GGA	ATC	TGG	GGT	ACA	ATT	AAG	AAA	TAT	GCT	TCA	AAA	GCA	TGG	AAT	TCC	GAC	ATA	120
Vp2/NDBP-3	61	GAA	GCA	GGA	CTT	TTC	TCA	TGG	GTC	AAG	AAA	GCA	TGG	AAC	TCA	GGT	GTA	GGC	AAA	TCA	CTA	120
Vp1/NDBP-3	21	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	40
Vp2/NDBP-3	21	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	40
Vp1/NDBP-3	121	GGC	AAA	TCT	CTA	AGA	AAC	AAG	GCA	GCT	GGT	GCT	ATC	AAC	AAA	TTT	GTG	GCA	GAT	AAA	ATA	180
Vp2/NDBP-3	121	AGA	AAA	CAG	GCT	GTC	AAA	GTA	GCG	AAA	AAT	TAC	GTA	GCA	AAT	AAA	CTT	GGA	GGA	ACG	CCC	180
Vp1/NDBP-3	41	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	60
Vp2/NDBP-3	41	<b>R</b>	<b>K</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>Y</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	60
Vp1/NDBP-3	181	GGA	GTA	ACA	CCC	TCA	CAG	GCA	GCC	TCT	ATG	ACC	CTT	GAT	CAA	ATT	GTA	GAT	GCT	ATG	TAT	240
Vp2/NDBP-3	181	GAG	GAA	GCT	GGT	GCA	ATG	CCG	TTC	GAT	GAA	TTT	ATG	GAT	GTG	CTA	CAC	TAC	TAA	TAA	TAA	240
Vp1/NDBP-3	61	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>Y</b>	80
Vp2/NDBP-3	61	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>D</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>Y</b>	<b>stop</b>			
Vp1/NDBP-3	241	TAC	GAT	TAA	<i>GAATTCATCTGGAAAGTTCTTTCATAACGGATGTCTTATAAAATCTGTAATTTAACGTATGCAATAAACTATA</i>																	
Vp2/NDBP-3	241	<i>TCTGATACACCTTCCAAATAATTAATGTAGTTTCTAATTTCTGTGCAAAAAATAAGTTGTGAATCTTCAAG-PolyA 3'</i>																				
Vp1/NDBP-3	76	<i>Y</i>	<i>D</i>	<i>stop</i>																		
Vp1/NDBP-3		<i>CAGAG-PolyA 3'</i>																				

#### B



**Fig.22. Antimicrobianos NDBP-3.** A) Secuencia del ADNc y de aminoácidos de Vp1/NDBP-3 y Vp2/NDBP-3 de *V.punctatus*, dos precursores de probables péptidos antimicrobianos pertenecientes a la subfamilia NDBP-3. Ambas secuencias de aminoácidos presentan la región del péptido señal en letras subrayadas, esta región está constituida por 22 aa. La región del péptido maduro se representa en letras negritas con una longitud de 47 aa para Vp1/NDBP-3 y de 39 aa para Vp2/NDBP-3. El propéptido es presentado en letras cursivas la longitud de esta región es de 13 aa para Vp1/NDBP-3 y de 16 aa para Vp2/NDBP-3. En ambas secuencias se muestra subrayado el probable sitio de poliadenilación (AATAAA para Vp1/NDBP-3 y AAAAAATAAA para Vp2/NDBP-3). En B y en C se muestra un alineamiento múltiple entre Vp1/NDBP-3, Vp2/NDBP-3 y un grupo de péptidos considerados como integrantes de la subfamilia NDBP-3 (Vejovina fue aislada de *Vaejovis mexicanus*, Hadrurin de *Hadrurus aztecus*, Opistoporin 1, 2 y 4 de *Opisththalmus carinatus*, Con13 de *Opisthacanthus cayaporum* y Pandinin 1 de *Pandinus imperator*). En B, en el lado derecho del alineamiento se presentan los porcentajes de identidad global obtenidos con LALIGN v. 2.1.30 y los “E-value” obtenidos usando PSI-BLAST.

<b>C</b>	<p>Vp1/NDBP-3  Vp2/NDBP-3  Vejovina  Opistoporin4  Opistoporin2  Con13  Opistoporin1  Hadrurin  Pandinin1</p>	<p>G-IWGTIKKYASKAWNSDIGKSLRNKAAGAINKFFVADKIGVTPSQAAS  G-LFSWVK----KAWNSGVGKSLRKQAVKVAKNYVANKLGGTPE----  G-IWSSIKNLASKAWNSDIGQSLRNKAAGAINKFFVADKIGVTPSQAAS  GKVWDWIKKTAKDVLNSDVAKQLKNKALNAAKNFVAEKIGATPS----  GKVWDWIKSTAKKLWNSSEPVKELKNTALNAAKNFVAEKIGATPS----  G-FWSKIKDFAKKAWNSPLANELKSKALNAAKNFVSEKIGATPS----  GKVWDWIKSTAKKLWNSSEPVKELKNTALNAAKNLVAEKIGATPS----  G-ILDTIKSIASKVWNSKTVQDLKRKG---IN-WVANKLGVSP-QAA-  GKVWDWIKSAAKKIWSSEPVSQLKGQVLNAAKNYVAEKIGATPT----</p>
----------	---	---

**Fig.22C.** Se presenta el mismo alineamiento que en B pero en C se resaltan los residuos altamente conservados en fondo azul, estos residuos forman el siguiente consenso: **GX<sub>(5-6)</sub>KX<sub>8</sub>SX<sub>5</sub>LX<sub>(7-11)</sub>VX<sub>2</sub>KX<sub>(1 ó 1)</sub>GXX<sub>(17 ó 18)</sub>P.**

### Péptidos antimicrobianos (NDBP-4)

Los péptidos pertenecientes a la subfamilia NDBP-4 presentan baja similitud entre sus secuencias y diferencias en su número de residuos de aminoácidos, sin embargo presentan un motivo conservado en su estructura primaria, **LIPS** (Ver Tabla 1). Estos péptidos presentan estructuras  $\alpha$ -hélice, son catiónicos y presentan actividad antimicrobiana y hemolítica. Pin2 (Pandinin 2) de *P.imperator*, es uno de los integrantes de esta familia de péptidos libres de puentes disulfuro. Como se mencionó en la sección 2.2.2, Pin2 es un antimicrobiano de amplio espectro, ya que actúa tanto contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, además de inhibir el crecimiento de levaduras [50]. Sin embargo, Pin2 presenta una potente actividad hemolítica ya que a una concentración de 22.2  $\mu$ M causa el 51% de hemólisis [50].

De la biblioteca de *V.punctatus*, aislamos dos genes que codifican para los precursores peptídicos de dos probables miembros de la subfamilia NDBP-4, Vp1/NDBP-4 y Vp2/NDBP-4. Al igual que la subfamilia NDBP-3, los precursores de la familia NDBP-4 presentan un péptido señal flanqueando el extremo N-terminal del péptido maduro y un propéptido flanqueando el extremo C-terminal. Como se puede ver en la figura 23, Vp1/NDBP-4 y Vp2/NDBP-4 presentan tamaños y secuencias diferentes. Vp1/NDBP-4, posee un péptido señal de 22 aa de longitud, un péptido maduro de 19 aa seguido por un propéptido de 32 aa de longitud. El propéptido se encuentra precedido por un sitio de procesamiento postraducciona, GKR, el cual se encuentra altamente conservado en los precursores de la subfamilia NDBP-3 [14]. La proteólisis de este sitio genera amidación del extremo C-terminal del péptido maduro, por lo que el péptido maduro de Vp1/NDBP-4 estaría amidado en I19. El precursor de Vp2/NDBP-4, presenta un péptido señal de 23 aa de longitud, un péptido maduro conformado por 25 aa y un propéptido de 26 aa de longitud. A diferencia de Vp1/NDBP-4, Vp2/NDBP-4 no presenta el sitio GKR, pero RKR podría funcionar como sitio de proteólisis aunque en este caso el péptido maduro no estaría amidado en su extremo C-terminal.

A pesar de que ambas secuencias presentan cierta similitud con miembros de la subfamilia NDBP-4, entre ellas son diferentes, por lo que se analizaron de forma independiente. Cada una de las secuencias fue sometida a la base de datos utilizando PSI-BLAST. El precursor de Vp1/NDBP-4 mostró mayor similitud con Mucroporin de *Lychas mucronatus* [76], BmKb1 de *Mesobuthus martensii* [14] e Imcroporin de *Isometrus maculatus* [77]; en la figura 24A se pueden ver los porcentajes de identidad y los “E-value” obtenidos de la base de datos. El precursor de Vp2/NDBP-4 mostró mayor similitud con otro grupo de péptidos también pertenecientes a la familia NDBP-4,

en la figura 25A se muestra el alineamiento múltiple entre Vp2/NDBP-4 y los péptidos Con10 y OcyC3 de *Opisthacanthus cayaporum*, Marcin-18 de *Mesobuthus martensii*, Meucin-18 de *Mesobuthus eupeus* [78] y una secuencia obtenida de una librería de *P.cavimanus*.

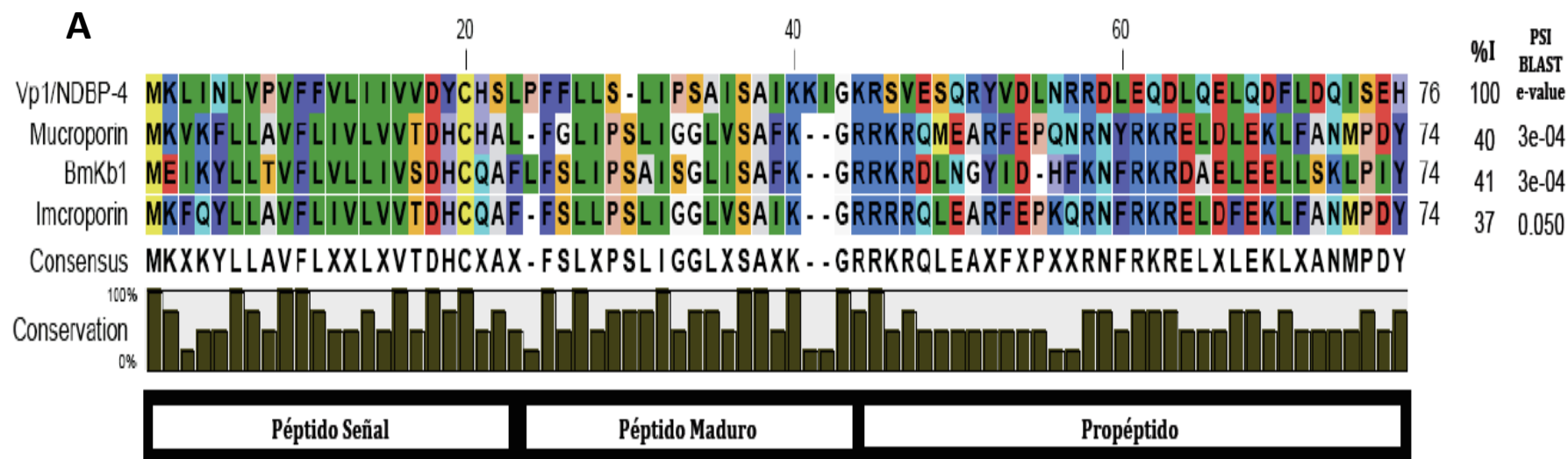
### ANTIMICROBIANOS (NDBP-4)

Vp1/NDBP-4	1	ATG	AAG	CTG	ATT	AAT	TTG	GTT	CCA	GTT	TTC	TTT	GTT	CTG	ATA	ATA	GTT	GTT	GAT	TAT	TGC	60
Vp2/NDBP-4	1	ATG	CAG	CTC	AGA	AAA	GCA	CTT	TTG	GTA	ATC	TTT	GTG	GCT	TAT	CTC	TTA	GTG	ACC	GAT	GAA	60
Vp1/NDBP-4	1	M	K	L	I	N	L	V	P	V	F	F	V	L	I	I	V	V	D	Y	C	20
Vp2/NDBP-4	1	M	Q	L	R	K	A	L	L	V	I	F	V	A	Y	L	L	V	T	D	E	20
Vp1/NDBP-4	61	CAT	TCT	CTT	CCT	TTT	TTC	CTT	CTG	AGT	CTC	ATA	CCT	TCA	GCA	ATC	TCA	GCA	ATC	AAG	AAA	120
Vp2/NDBP-4	61	GCA	GAA	GCT	TTC	TGG	GGA	TTC	CTG	GGT	AAA	CTT	GCA	ATG	AAG	GCC	GTC	CCA	TCG	TTA	ATT	120
Vp1/NDBP-4	21	H	S	L	P	F	F	L	L	S	L	I	P	S	A	I	S	A	I	K	K	40
Vp2/NDBP-4	21	A	E	A	F	W	G	F	L	G	K	L	A	M	K	A	V	P	S	L	I	40
Vp1/NDBP-4	121	ATT	GGC	AAA	CGA	AGC	GTA	GAA	TCC	CAA	CGT	TAT	GTG	GAT	CTT	AAC	AGA	CGT	GAT	TTA	GAA	180
Vp2/NDBP-4	121	GGA	GGA	AAC	AAA	AGT	TCA	TCA	AAG	AGA	AAG	CGT	GAA	ATT	GAA	GAT	TTA	TTC	GAC	CCA	TAC	180
Vp1/NDBP-4	41	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>K</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>V</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>Q</i>	<i>R</i>	<i>Y</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>N</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	60
Vp2/NDBP-4	41	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>P</i>	<i>Y</i>	60
Vp1/NDBP-4	181	CAA	GAT	CTG	CAA	GAA	CTG	CAG	GAT	TTT	CTC	GAC	CAG	ATC	TCT	GAG	CAT	TAG	GTA	GCA	CGA	240
Vp2/NDBP-4	181	CAA	AAA	GAC	TTA	GAT	CTG	CAA	CGT	TTA	GAT	CGT	TTC	TTC	TCC	CAG	TTC	CAG	TAG	AGA	ATC	240
Vp1/NDBP-4	61	<i>Q</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>E</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>D</i>	<i>F</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>Q</i>	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	stop				
Vp2/NDBP-4	61	<i>Q</i>	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>R</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>R</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>S</i>	<i>Q</i>	<i>F</i>	<i>Q</i>	stop			
Vp1/NDBP-4	241	<i>AGAAATTACAAATGTGAATGTATAAATGACCAATAAAGTAATGTAAGGAG-polyA 3'</i>																				
Vp2/NDBP-4	241	<i>TTACCATCATCATTGAAGTAATGTTCCATTATTATACATGCGGAGCTTCACTTAAATAAAAGCAATATTC-polyA 3'</i>																				

**Fig.23.Antimicrobianos NDBP-4.** Secuencia del ADNc y de aminoácidos de Vp1/NDBP-4 y Vp2/NDBP-4 de *V.punctatus*, dos precursores de probables péptidos antimicrobianos pertenecientes a la subfamilia NDBP-4. Ambas secuencias de aminoácidos presentan la región del péptido señal en letras itálicas, esta región está constituida por 22 aa en el caso de Vp1/NDBP-4 y por 23 aa en el caso de Vp2/NDBP-4. La región del péptido maduro se representa en letras negritas con una longitud de 19 aa para Vp1/NDBP-4 y de 25 aa para Vp2/NDBP-4. El propéptido es presentado en letras cursivas la longitud de esta región es de 32 aa para Vp1/NDBP-4 y de 26 aa para Vp2/NDBP-4. En ambas secuencias se muestra subrayado el probable sitio de poliadenilación (AATAAA para Vp1/NDBP-4 y AAATAAAA para Vp2/NDBP-4).

En cuanto al péptido maduro, Vp1/NDBP-4 comparte 55.6% de identidad con el péptido BmKb1 y 33.3% con Imcporina y Mucporina. El análisis de las secuencias de la familia NDBP-4 presentadas tanto en la figura 24B y 25B, nos indica la presencia de un motivo conservado el cual presenta el consenso: **(I/L)(I/L)PS**. A pesar de que Vp2/NDBP-4 presenta cambios en este motivo, este péptido comparte 44% de identidad con Pin2 y 40% con Meucin-18 y Marcin-18. Vp2/NDBP-4 representa un péptido novedoso perteneciente a la familia NDBP-4.

### ANTIMICROBIANOS (NDBP-4)

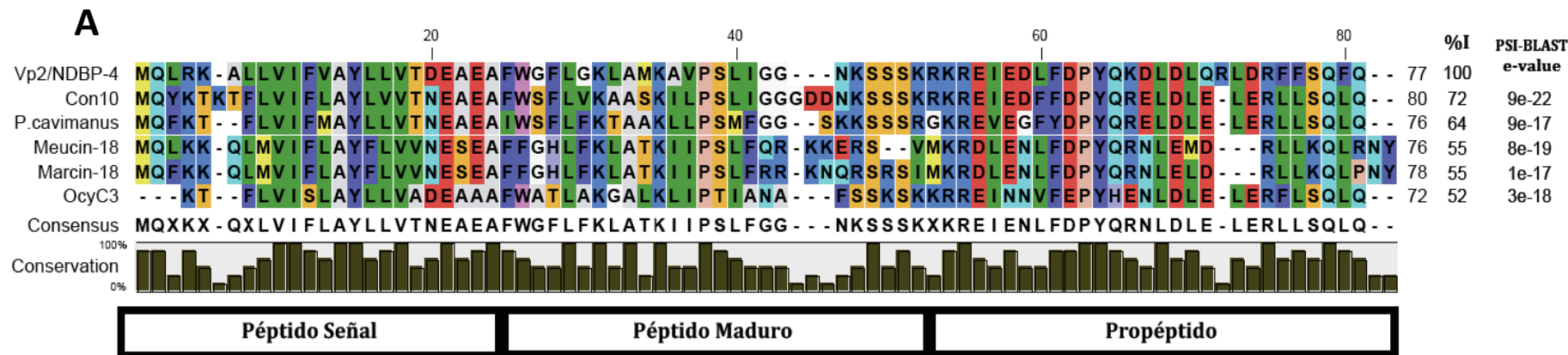


**B**

Protein	Sequence	%I	%I
Vp1/NDBP-4	LPFFLLSLIPSAISAIKKI--	19	100
BmKb1	---FLFSLIPSAISGLISAFK	18	55.6
Mucroporin	----LFGSLIPSLIGGLVSAFK	17	33.3
Imcroporin	----FFSLLPSLIGGLVSAIK	17	33.3

**Fig.24. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Vp1/NDBP-4.** A) Alineamiento múltiple del precursor peptídico de Vp1/NDBP-4 con otros precursores correspondientes a péptidos de la familia NDBP-4. En la parte inferior del alineamiento se muestra esquemáticamente la estructuración del precursor en sus tres partes constituyentes: péptido señal, péptido maduro y propéptido. B) Alineamiento múltiple de la región madura del péptido Vp1/NDBP-4 con otros péptidos de características semejantes aislados del veneno de otras especies de alacranes, este alineamiento muestra el motivo conservado LIPS en fondo gris, además se muestran en fondo azul otros residuos idénticos entre Vp1/NDBP-4 y BmKb1; y en color magenta se muestran residuos idénticos entre Mucroporin y Imcroporin. Los porcentajes de identidad global en ambos alineamientos fueron calculados utilizando el programa LALIGN v. 2.1.30 y los “E-value” mostrados en B fueron obtenidos usando PSI-BLAST.

### ANTIMICROBIANOS (NDBP-4)



**B**

Sequence	Region	%I	%I
Vp2/NDBP-4	FWGFLGKLAMKAVPSLIGG---NKSSSK---	25	100
Con10	FWSFLVKAASKILPSLIGGGDDNKSSSKRKR	31	57.6
<i>P. cavimanus</i>	IWSFLFKTAAKLLPSMFGG--SKKSSSR---	26	53.8
Pandinin2	FWGALAKGALKLIPSL-----FSSFSKKD-	24	44.0
Ponericin-W5	FWGALIKGAAKLIPSV-----VGLFKKKQ-	24	44.0
Marcin-18	FFGHLFKLATKIIPSLFR-----	18	40.0
Meucin-18	FFGHLFKLATKIIPSLFQ-----	18	40.0
OcyC3	FWATLAKGALKLIPTIANA---FSSKSKKR-	27	31.0

**Fig.25. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Vp2/NDBP-4.** A) Alineamiento múltiple del precursor peptídico de Vp2/NDBP-4 con otros precursores correspondientes a péptidos de la familia NDBP-4. En la parte inferior del alineamiento se muestra esquemáticamente la estructuración del precursor en sus tres partes constituyentes: péptido señal, péptido maduro y propéptido. B) Alineamiento múltiple de la región madura del péptido Vp2/NDBP-4 con otros péptidos de características semejantes aislados del veneno de otras especies de alacranes, este alineamiento muestra el motivo conservado **LIPS** en fondo gris, además se muestran en fondo azul otros residuos idénticos entre Vp2/NDBP-4 y las otras secuencias presentadas en el alineamiento (Ponericin-W5 fue aislada de la Hormiga *Pachycondyla goeldii* [79]). Los porcentajes de identidad global en ambos alineamientos fueron calculados utilizando el programa LALIGN v. 2.1.30 y los e-value mostrados en B fueron obtenidos usando PSI-BLAST.

## **Péptidos antimicrobianos (NDBP-5)**

El primer péptido linear con actividad citolítica, denominado como IsCT, fue aislado del veneno del alacrán *Opisthacanthus madagascariensis* perteneciente a la familia Scorpionidae. Posteriormente este tipo de péptidos fueron identificados en el alacrán *Mesobuthus martensii* perteneciente a la familia Buthidae. Estos péptidos constituyen la subfamilia 5 de péptidos sin puentes disulfuro (NDBP-5, ver Tabla 1). Sus precursores peptídicos presentan un péptido señal de 23 aa de longitud, seguido por un péptido maduro de 13 aa y un propéptido que va de los 32 a 33 aa de longitud. El propéptido inicia con un sitio de procesamiento postraduccional altamente conservado: Gly-Lys-Arg. Como se mencionó antes, cuando propéptidos con este tipo de sitios son removidos por proteasas, generan típicamente péptidos maduros con el C-terminal amidado[14]. Otra característica que presenta el propéptido es el alto contenido de aminoácidos ácidos, Glu y Asp, sin embargo se desconoce la función que desempeña esta sección del precursor. IsCT, no sólo posee actividad hemolítica sino que también presenta actividad antimicrobiana de amplio espectro (Ver sección 2.2.2)

En la figura 26 se muestra la secuencia de nueve transcritos que codifican para precursores de péptidos pertenecientes a la subfamilia NDBP-5. Tres de ellos (VsCT1, VsCT2 y VsCT3) fueron obtenidos de la biblioteca de *V.subcristatus* y seis (VpCT1, VpCT2, VpCT3, VpCT4, VpCT5 y VpCT6) de *V.punctatus*. Todos los precursores presentan un péptido señal altamente conservado constituido por 23 residuos de aminoácidos invariablemente. Este péptido señal se encuentra flanqueando el extremo N-terminal del péptido maduro, el cual está constituido por 13 aa, a excepción de VpCT6 el cual presenta 16 aa de longitud. El propéptido varía entre 32 y 35 aa de longitud, pero en todos los casos mantiene un alto contenido de residuos de carácter ácido, además también está presente el sitio Gly-Lys-Arg flanqueando el C-terminal del péptido maduro.

De la biblioteca de *V.subcristatus* se eligieron a VsCT1 y VsCT2 para sintetizarlos y caracterizar su probable actividad antibacteriana y hemolítica, al mismo tiempo de una librería de *Vaejovis mexicanus* (librería generada por la Dra. Verónica Quintero Hernández integrante del Laboratorio del Dr. Possani) fueron aislados VmCT1 y VmCT2 los cuales también se sintetizaron para caracterizarlos y compararlos con VsCT1 y VsCT2. El porcentaje de identidad entre las secuencias de los precursores de VmCT1, VmCT2, VsCT1, VsCT2 y el de IsCT son de más de 52%, sin embargo, el porcentaje de identidad entre la secuencia del péptido maduro es de sólo 15 a 46% (Fig.27 A y B).

## **Caracterización de la actividad antibacteriana de VsCT's y VmCT's.**

### **Síntesis química de VmCT1, VmCT2, VsCT1 y VsCT2.**

El diseño de los péptidos maduros correspondientes a VmCT1, VmCT2, VsCT1 y VsCT2 fue realizado con base en la secuencia de aminoácidos deducida a partir del precursor. Como ya se mencionó, se determinó que el péptido maduro posee una longitud de 13 residuos de aminoácidos (Fig.27A y B) y se encuentra flanqueado en su extremo N-terminal por un péptido señal y en el C-terminal por un sitio de procesamiento proteolítico



(GKR/GRR) que marca el inicio del propéptido, tal sitio de proteólisis genera péptidos maduros con el C-terminal amidado (Fig. 27A). Los péptidos fueron manufacturados con el extremo C-terminal amidado por GenScript USA Inc (New Jersey, USA) y entregados crudos. Los péptidos crudos fueron purificados por RPHPLC manifestando su carácter altamente hidrofóbico ya que eluyen a porcentajes elevados (~50%) de acetonitrilo, esta característica también se aprecia al observar sus valores de hidrofobicidad y de carga neta a pH de 7.0 (Ver tabla 3). La pureza de los péptidos fue  $\geq 95\%$  (datos no presentados) y su masa fue determinada por espectrometría de masas (Tabla 3). Los diagramas de Wheel de los cuatro péptidos sugieren que estos poseen un carácter anfipático al presentar una cara hidrofóbica y otra hidrofílica (Fig.29).

### **Espectro de DC y actividad hemolítica y antibacteriana de: VmCT1, VmCT2, VsCT1 y VsCT2.**

El análisis de la actividad antibacteriana y la obtención de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se realizaron por el método de microdilución. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los resultados de la tabla 2 muestran que sólo VmCT1 y VmCT2 presentaron actividad a una concentración  $\leq 50\mu\text{M}$ , mientras que VsCT1 y VsCT2 no presentaron actividad incluso a una concentración de  $50\mu\text{M}$ . Tanto VmCT1 como VmCT2, muestran actividad contra cepas Gram-negativas y Gram-positivas con valores de MIC muy parecidos (ver tabla 4) lo cual sugiere un mecanismo de acción no selectivo como se ha propuesto para varios péptidos antimicrobianos catiónicos [14,44,50, 80-82].

Estudios sobre la estructura del IsCT reportan una disminución de la actividad antimicrobiana y hemolítica cuando se sustituye el Trp<sup>6</sup> por Ala<sup>6</sup> [82]. Al parecer este cambio genera un desorden en la estructura del IsCT lo cual sugiere que la organización alrededor del Trp<sup>6</sup> es muy importante para mantener la estructura y actividad del IsCT [82]. Dado que VsCT1 y VsCT2 carecen de Trp<sup>6</sup>, esto podría ser una razón por la cual no presentan actividad antimicrobiana a una concentración  $\leq 50\mu\text{M}$  y una actividad hemolítica muy baja a estas mismas concentraciones (Ver tabla 4 y Fig. 30). Sin embargo, los datos obtenidos del espectro de DC indican que los cuatro péptidos mantienen una estructura secundaria estable del tipo  $\alpha$ -Hélice (Fig.28), característica de los IsCT's. Tal vez en este caso, la diferencia de actividad entre los péptidos sintéticos se deba a la diferencia de cargas entre ellos y/o a la distribución de las mismas en el extremo hidrofílico de la molécula más que a la estructura misma.

En la tabla 1 podemos observar que todos los péptidos presentan una carga neta de +1 a excepción de VsCT1 que presenta una carga neta de cero (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). Aunque VmCT1, VmCT2 y VsCT2 presentan una carga neta positiva (+1), la distribución de ésta en VsCT2 parece diferir de la de los otros péptidos (Fig.29).





**ANTIMICROBIANOS (NDBP-5)**

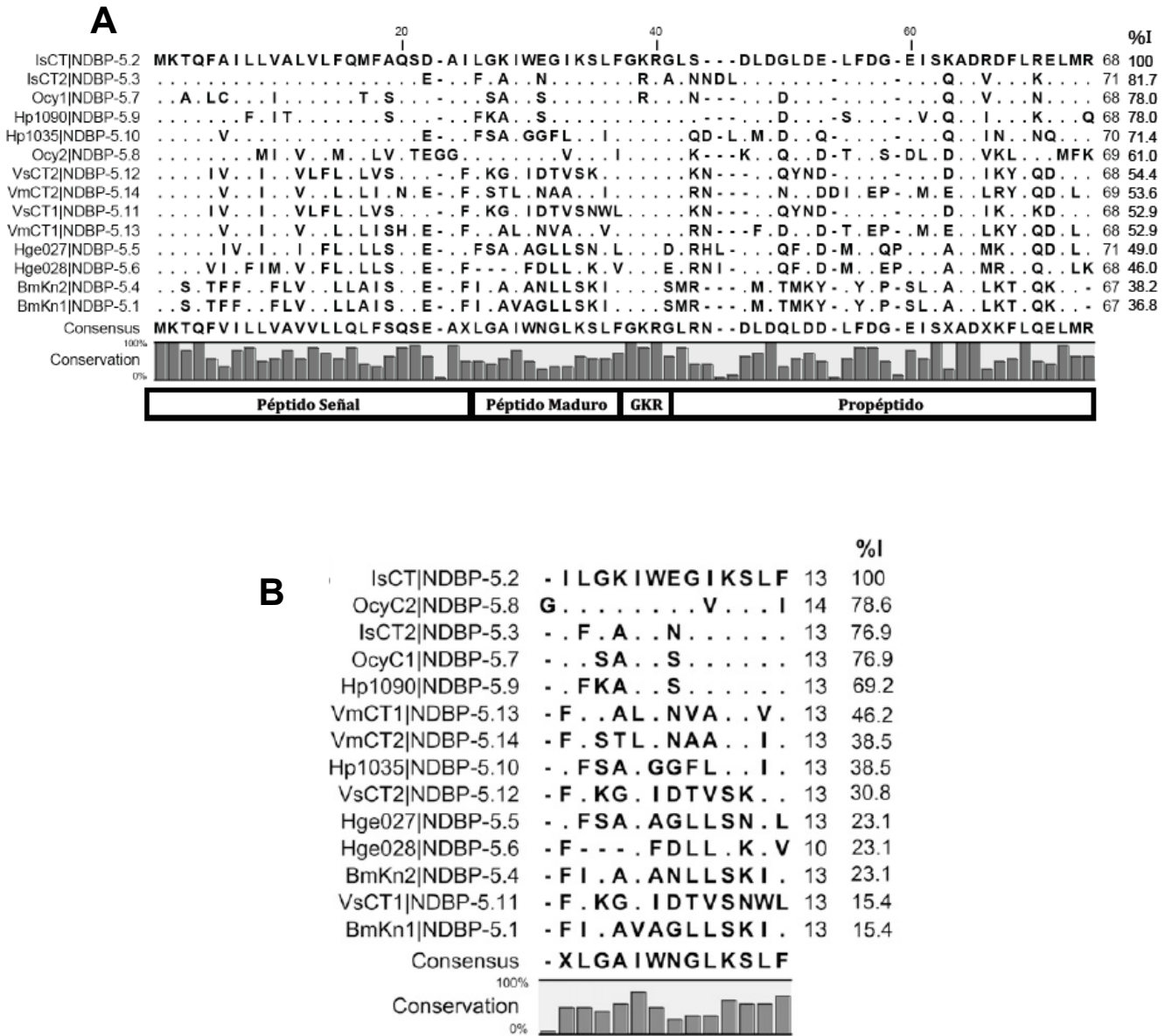


Fig.27. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de los precursores de VmCT1, VmCT2, VsCT1, VsCT2 y péptidos relacionados. A) El precursor esta constituido por tres regiones: un péptidos señal de 23 aa, un péptido maduro constituido por 13 aa y un propéptido de entre 32 y 35 aa. El propéptido inicia con un sitio de proteólisis muy conservado (Gly–Lye–Arg/Gly–Arg–Arg) que al ser procesado deja un péptido maduro amidado en su extremo C-terminal. Debajo del alineamiento se presenta un esquema de la organización del precursor. B) Alineamiento múltiple del péptido maduro de los integrantes de la subfamilia NDBP-5 reportados asta la fecha. Nótese la diferencia en el porcentaje de identidad entre ambos alineamientos, en B los porcentajes de identidad son menores con respecto al alineamiento presentado en A.El porcentaje de identidad global fue calculado con el programa lalign version 2.1.30. El alineamiento fue realizado en CLUSTALX (2.0) y editado con CLC Sequence Viewer 6.3.

**Tabla 3. Características físico-químicas de VmCT1, VmCT2, VsCT1 y VsCT2.**

Péptido	Secuencia	Masa (Da) Teórica	Masa (Da) Observada	Hidrofobicidad (GRAVY) <sup>a</sup>	Carga neta <sup>b</sup>
VmCT1	FLGALWNVAKSVF-NH <sub>2</sub>	1450.73	1450	1.208	+1
VmCT2	FLSTLWNAAKSIF-NH <sub>2</sub>	1496.76	1497	0.823	+1
VsCT1	FLKGIIDTVSNWL-NH <sub>2</sub>	1504.78	1505	0.762	Cero
VsCT2	FLKGIIDTVSKLF-NH <sub>2</sub>	1479.81	1481	1.015	+1

<sup>a</sup> El valor GRAVY (Grand Average of Hydropathy) para un péptido o una proteína es calculado como la suma de los valores hidropáticos de todos los aminoácidos, dividido por el número de residuos en la secuencia.

<sup>b</sup> Carga neta determinada a pH 7.0

Como se aprecia en los diagramas de Wheel (Fig.29), VsCT2 posee dos cargas positivas (Lys<sup>3</sup> y Lys<sup>11</sup>) y una carga negativa (Asp<sup>7</sup>) en su cara hidrofílica, el efecto que pueda tener el Asp sobre la carga positiva de cualquiera de los residuos de Lys afectara la distribución de la carga neta (+1) y por lo tanto la interacción del péptido con la membrana celular bacteriana. Además, comparado con VmCT1 y VmCT2, VsCT2 es menos hidrofóbico ya que posee menor número de residuos con estas características, esto se puede apreciar en la proyecciones de Wheel de estos péptidos (Fig.29).

**Tabla 4. Actividad Antibacteriana de VmCT1, VmCT2, VsCT1 y VsCT2.**

Cepa	Gram (±)	Concentración Mínima Inhibitoria (µM).			
		VmCT1	VmCT2	VsCT1	VsCT2
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	+	10	10	NA	NA
<b><i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633</b>	+	20	20	NA	NA
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	-	25	20	NA	NA
<b><i>Salmonella typhi</i> ATCC 6399</b>	-	5	10	NA	NA
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027</b>	-	10	10	NA	NA
<b><i>Streptococcus agalactiae</i><sup>a</sup></b>	+	20	20	NA	NA

NA= No presenta actividad antibacteriana asta una concentración máxima de 50 µM.

<sup>a</sup> Cepa proveniente de un aislado clínico.

Además de presentar una actividad antibacteriana similar, VmCT1 y VmCT2, son muy parecidos en su estructura secundaria y primaria (Fig.27B y 28). No obstante presentan una diferencia muy marcada en su actividad hemolítica (Fig.30). VmCT2 presenta una fuerte actividad contra eritrocitos humanos en comparación con VmCT1. Los resultados indican que a una concentración aproximada de 40µM de VmCT2 se alcanza un 50% de hemólisis, mientras que VmCT1 alcanza sólo un 10% de hemólisis incluso a la concentración máxima ensayada (50 µM). Tanto VsCT1 como VsCT2 no presentan actividad hemolítica. VmCT1 y VmCT2 sólo difieren en cuatro residuos, sin embargo la Ala<sup>4</sup> le confiere una superficie hidrofóbica ligeramente más amplia a VmCT1 con respecto a VmCT2 situación que podría estar relacionada con la diferencia de capacidad hemolítica que existe entre estos dos péptidos (Fig.29 y 30).

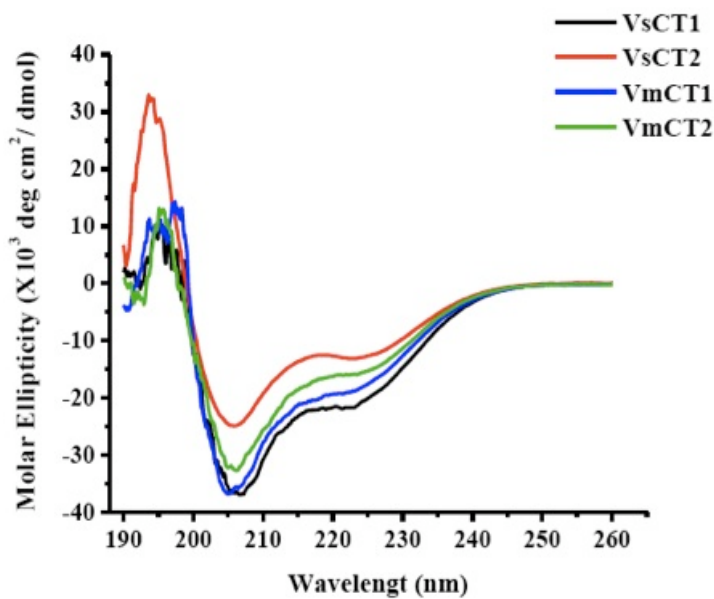


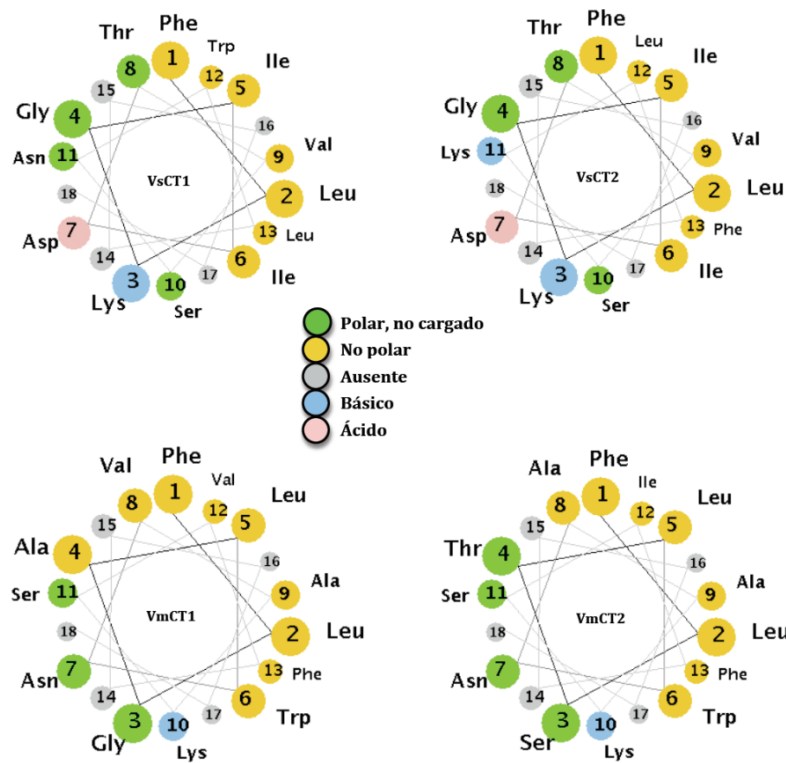
Fig.28. Espectros de DC de VmCT1, VmCT2, VsCT1 y VsCT2. La estructura secundaria de los péptidos sintéticos fue determinada por CD en un rango de 260 a 190 nm . Los cuatro espectros fueron realizados en TFE al 60% y a una concentración de 320µg/ml de cada péptido. Las mediciones fueron hechas por triplicado. Los cuatro espectros muestran un doble mínimo a 222nm y 208nm, y un máximo intenso a 191nm característicos de una conformación  $\alpha$ -hélice.

## 8.0 DISCUSIÓN

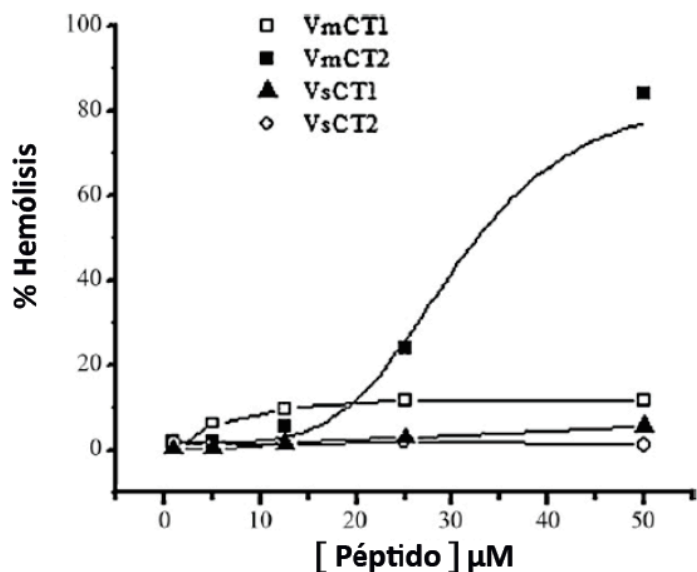
La naturaleza le brinda al hombre una variedad sorprendente e inusual de medicamentos, muchos de ellos provienen del veneno de los animales. Un ejemplo importante es el desarrollo del analgésico sintético PRIALT® (nombre genérico Ziconotide) que actúa como bloqueador de canales de calcio en nervios que transmiten señales de dolor, éste fármaco fue diseñado a partir de su equivalente natural,  $\omega$ -conotoxina MVIIA, presente en el veneno de *Conus magus* y ha sido utilizada con éxito en pacientes con dolor crónico resistente a morfina. Otro ejemplo es el Captopril un inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina (ACE: angiotensin-converting enzyme), esta enzima es esencial para la producción de Angiotensina la cual es un vasoconstrictor asociado con la hipertensión arterial. El Captopril fue diseñado en base al péptido Teprotide aislado del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. En el caso de los alacranes, varios péptidos han mostrado atributos suficientes para ser considerados tanto como herramientas moleculares para fines de investigación básica en el área de las neurociencias, así como también para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, cáncer, hipertensión y dolor. Incluso el veneno del alacrán azul *Rhopalurus junceus*, endémico de Cuba, es utilizado por médicos en el tratamiento de pacientes con cáncer (<http://kinastchile.cls/ccc43.htm>, <http://www.escozul-cancer.com/es/escozul-investigacion.html>).

Desafortunadamente, la búsqueda y caracterización de los componentes presentes en el veneno se complica por su escasa disponibilidad para la realización de los estudios que nos permitan obtener información sólida sobre la relación estructura-función de los componentes. Esta limitante se ha contrarrestado gracias al uso de estrategias más modernas en comparación con los métodos bioquímicos clásicos. Estas metodologías de frontera son la espectrometría de masas y técnicas de biología molecular que involucran la clonación y

Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*. secuenciación de genes [83]. La generación de bibliotecas de ADNc generadas a partir de las glándulas productoras del veneno de los alacranes ha sido una estrategia utilizada con el fin de explorar los componentes peptídicos que se transcriben en las glándulas y probablemente se traduzcan formando parte del veneno de los alacranes.



**Fig.29. Diagramas de Wheel de los péptidos VmCT1, VmCT2, VsCT1 y VsCT2.** Los diagramas sugieren que los cuatro péptidos poseen una estructura  $\alpha$ -hélice. Con claridad se puede observar en los cuatros péptidos una región hidrofóbica y otra hidrofílica.



**Fig.30. Ensayo de Hemólisis.** La actividad hemolítica fue estimada mediante monitoreo del incremento de la absorbancia a 570 nm después de incubar eritrocitos humanos con diferentes concentraciones de los péptidos durante 1 h a 37 °C. Como control positivo fue utilizado Tritón X-100 al 10% y como blanco PBS .

### Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*.

En este trabajo se generaron dos bibliotecas de ADNc a partir del ARN total extraído de las glándulas venenosas de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus* con el objetivo de obtener información acerca de los probables componentes del veneno de estos alacranes y buscar transcritos que codifiquen para péptidos con novedosas actividades farmacológicas.

El título de las bibliotecas no amplificadas fue de  $1.3 \times 10^5$  para *V.subcristatus* y de  $1.03 \times 10^6$  para *V. punctatus* con una eficiencia del 95 y 97% de clonas recombinantes, respectivamente. Como resultado de la secuenciación al azar de ambas bibliotecas obtuvimos varias secuencias de genes completos o parciales que codifican para precursores peptídicos (péptido señal, propéptido y péptido maduro). En este trabajo reportamos 26 nuevas secuencias de precursores peptídicos correspondientes a toxinas de  $K^+$ , toxinas de  $Na^+$ , scorpine-like, péptidos antimicrobianos, La1-like y toxinas de  $Ca^{2+}$ . Mediante el uso de los algoritmos mencionados en materiales y métodos, logramos obtener información acerca de sitios de corte por proteasas en las secuencias de los precursores, así como también información relacionada con el péptido señal, péptido maduro, propéptidos y modificaciones postraduccionales presentes en los precursores.

En general los componentes más representados en las bibliotecas que aquí reportamos son los correspondientes a péptidos antimicrobianos y en particular los pertenecientes a la subfamilia NDBP-5, también conocidos como IsCT-like. Además miembros de las subfamilias NDBP-3 y NDBP-4 también están presentes en *Vaejovis punctatus* y *V. subcristatus*. Recientemente se reportó un péptido antimicrobiano perteneciente a la subfamilia NDBP-3 aislado de *Vaejovis mexicanus* y al que se le denominó como Vejovina [75]. Este antecedente junto con los resultados presentados en este trabajo (ver anexo 1) nos indican que el veneno de los *Vaejovis* es una fuente rica de péptidos antimicrobianos más que de toxinas (Fig.12), caso contrario al que se presenta en alacranes pertenecientes a la familia Buthidae [83].

Dado que no existe reporte alguno sobre intoxicación por picadura de alacranes del género *Vaejovis*, es de esperar que precursores de toxinas de  $Na^+$  estén ausentes. Sin embargo, secuencias que representan supuestos péptidos homólogos a la Birtoxina (toxina de  $Na^+$ ) fueron encontradas en ambas librerías. No está claro cual es la función de estos péptidos en los *Vaejovis* e incluso restaría buscar la presencia de estos péptidos en el veneno crudo y probar su función. No obstante, este hecho es muy intrigante y significativo desde el punto de vista evolutivo.

Muy interesantes resultan ser las secuencias de VpKTx 1, 2 y VpTx4. Esta última es probablemente, una toxina de canales de calcio, en base a la comparación que se hace de esta secuencia con la de otras calcinas. Las otras dos secuencias representan probables toxinas  $\alpha$  de  $K^+$ .

Existen reportes de que en el veneno de alacranes que no representan alto grado de peligrosidad para los humanos (p.e. *H.gertschi*, *O.cayaporum*, *S.jendeki*, *H.petersii*, *O.madagascariensis*) se encuentra una gran diversidad de péptidos con actividades de importancia biotecnológica que podrían en un futuro ser aplicables en áreas como la farmacología y la agricultura. En el presente trabajo presentamos por primera vez una exploración molecular de los transcritos presentes en la glándula venenosa de alacranes pertenecientes al género *Vaejovis* (Familia: Vaejovidae) los cuales no representan peligro para los humanos. Cabe mencionar que la estrategia utilizada en este trabajo ya ha sido aplicada para el análisis del transcriptoma de otros animales

Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*. venenosos entre ellos algunas especies de alacranes [52-55,62,83]. La información obtenida en este trabajo nos proporciona una perspectiva sobre la composición molecular del veneno de los alacranes del género *Vaejovis*.

## 9.0 CONCLUSIONES

El presente trabajo representa el primer estudio acerca de la composición molecular y caracterización de los componentes peptídicos presentes en la glándula venenosa de los alacranes mexicanos, *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*. En este trabajo, se identificó la presencia de genes que codifican para precursores peptídicos que dan origen a péptidos que están muy probablemente involucrados en actividades biológicas tales como la caza y defensa contra sus depredadores. También se encontró la presencia de un arsenal de componentes peptídicos capaces de permitirles sobrevivir ante la exposición de microorganismos capaces de poder generarles infecciones mortales.

Mediante la generación de las librerías de ADNc no sólo hemos logrado identificar nuevos genes, sino que también hemos logrado generar una fuente estable e interminable de este material biológico que podrá ser utilizado en futuros análisis para la búsqueda de genes específicos que puedan estar presentes en las glándulas venenosas de *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*.

De este trabajo podemos resaltar las siguientes conclusiones:

- Se lograron generar dos bibliotecas de ADNc que representan el contenido transcripcional de alacranes del genero *Vaejovis* (familia: Vaejovidae), ambas librerías presentaron más del 90% de clonas recombinantes. Los transcritos aislados de estas bibliotecas presentan similitud con secuencias previamente descritas tanto en alacranes Butidos y no Butidos.
- Se identificó una secuencia correspondiente al precursor de una toxina de canales de  $Ca^{2+}$ . Tal secuencia se denominó VpTx4 de *Vaejovis punctatus*. La región del péptido maduro de esta calcina presenta 81.8% de identidad con la Maurocalcina una toxina capaz de actuar sobre receptores de Rianodina tipo 1.
- Se identificaron y sintetizaron péptidos antimicrobianos y hemolíticos pertenecientes a la familia NDBP-5. La actividad antibacteriana de VsCT1, VsCT2, VmCT1 y VmCT2 fue probada contra una batería de cepas Gram(-) y Gram(+). VsCT1 y VsCT2, no presentaron actividad antimicrobiana, pero sí actividad hemolítica cuando fueron expuestos a eritrocitos en suspensión. Sin embargo VmCT1 y VmCT2 sí presentaron actividad antibacterial y un bajo porcentaje de hemólisis. Los resultados del espectro de DC indican que la estructura secundaria de estos cuatro péptidos corresponde a una  $\alpha$ -hélice en presencia de TFE al 60%.

Este estudio abona al conocimiento general sobre los componentes del veneno de alacranes mexicanos no Butidos, proporciona una visión particular sobre la composición molecular del veneno de los *Vaejovis* y

Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*. expone además el valor biotecnológico y farmacológico que podrían generar los componentes peptídicos presentes en el veneno de estos alacranes.

## 10.0 PERSPECTIVAS

- Realizar la expresión de las toxinas VpKTx1 y VpKTx2, para probar su probable actividad sobre canales de potasio.
- Sintetizar y caracterizar péptidos con probable actividad antimicrobiana, sobre todo aquellos pertenecientes a la subfamilia NDBP-3, NDBP-4 y NDBP-5 de *Vaejovis punctatus*.
- Realizar la expresión de la Calcina (VpTx4) de *V. punctatus* y probar su actividad sobre canales de Ca<sup>2+</sup>.
- Realizar un análisis bioquímico del veneno total de *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*.

## 11.0 REFERENCIAS

- [1] Polis G.A. (1990) The biology of scorpions. Stanford, CA: Stanford University Press.
- [2] Prendini L, Wheeler W.C. (2005) Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics*. 21, 446–494.
- [3] Torres L.A, Gurrola G.B, Zamudio F.Z, Possani L.D. (2000) Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of scorpion *Hadrus aztecus*. *Eur. J. Biochem*. 267, 5023 – 5031.
- [4] Conde R, Zamudio F.Z, Rodriguez M.H, Possani L.D. (2000) Scorpine, an anti-malaria and antibacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Letters* 471, 165-168
- [5] Lewis R.J, Garcia M.L. (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2, 790-802.
- [6] Dai L, Yasuda A, Naoki H, Corzo G, Andriantsiferana M, Nakajima T. (2001) IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 286, 820 – 825.
- [7] Chen Z, Hu Y, Han S, Yin S, He Y, Wu Y, Cao Z, Li W. (2010) ImKTx1, a New Kv1.3 Channel Blocker with a Unique Primary Structure. *J Biochem Molecular Toxicology*.1-8
- [8] Han S, Hu Y, Zhang R, Yi H, Wei J, Wu Y, Cao Z, Li W, He X. (2011). ImKTx88, a novel selective Kv1.3 channel blocker derived from the scorpion *Isometrus maculatus*. *Toxicon* 57 348–355.
- [9] CONABIO (comp.) 2008. Catálogo de autoridades taxonómicas de los arácnidos (Arachnida: Arthropoda) de México. Base de datos SNIB-CONABIO. México.
- [10] Lourenço W.R. & Sissom W.D. (2000). Scorpiones. In: Bousquets, J.L., González Soriano, E. & Papavero, N. (Eds.) Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artrópodos de México: Hacia una Síntesis de su Conocimiento. Volume II. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 115–135.
- [11] Sissom W.D. & Francke O.F. (1981) Scorpions of the genus *Paruroctonus* from New Mexico and Texas (Scorpiones, Vaejovidae). *Journal of Arachnology* 9: 93–108.

**Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*.**

- [12] Sissom W.D. (1989) Redescription of *Vaejovis occidentalis* Hoffmann with a revised diagnosis for *Vaejovis subcristatus* Pocock (Scorpiones, Vaejovidae). *Revue Arachnologique*. 8, 179–187.
- [13] Sissom W.D. 2000. Family Vaejovidae. In: Fet, V., Sissom, W.D., Lowe, G. & Braunwalder, M.E. *Catalog of the Scorpions of the World (1758–1998)*. The New York Entomological Society, New York, 503–553.
- [14] Zeng X, Corzo G, Hahin R.(2005) Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges. *IUBMB Life*. 57(1), 13 – 21.
- [15] Zeng X, Wang S, Zhu Y, Zhu S, Li W.(2004) Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*. 25, 143–150.
- [16] Tytgat J, Chandy K.G, Garcia M.L, Gutman G.A, Martin-Eauclaire M.F, van der Walt J.J, Possani L.D. (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci*. 20, 444 – 447.
- [17] Rodriguez de la Vega RC & Possani LD. (2005) Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure–function relationships and evolution. *Toxicon*. 46, 831–844.
- [18] Rodriguez de la Vega RC & Possani LD. (2007) Novel paradigms on scorpion toxins that affect the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon* 49, 171-180.
- [19] Zhijian C, Feng L, Yingliang W, Xin M, Wenxin L. (2006) Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon* 47, 348–355.
- [20] Goudet C, Chi C, Tytgat J. (2002) An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*. 40, 1239–1258.
- [21] Rodriguez de la Vega R.C & Possani L.D. (2004) Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon* 43, 865 – 875.
- [22] Goudet C, Chi C.W, Tytgat J. (2002) An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 40, 1239–1258.
- [23] Gurrola GB, Hernández-López RA, Rodríguez de la Vega RC, Varga Z, Batista CV, Salas-Castillo SP, Panyi G, Del Río-Portilla F, Possani LD. (2012) Structure, Function, and Chemical Synthesis of *Vaejovis mexicanus* Peptide 24: A Novel Potent Blocker of Kv1.3 Potassium Channels of Human T Lymphocytes. *Biochemistry* 51:4049-4061.
- [24] Srinivasan K.N, Sivaraja V, Huys I, Sasaki T, Cheng B, Kumar T.K, Sato K, Tytgat J, Yu C, San B.C, Ranganathan S, Bowie H.J, Kini R.M, Gopalakrishnakone P. (2002) kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J. Biol. Chem*. 277, 30040–30047.
- [25] Ricardo C. Rodríguez de la Vega, Enrique Merino, Baltazar Becerril and Lourival D. Possani. (2003) Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 24, 222-227.
- [26] Cestele, S., Catterall, W.A. (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883–892.
- [27] Gordon, D., Martin-Eauclaire, M-F., Cetele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Ben Khalifa, R., Pelhate, M., Rochat, H. (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J. Biol. Chem*. 271, 8034–8045.
- [28] Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., Zinn-Justin, S. (1998) Functional anatomy of scorpion toxins affecting



Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*. sodium channels. J. Toxicol. Toxin Rev. 17, 131–159.

[29] Froy, O., Zilberberg, N., Gordon, D., Turkov, M., Gilles, N., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Loret, E., Oren, D.A., Shaanan, B., Gurevitz, M. (1999) The putative bioactive surface of insect-selective scorpion excitatory neurotoxins. J. Biol. Chem. 274, 5769–5776.

[30] Zlotkin E. (1997) Toxins and Signal Transduction (Lazarovici, P. And Gutman, Y., eds). Harwood Press, Amsterdam, 95-117.

[31] Lester D., Lazarovici P., Pelhate M., Zlotkin E. (1982) Purification, characterization and action of two insect toxins from the venom of the scorpion *Buthotus judaicus*. Biochim Biophys Acta 701, 370-381.

[32] Gordon D., Moskowitz H., Eitan M., Warner C., Catterall W.A., Zlotkin, E. (1992) Localization of receptor sites for insect-selective toxins on sodium channels by site-directed antibodies. Biochemistry 31, 7622–7628.

[33] Schiavon E., Sacco T., Cassulini R.R., Gurrola G., Tempia F., Possani L.D., Wanke E. (2006) 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. 281, 20326–20337.

[34] Gordon D, Karbat I, Ilan N, Cohen L, Kahn R, Gilles N, Dong K, Stühmer W, Tytgat J, Gurevitz M. (2007) The differential preference of scorpion  $\alpha$ -toxins for insect or mammalian sodium channels: Implications for improved insect control. Toxicon 49, 452–472.

[35] Zamudio FZ, Conde R, Arevalo C, Becerril B, Martin BM, Valdivia H.H., Possani L. D. (1997) The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. J Biol Chem 272, 11886-11894.

[36] Zamudio F. Z., Gurrola G. B., Arevalo C., Sreekumar R., Walker J. W., Valdivia H. H., Possani L. D. (1997) Primary structure and synthesis of Imperatoxin A (IpTxa), a peptide activator of  $Ca^{2+}$  release channels/ryanodine receptors. FEBS Lett. 405, 385–389.

[37] Lee C.W., Lee E.H., Takeuchi K., Takahashi H., Shimada I., Sato K., Shin S.Y., Kim D.H., Kim J.I. (2004) Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. Biochem. J. 377, 385–394.

[38] Schwartz E.F., Capes E.M., Diego-García E., Zamudio F.Z., Fuentes O., Possani L.D., Valdivia H.H. (2009) Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. British Journal of Pharmacology. 157, 392–403.

[39] Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De Waard M., Sabatier J-M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. Biochem. J. 378, 717–726.

[40] Linz, W., Wiemer, G., Gohlke, P., Unger, T., and Scholkens, B. A. (1995) Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. Pharmacol. Rev. 47, 25 – 49.

[41] Ferreira, L. A. F., Alves, E. W., Henriques, O. B., and Henriques, O. B. (1993) Peptide T, a novel bradykinin-potentiating peptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon 31, 941 – 947.

[42] Meki, A. M. A., Nassar, A. Y., and Rochat, H. (1995) A bradykinin-potentiating peptide (peptide K 12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. Peptides 16, 1359 – 1365.

[43] Zeng, X. C., Li, W. X., Peng, F., and Zhu, Z. H. (2000) Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a Bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. IUBMB Life 49, 207 – 210.

**Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*.**

[44] Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., and Nakajima, T. (2002) Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1514 – 1522.

[45] Verdonck, F., Bosteels, S., Desmet, J., Moerman, L., Noppe, W., Willems, J., Tytgat, J., and van der Walt, J. (2000) A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). *Cimbebasia* 16, 247 – 260.

[46] Oren, Z. & Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451–463 (1998).

[47] Huang, H.W. Molecular mechanism of peptide induced pores in membranes. *Phys. Rev. Lett.* 92, 198304-1 – 198304-4 (2004).

[48] Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., and Possani, L. D. (2000) Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of scorpion *Hadrus aztecus*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5023 – 5031.

[49] Verdonck, F., Bosteels, S., Desmet, J., Moerman, L., Noppe, W., Willems, J., Tytgat, J., and van der Walt, J. (2000) A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). *Cimbebasia* 16, 247 – 260.

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

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

[52] Silva, E.C.N., Camargos, T.S., Maranhão, A.Q., Silva-Pereira, I., Paulino, L., Possani, L.D., Schwartz, E.F., 2009. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 54, 252–261.

[53] Schwartz E.F, Diego-García, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2007. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics* 8, 119–128.

[54] D'Suze, G., Schwartz, E.F., García-Gómez, B.I., Sevcik, C., Possani, L.D., 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. *Biochimie* 91, 1010–1019.

[55] B.I. García-Gómez, F.I.V. Coronas, R. Restano-Cassulini, R.R. Rodríguez, L.D. Possani. (2011). Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. *Toxicon* 58, 18–27.

[56] Schwartz E.F, Camargos T.S, Zamudio F.Z, Silva L.P, Bloch Jr.C, Caixeta F, Schwartz C.A, Possani L.D, 2008. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 51, 1499–1508.

[57] Batista C.V, del Pozo L, Zamudio F, Contreras S, Becerril B, Wanke E, Possani L.D, 2004. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J. Chromatogr. B* 803, 55–66.

[58] Batista, C.V., Román-González, S.A., Salas-Castillo, S.P., Zamudio, F.Z., Gómez-Lagunas, F., Possani, L.D., 2007. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146 (1–2), 147–157.

**Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*.**  
[59] Batista, C.V., D'Suze, G., Gomez-Lagunas, F., Zamudio, F.Z., Encarnacion, S., Sevcik, C., Possani, L.D., 2006. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics* 6, 3718–3727.

[60] Hernández-Aponte, C.A., Silva-Sanchez, J., Quintero-Hernández, V., Rodríguez-Romero, A., Balderas, C., Possani, L.D., Gurrola, G.B., 2011. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. *Toxicon* 57, 84–92.

[61] Masahiro Miyashita, Junko Otsuki, Yosuke Hanai, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa. (2007) Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (Hemiscorpiidae). *Toxicon*. 50, 428–437.

[62] Elia Diego-García, Steve Peigneur, Elke Clynen, Tessa Marien, Lene Czech, Liliane Schoofs, Jan Tytgat. (2011) Molecular diversity of the telson and venom components from *Pandinus cavimanus* (Scorpionidae Latreille 1802): Transcriptome, Venomics and Function. *pmc*. En prensa.

[63] Inceoglu B, Lango J, Pessah IN, Hammock BD. (2005) Three structurally related, highly potent, peptides from the venom of *Parabuthus transvaalicus* possess divergent biological activity. *Toxicon* 45(6):727–33.

[64] Abbas N, Rosso JP, Céard B, Belghazi M, Lebrun R, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. (2011) Characterization of three “Birtoxin-like” toxins from the *Androctonus amoreuxi* scorpion venom. *Peptides* 32, 911–919.

[65] Caliskan F, García BI, Coronas FI, Batista CV, Zamudio FZ, Possani LD. (2006) Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. *Toxicon* 48(1):12–22.

[66] Valdez-Cruz, N.A., Batista, C.V., Zamudio, F.Z., Bosmans, F., Tytgat, J., Possani, L.D., 2004. Phaiodotoxin, a novel structural class of insect-toxin isolated from the venom of the Mexican scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur. J. Biochem.* 271, 4753–4761.

[67] Soudani, N., Gharbi-Chichi, J., Srairi-Abid, N., Martin-El Yazidi, C., Planells, R., Magotat, A., Torresani, J., El Ayeb, M., 2005. Isolation and molecular characterization of LVP1 lipolysis activating peptide from scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1747, 47–56.

[68] Srairi-Abid N, Shahbazzadeh D, Chatti I, Mlayah-Bellalouna S, Mejdoub H, Borchani L, Benkhalifa R, Akbari A, El Ayeb M. (2008) Hemitoxin, the first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *FEBS J.* 275 (18), 4641-4650

[69] Kharrat R, Mansuelle P, Sampieri F, Crest M, Oughideni R, Van Rietschoten J, Martin-Eauclaire MF, Rochat H, El Ayeb M. (1997) Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from *Scorpio maurus* venom: purification, structure and action on potassium channels. *FEBS Lett.* 406 (3), 284-290

[70] Zhu S, Darbon H, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J. (2003) Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *Faseb J*, 17(12):1765-1767.

[71] Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H., Possani, L.D., 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 471 (2–3), 165–168.

[72] R. Carballar-Lejarazú, M. H. Rodríguez, F. de la Cruz Hernández-Hernández, J. Ramos-Castañeda, L. D. Possani, M. Zurita-Ortega, E. Reynaud-Garza, R. Hernández-Rivas, T. Loukeris, G. Lycett, H. Lanz-Mendoza. (2008) Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3081 – 3092.

[73] Diego-Garcia E, Batista CV, Garcia-Gomez BI, Lucas S, Candido DM, Gomez-Lagunas F, Possani LD: The

- Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*. Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon* 2005, 45(3):273-283.**
- [74]Zhao Ruiming, Ma Yibao, He Yawen, Di Zhiyong, Wu Yingliang, Cao Zhijian, Li Wenxin. (2010).Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components. *BMC Genomics*, 11:452.
- [75]Hernández-Aponte, C.A., Silva-Sanchez, J., Quintero-Hernández, V.,Rodríguez-Romero, A., Balderas, C., Possani, L.D., Gurrola, G.B., 2011. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. *Toxicon* 57, 84–92.
- [76]Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Zhao, R., Wang, Q., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2008. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3967–3972.
- [77]Zhao, Z., Ma, Y., Dai, C., Zhao, R., Li, S.R., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2009. Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3472–3477.
- [78]Gao B, Sherman P, Luo L, Bowie J, Zhu S: Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides. *Faseb J* 2009, 23(4):1230-1245.
- [79] Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.P., Krier, F., Revol-Junelles, A.M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., Rossier, J., 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J. Biol. Chem.* 276 (21), 17823–17829.
- [80]Hale, Hancock. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5:951–959.
- [81]Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in 374 bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238–250.
- [82]Lee K, Shin SY, Kim K, Lim SS, Hahm KS, Kim Y. Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:712–719.
- [83]V. Quintero-Hernández, E. Ortiz, M. Rendón-Anaya, E.F. Schwartz, B. Becerril, G. Corzo, L.D. Possani. (2011) Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression. *Toxicon*, 58:644–663.
- [84] Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, 296: 90-91.
- [85] Possani LD, Martin BM, Svendsen I. (1982) The primary structure of noxiustoxin: A K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* hoffmann. *Carlsberg Res. Commun*, 47:285-289.
- [86] Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J. (1999) Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur. J. Biochem.* 264: 287–300.
- [87] Olamendi-Portugal T, Gomez-Lagunas F, Gurrola GB, Possani LD.(1996) A novel structural class of K<sup>+</sup>-channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*.*Biochem. J.* 315:977-981.
- [88]Olamendi-Portugal T, Gomez-Lagunas F, Gurrola GB, Possani LD. (1998) Two similar peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, one highly effective blocker and the other inactive on K<sup>+</sup> channels. *Toxicon* 36 (5), 759-770.

**Generación y caracterización de bibliotecas de ADNc de la glándula venenosa de los alacranes *Vaejovis punctatus* y *Vaejovis subcristatus*.**

[89] Zhu S, Huys I, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J.(2004) Evolutionary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. *Proteins* 54 (2):361-370.

[90] D'Suze G, Zamudio F, Gomez-Lagunas F, Possani LD. (1999) A novel K<sup>+</sup> channel blocking toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *FEBS Lett.* 456 (1): 146-148.

[91] Rogowski RS, Krueger BK, Collins JH, Blaustein MP. (1994) Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K<sup>+</sup> channels and unblocks inactivating K<sup>+</sup> channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (4): 1475-1479.

[92] Papp F, Batista CV, Varga Z, Herceg M, Roman-Gonzalez SA, Gaspar R, Possani LD, Panyi G. (2009) Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon* 54 (4): 379-389.

[93] Gomez-Lagunas F, Olamendi-Portugal T, Zamudio FZ, Possani LD.(1996) Two novel toxins from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* show that the N-terminal amino acid sequence is important for their affinities towards Shaker B K<sup>+</sup> channels *J. Membr. Biol.* 152 (1):49-56.

[94] Romi-Lebrun R, Lebrun B, Martin-Eauclaire MF, Ishiguro M, Escoubas P, Wu FQ, Hisada M, Pongs O, Nakajima T. (1997) Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion *Buthus martensi*, which act on K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* 36 (44): 13473-13482.

## **12.0 ANEXO**

Como producto del trabajo presentado se adjunta a continuación el artículo titulado “Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae”, el cual fue aceptado y publicado por la revista “Peptides”. Este artículo contempla la parte de caracterización de los péptidos antimicrobianos pertenecientes a la subfamilia NDBP-5.



## Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family *Vaejovidae*

Santos Ramírez-Carreto, Verónica Quintero-Hernández, Juana María Jiménez-Vargas, Gerardo Corzo, Lourival D. Possani, Baltazar Becerril\*, Ernesto Ortiz\*

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad, 2001, Colonia Chamilpa, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 December 2011

Received in revised form 31 January 2012

Accepted 1 February 2012

Available online 10 February 2012

#### Keywords:

Antimicrobial peptide

cDNA library

Scorpion

*Vaejovis*

### ABSTRACT

From the cDNA libraries made from the venom glands of two scorpions belonging to the *Vaejovidae* family, four different putative non disulfide-bridged antimicrobial peptides were identified: VmCT1 and VmCT2 from *Vaejovis mexicanus smithi* plus VsCT1 and VsCT2 from *Vaejovis subcristatus*. These short peptides (with only 13 amino acid residues each) share important amino acid sequence similarities among themselves and with other reported antimicrobial peptides, but their biological activities vary dramatically. This communication reports the cloning, chemical synthesis and characterization of these peptides. Two peptides, VmCT1 and VmCT2 showed broad-spectrum antibacterial activity with minimum inhibitory concentrations MICs in the range of 5–25  $\mu$ M and 10–20  $\mu$ M respectively, whereas their hemolytic activity at these concentrations was low. Structure–function relationships that might determine the differences in activities are discussed.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Scorpion venoms contain a large number of diverse peptides with different biological activities, reason why they have been developed as possible molecular tools for pharmacological research and have generated expectation as potential therapeutic agents [9]. Based on their primary structure, these peptides can be classified in two large groups: disulfide-rich peptides and those with no disulfide bonds [21]. To the first group belong the large majority of the components responsible for venom toxicity. Most toxins contain from 30 to 70 amino acid residues, closely packed by three or four disulfide bridges and interact in a specific manner with Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup> ion channels. Among these peptides are those that block the ion-channel current and those that affect the gating mechanisms of the channels in excitable and non excitable cells [14,17]. Due to the problem of public health related to scorpion envenoming, and to the usefulness of toxins as tools for studying components of the nervous system, the biomedical research has mainly focused on the characterization of the disulfide rich components of the scorpion venoms. The second group, constituted by non-disulfide-bridged peptides (NDBPs), is a less well-studied component of the scorpion venoms. Their structure, evolution and

pharmacological activity greatly differ from that of the disulfide rich peptides [21]. Some examples include Hadrurin from *Hadrurus aztecus* [16], Parabutoporin 1 and 2 from *Opisthophthalmus carinatus* [11], BmKn1 and BmKn2 from *Mesobuthus martensii* Karsch [22,23], Pandinins 1 and 2 from *Pandinus imperator* [4], plus IsCT and IsCT2 from *Opisthacanthus madagascariensis* [5,6]. The length of these peptides ranges from 13 to 47 amino acids. Since their mechanism of action does not involve a specific pathway, they inhibit the growth of a wide range of microorganisms, including fungi, yeasts, Gram-positive and Gram-negative bacteria. Although some of these peptides are cytotoxic to mammalian cells [21], they could constitute valuable drugs for the treatment of topical infections [18]. Very recently, peptide BmKbpp from *Mesobuthus martensii* Karsch was reported to be a multifunctional peptide since, along with the antimicrobial activities, it displays immune-regulatory and bradykinin-potentiating activities [24]. This discovery widens the known spectrum of action of the NDBPs and highlights their importance as potential drugs.

IsCT, IsCT2, BmKn1 and BmKn2 comprise a family of cationic peptides with common characteristics, such as: length (only 13 amino acids long), absence of cysteine residues and amidated amino acid at the carboxylic region. When dissolved in aqueous trifluoroethanol (TFE), they were shown to adopt an amphipathic  $\alpha$ -helix folding. They display antimicrobial and cytotoxic activities [5,6,21–23].

From two cDNA libraries constructed from the venomous glands of scorpions of the Mexican species *Vaejovis mexicanus smithi*

\* Corresponding authors. Tel.: +52 777 3291669; fax: +52 777 3172388.

E-mail addresses: [baltazar@ibt.unam.mx](mailto:baltazar@ibt.unam.mx) (B. Becerril), [erne@ibt.unam.mx](mailto:erne@ibt.unam.mx) (E. Ortiz).

and *Vaejovis subcristatus*, we were able to identify and clone four transcripts that code for putative peptide precursors that share amino acid sequence similarities with the reported IsCT and IsCT2 peptides from the geographically unrelated scorpion species *O. madagascariensis* from Madagascar [5,6]. Based on the cDNA sequences, we synthesized four peptides (VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2) and characterized their cytotoxic and antibacterial activities. These peptides share common structural characteristics, but their antibacterial and cytotoxic activities are quite different.

## 2. Material and methods

### 2.1. cDNA libraries construction

For the construction of the cDNA libraries of the scorpions *V. mexicanus smithi* and *V. subcristatus*, a single telson (the last post abdominal segment where a pair of venomous glands are located) from each species was used. The telsons were dissected 4–5 days after venom extraction. Total RNA was purified with the Total RNA Isolation System Kit (Promega, Madison, WI, USA). For cDNA synthesis and further library construction, the Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit (CLONTECH Lab., Palo Alto, CA) was used, according to the manufacturer's instructions. Briefly, for first-strand cDNA synthesis, coupled with (dC) tailing by RT-PCR, SMART IV oligonucleotide (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3', SfiA site underlined) and CDS III/3' PCR Primer (5'-ATTCTAGAGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>-1</sub>N-3'; with N=A, G, C, or T; N<sub>-1</sub>=A, G, or C, and the SfiB site underlined) were incubated with 1 µg of total RNA and the MMLV Reverse Transcriptase mix for 1 h at 42 °C. Two microliters from the first strand cDNA reaction were taken for cDNA amplification with the 5' PCR Primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') and CDS III/3' PCR Primer. Twenty two cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, followed by 6 min annealing/extension at 68 °C were carried out and the PCR products were analyzed by 1% agarose gel. The reaction mix was treated with Proteinase K in order to inactivate the DNA polymerase, and the PCR products were digested with SfiI at 50 °C for 2 h. Since we were interested in cloning both large and short fragments from these libraries, the digested cDNA was not fractionated by size, as it is normally suggested by the manufacturer. The SfiI digested cDNA was ligated to the provided dephosphorilated pDNR-LIB vector and transformed into electrocompetent DH5α *Escherichia coli* cells by electroporation. Random colonies were assayed by colony PCR and those with cloned inserts with sizes larger than 500 bp were selected for plasmid production by standard alkaline lysis, and were subjected to automated sequencing (Model CG1-96, Corbett Research Pty Ltd, Sydney, Australia). The sequences obtained were analyzed with the ApE – A plasmid Editor v1.12 program and compared to the non-redundant GenBank sequences with Blastn, Blastx and Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). The cDNAs coding for VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2 were identified and their putative function was predicted by sequence similarities with

other peptides of known function. Multiple alignments were performed with CLUSTALX v2.0 and the CLC Sequence Viewer v6.3 program was used to present the results. The putative signal peptides, the propeptides and the mature peptides were established with the help of the SignalP v3.0 program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). The GenBank accession numbers for the cDNAs with complete CDS are: JQ086325 for VmCT1, JQ086326 for VmCT2, JQ086327 for VsCT1 and JQ086328 for VsCT2.

### 2.2. Peptide synthesis

The synthetic peptides with amidated C-termini were manufactured by GenScript USA Inc. (New Jersey, USA) and delivered in their crude forms. For the activity assays, the peptides were previously purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with an analytical C4 column (Vydac, Hesperia, CA). A gradient prepared with buffer A (0.12% trifluoroacetic acid – TFA – in water) and buffer B (0.10% TFA in acetonitrile) was applied to the column from 20% to 80% buffer B, during 80 min. The molecular weight of the pure peptides was confirmed by mass spectrometry on a Finnigan LCQ<sup>DUO</sup> electrospray ionization ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA) (Table 1).

### 2.3. Bacterial strains

For the antibacterial assays the following strains were used: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 6399, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Streptococcus agalactiae* from a clinical isolate.

### 2.4. Antimicrobial assays

The determination of the bacterial growth inhibition curves and the MIC were performed by the broth micro-dilution method in liquid Mueller–Hinton medium, following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, <http://www.clsi.org>). The MIC is defined as the lowest peptide concentration that totally inhibits bacterial growth. Dilutions of the pure peptides to 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 and 50 µM concentrations were prepared by dissolving the dried peptides in 5 µl 1:1 (V/V) distilled water and acetonitrile, and adding 195 µl of Mueller–Hinton medium with 1 × 10<sup>6</sup> CFU/ml of the desired bacterial strain. The 200 µl samples were transferred to the wells of a 96-well ELISA plate and the plate was then incubated at 37 °C. All samples were analyzed by triplicate. The bacterial growth was monitored every 4 h by reading the plate at 620 nm in an ELISA plate reader (BIORAD, Model 450). As the positive control a cell suspension of the same density of each strain, with no peptide added, was used. The negative control was sterile Mueller–Hinton medium.

### 2.5. Hemolysis assays

The hemolytic activity was assessed by incubating a suspension of human erythrocytes from a volunteer healthy donor with

**Table 1**  
Physicochemical properties of VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2.

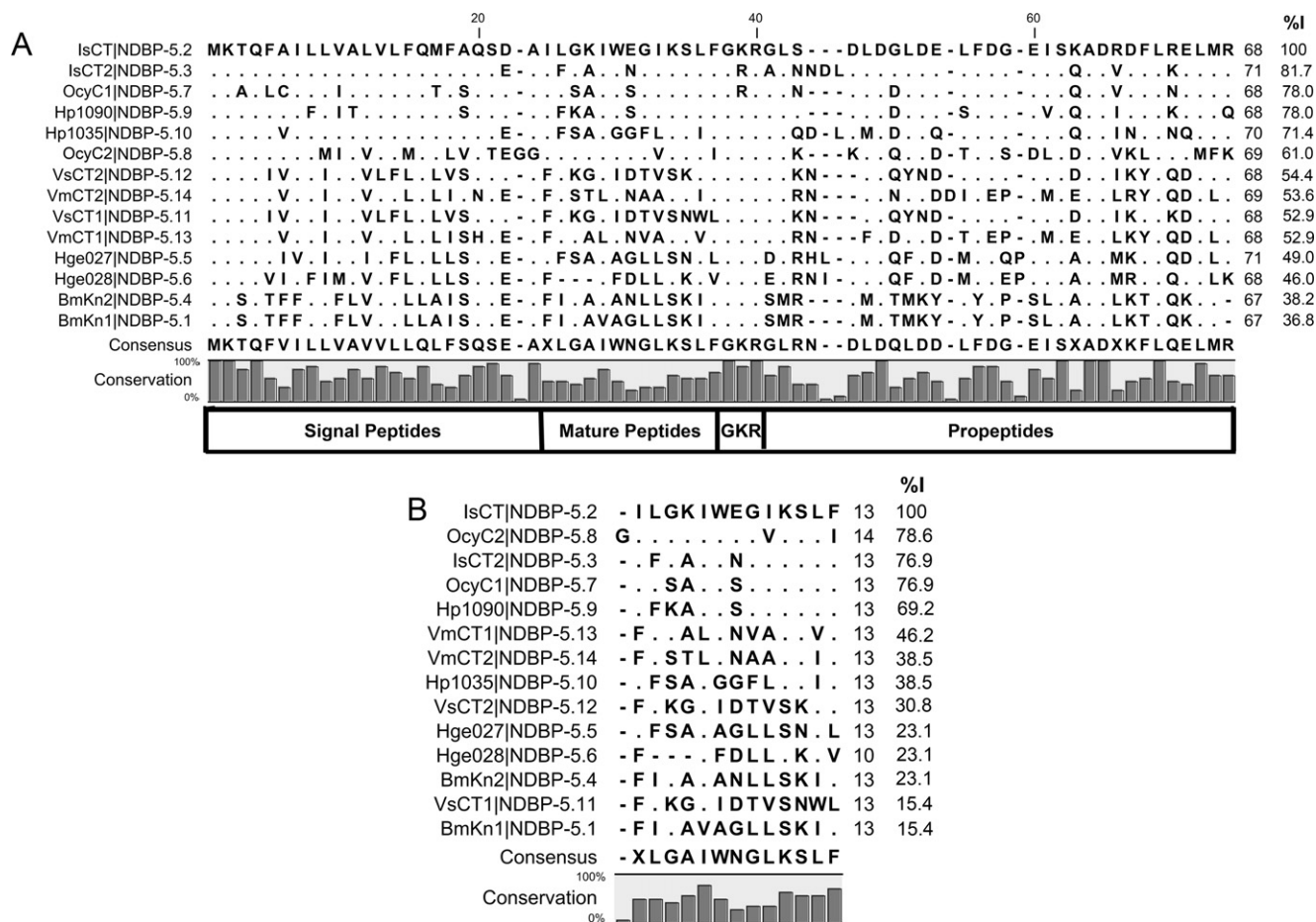
Peptide	Amino acid sequence	Molecular mass (Da)		Hydrophobicity (GRAVY) <sup>a</sup>	Charge <sup>b</sup>
		Theoretical	Observed		
VmCT1	FLGALWNVAKSVF <sup>c</sup>	1450.73	1450	1.208	+1
VmCT2	FLSTLWNAAKSIF <sup>c</sup>	1496.76	1497	0.823	+1
VsCT1	FLKGIIDTVSNWL <sup>c</sup>	1504.78	1505	0.762	0
VsCT2	FLKGIIDTVSKLF <sup>c</sup>	1479.81	1481	1.015	+1

<sup>a</sup> The GRAVY (Grand Average of Hydropathy) value is calculated as the sum of the hydropathy values for all the amino acids divided by the total number of amino acids.

<sup>b</sup> Net charge determined at pH 7.0.

<sup>c</sup> Means that the C-terminal residue is amidated.





**Fig. 1.** Sequence comparison between VmCT1, VmCT2, VsCT1, VsCT2 and other reported NDBP-5 family members. (A) Multiple alignment between the precursor sequences of the peptides. The precursors comprise three regions (indicated as boxes below the alignment): a 23 amino acids signal peptide, the 13 amino acids mature peptide, and a propeptide of 32–35 amino acids. The propeptide starts after a conserved (GKR or GRR) proteolysis site, that is used for amidation of the mature peptide posttranslationally. (B) Multiple alignment between the mature peptides. In both cases (A and B), the percentage of identity (% I) was determined with LALIGN v. 2.1.30. The alignments were performed with CLUSTALX v. 2.0 and edited with CLC Sequence Viewer v. 6.3.

increasing concentrations of each peptide. The collected red blood cells were washed three times by centrifugation at 3000 g for 5 min in 1X PBS, pH 7.4. The erythrocytes were counted in a hemocytometer and the cell concentration of the working suspensions was adjusted to  $6 \times 10^8$  cells/ml. The cell suspensions were then incubated for 1 h at 37 °C with increasing concentrations of the analyzed peptides: 1, 5, 12.5, 25 and 50  $\mu$ M. Ten percent Triton X-100 was used as positive control (100% lysis) and 1X PBS, pH 7.4 as negative control. After incubation, the samples were centrifuged for 5 min at 10,000  $\times$  g and the supernatants were used to measure the absorbance at 570 nm in a NanoDrop ND-1000 V3.5.2 spectrophotometer (NanoDrop, DE, USA) [4,13]. The relative absorbance against Triton X defines the percentage of hemolysis. All peptide concentrations were tested by triplicate.

## 2.6. CD spectra

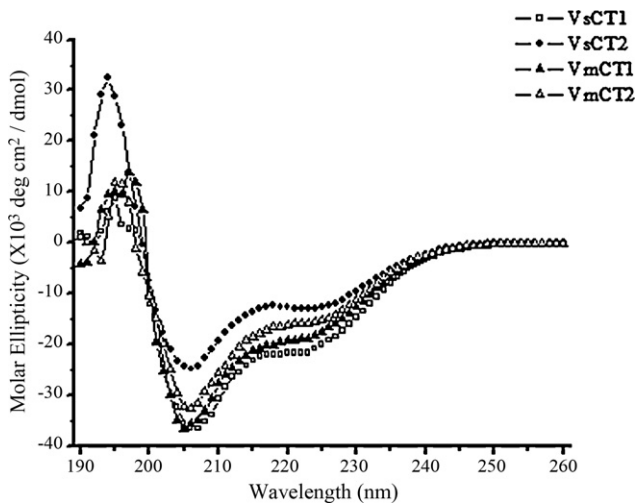
The circular dichroism spectra (CD) of the peptides were recorded in a Jasco J-710 spectropolarimeter (Jasco, Japan). Spectra were recorded from 260 to 190 nm, in 60% trifluoroethanol (TFE), pH 7.1, at room temperature, with a 1 mm length quartz cell. Data were collected every 0.1 nm at a 20 nm/min speed. The peptides were prepared by resuspending 80  $\mu$ g in 250  $\mu$ l of the TFE solution. All measurements were performed by triplicate. Data were averaged and analyzed by the method of Bohm et al. [2].

## 3. Results

### 3.1. cDNA sequences coding for peptide precursors

The genes coding for the peptide precursors of VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2 were cloned and sequenced from the cDNA libraries made from the venom glands of the Mexican scorpion species *Vaejovis mexicanus smithi* and *Vaejovis subcristatus*. The analysis of the DNA sequences and the Blastn and Blastx results suggest that these four genes code for peptide precursors with high sequence similarity to other non disulfide-bridged antimicrobial and cytotoxic peptides from the NDBP-5 family [22]. The cDNA sequences present a 5'-untranslated region (UTR), an open reading frame (ORF), and a 3'-UTR with a putative polyadenylation site (AATAAA) and a typical eukaryotic polyA tail. The amino acidic sequences translated from the ORFs were analyzed by SignalP and submitted to Blastp to be compared with all non-redundant peptide sequences from the GenBank. We found that the four cDNA sequences code for putative peptides constituted by 23 residues-long signal peptides, 13 residues-long mature peptides, and 32 residues-long propeptides for VmCT1, VsCT1 and VsCT2, or 33 residues-long propeptides for VmCT2 (Fig. 1A). The propeptide sequences start with a highly conserved posttranslational processing signal: Gly-Lys-Arg (GKR). When mature peptides are generated after the processing of this kind of propeptides, they usually have the carboxyl terminus amidated [5,23]. It is interesting to





**Fig. 2.** CD spectra of the synthetic peptides. Spectra of the four peptides VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2 dissolved in 60% TFE were recorded from 260 nm to 190 nm. All peptides show minima at 208 nm and 222 nm and a maximum at 191 nm, typical of  $\alpha$ -helix conformation.

note that, although the precursor sequences for VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2 share a 52.9–54.4% identity with the precursor of IsCT, the identity of the mature peptides is much lower, in the range of 15.4–46.2% (Fig. 1B). This might reflect constraints imposed to the precursor sequence by a common posttranslational processing machinery that removes the signal peptide and propeptide, while allowing diversity of sequence (and therefore functionality) to the mature peptide.

### 3.2. Chemical synthesis, mass spectrometry and CD spectra of the mature peptides

Mature amidated peptides VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2 without signal and propeptide sequences were synthesized. Following the chemical synthesis, the crude peptides were purified to homogeneity by RP-HPLC (data not shown) and their identity verified by mass spectrometry. Table 1 shows the physicochemical properties of these peptides.

The secondary structure spectra of all four synthetic peptides were observed by circular dichroism. Overall, they had distinctive negative ellipticities at 208 and 222 nm in 60% TFE, which are common in  $\alpha$ -helix structures (Fig. 2). A similar pattern has been observed with many other amphiphilic antimicrobial peptides [1,12,19].

The secondary structure analysis was performed using a neural network of 13 CD spectra of proteins. The results show the presence of  $\alpha$ -helix (70.0%, 43.5%, 66.1%, 57.9%),  $\beta$ -turns (12.0%, 15.4%, 12.6%, 13.6%), and random coil (13.7%, 26.3%, 15.3%, 18.9%) for VsCT1, VsCT2, VmCT1 and VmCT2, respectively.

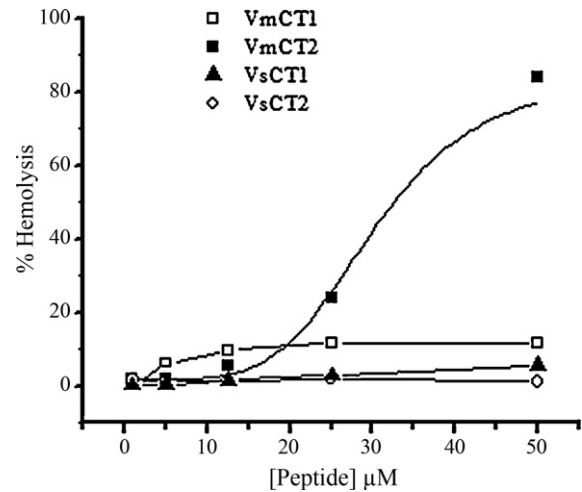
**Table 2**

Antibacterial activity of VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2. The minimal inhibitory concentrations (MIC) determined for each bacterial strain are shown.

Strain	Gram ( $\pm$ )	Minimal inhibitory concentration ( $\mu$ M)			
		VmCT1	VmCT2	VsCT1	VsCT2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	10	10	NA	NA
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	20	20	NA	NA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	–	25	20	NA	NA
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6399	–	5	10	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	–	10	10	NA	NA
<i>Streptococcus agalactiae</i> <sup>a</sup>	+	20	20	NA	NA

NA = no activity detected at up to 50  $\mu$ M concentration of the peptide.

<sup>a</sup> From a clinical isolate.



**Fig. 3.** Hemolytic activity of the synthetic peptides. The activity was evaluated by measuring the absorbance at 570 nm after the incubation of human erythrocytes with different peptide concentrations for 1 h at 37 °C. PBS and Triton X-100 were used as negative (0% lysis) and positive (100% lysis) controls, respectively.

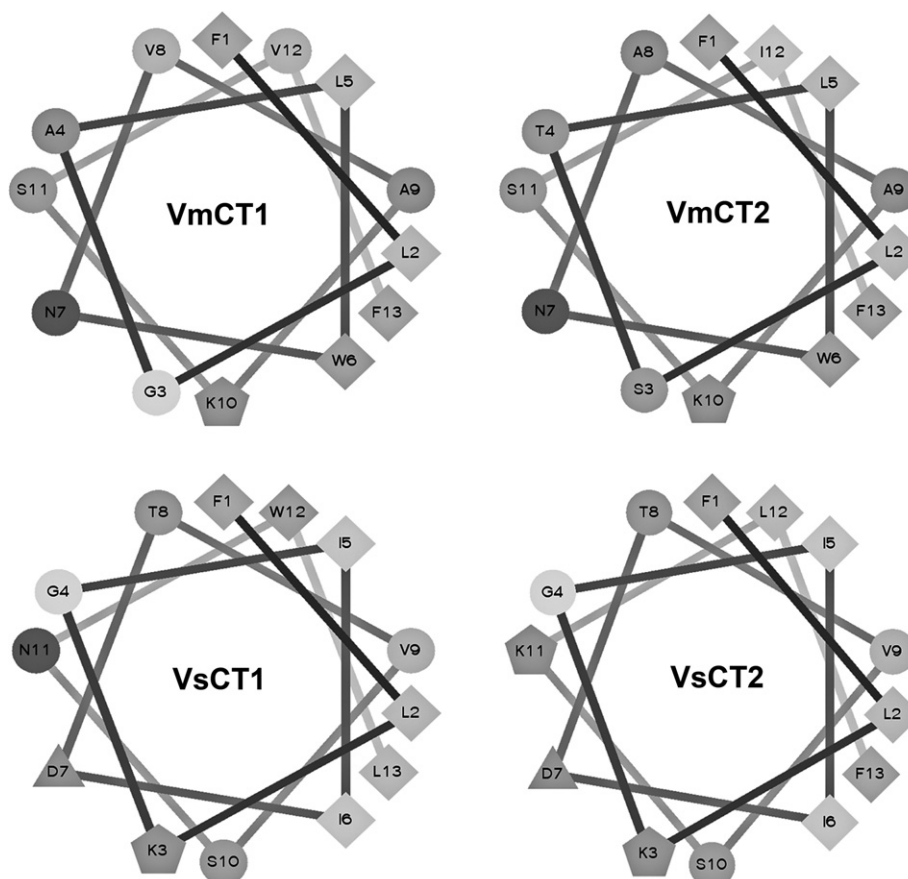
### 3.3. Antimicrobial and hemolysis activities

The antibacterial activity assays showed that only VmCT1 and VmCT2 displays activity at concentrations lower than 50  $\mu$ M (Table 2). VsCT1 and VsCT2 showed no activity even at 50  $\mu$ M (Table 2). VmCT1 and VmCT2 inhibited the growth of both Gram-negative and Gram-positive bacteria with similar MIC. For VmCT1 the MIC range was 5–25  $\mu$ M, and for VmCT2 it was narrower, in the range of 10–20  $\mu$ M for representative bacteria.

Peptides VsCT1 and VsCT2 showed a maximum of 6% and 2% hemolysis, respectively, which can be considered very low (Fig. 3). VmCT1 was only mildly hemolytic, with a maximum of 12% lysis even at the highest concentration tested (50  $\mu$ M). VmCT2 was mildly hemolytic at its MIC range, but showed a strong cytotoxic activity at higher concentrations, reaching 84% lysis at 50  $\mu$ M (Fig. 3).

## 4. Discussion

VmCT1 and VmCT2 from *Vaejovis mexicanus*, plus VsCT1 and VsCT2 from *Vaejovis subcristatus* represent the first NDBPs described from the Vaejovidae family of scorpions. They can be classified within the NDBP-5 subfamily of peptides [21]. The Vaejovidae family belongs to the Chactoidea superfamily, the only superfamily within the Lurida parvorder for which no NDBP-5 had been described to date. Our findings show that the NDBP-5 peptides are widely distributed among the Lurida parvorder. Other NDBP-5 peptides have been described from *M. martensii* Karsch, a scorpion belonging to the Buthida parvorder. No NDBP-5 peptides have been described for the remaining two parvorders, Chaerilida



**Fig. 4.** Helical wheel projections of the mature peptides. The amphipaticity of the peptides VmCT1, VmCT2, VsCT1 and VsCT2 is evidenced by the presence of hydrophilic and hydrophobic faces. Circles = polar, non charged; diamonds = non polar; triangles = acidic; pentagons = basic residues.

and Pseudochactida, but it is possible that this family of peptides could be ubiquitous in the Scorpiones order.

VsCT1 and VsCT2 showed no antibacterial activities at the concentrations tested. VmCT1 and VmCT2 were active on both Gram-negative and Gram-positive bacteria, with similar MICs, which points to a non-selective mechanism of action as has been proposed for several other cationic antimicrobial peptides [3,4,6–8,10,14,21].

The CD data of all four peptides indicate that they likely adopt an overall similar folding pattern. VsCT1 and VsCT2 had the most ordered and disordered structures among all four peptides. Since VsCT1 and VsCT2 were devoid of antimicrobial activity, the data suggest that the high content of either the  $\alpha$ -helix or the random coil structures is not directly correlated to the biological activity of all four peptides. Thus, the antimicrobial activity differences between VmCTs and VsCTs are supposed to be related to their amino acid differences.

It has been shown for IsCT that Trp<sup>6</sup> plays a critical role in keeping the adequate structure and activity of the membrane bound peptide. Substitution of Trp<sup>6</sup> for Ala<sup>6</sup> in an IsCT mutant resulted in a disordered structure with significantly lower antimicrobial and hemolytic activities as compared to the wild type IsCT [8]. It is very interesting that this is also the case for Hp1090 and its homolog Hp1035 from *Heterometrus petersii*. Hp1090 displays anti-Hepatitis C virus activity and has a Trp<sup>6</sup>, while Hp1035 is inactive against the virus and has a Gly<sup>6</sup> (Fig. 1B) [20]. Whereas the active peptides VmCT1 and VmCT2 conserve the Trp<sup>6</sup> residue, peptides VsCT1 and VsCT2 have an Ile at position 6, which might be a reason why they lack antimicrobial activity. The CD spectra for VsCT1 and VsCT2 show however that, at

least in solution, these peptides are still structured as  $\alpha$ -helices (Fig. 2).

Another difference between active VmCT1 and VmCT2 and inactive VsCT1 and VsCT2 resides at position 7. The first two have a neutral Asn, while the other two have a negatively charged Asp. Although IsCT also has a negatively charged Glu<sup>7</sup> residue while being active, it has been shown that the replacement of that acidic Glu<sup>7</sup> for a basic Lys<sup>7</sup> resulted in a two-fold increase in activity [8]. In the particular structural context of the *Vaejovis* peptides, the replacement of the neutral charge for a negative one in that position could result in more drastic differences in activity. There is one more pair of homologous peptides with and without the Asp<sup>7</sup>: Hge028 and Hge027, from *Hadrurus gertschi* (Fig. 1B) [15]. Unfortunately their activities have not been tested.

It is also worth mentioning that of all similar peptides showed in Fig. 1B that have been assayed for antibacterial activity, only the inactive VsCT1 and VsCT2 present a Lys<sup>3</sup>. It needs to be pointed out, however, that in the Schiffer and Edmundson's  $\alpha$ -helical wheel projection of the peptides, this Lys<sup>3</sup> faces toward the hydrophilic side of the amphipathic  $\alpha$ -helix (Fig. 4), so the amphipaticity of the helix is not disrupted by this charged amino acid. What is intriguing is that inactive VsCT1 and VsCT2 have Lys<sup>3</sup> followed by Gly<sup>4</sup>, whereas in active IsCT those same amino acids are present, but their order is reversed. Although its antibacterial activity was not reported, the antiviral peptide Hp1090 has a Lys<sup>3</sup> and is able to permeabilize phospholipid membranes [20], reinforcing the possible neutral role of Lys<sup>3</sup>.

VmCT1 and VmCT2 are very similar in sequence and antibacterial activity (Fig. 1B, Table 2), but they show very different hemolytic activities (Fig. 3). VmCT2 is mildly hemolytic at low (MIC

range) concentrations, and displays a strong activity against human erythrocytes at high concentrations, while VmCT1 is only mildly hemolytic even at the highest concentration tested. The most structurally significant difference in sequence between VmCT1 and VmCT2 is the change of Ala<sup>4</sup> in the former for Thr<sup>4</sup> in the later. This Thr<sup>4</sup> extends the hydrophilic face of the VmCT2  $\alpha$ -helix (Fig. 4), which could imply a stronger interaction with the membrane of the erythrocytes, and therefore, higher hemolytic activity. Nevertheless, since the hemolytic activity of both peptides is only mild at the MIC range, whereas their antibacterial activity is strong and broad, they constitute very valuable potential therapeutic tools.

VsCT1 and VsCT2 showed very low cytotoxic activities against human erythrocytes. Although these peptides displayed no significant growth inhibition with the assayed bacterial strains, they could also constitute valuable frameworks for the design of novel peptides with increased antimicrobial activity while keeping the hemolytic activity low.

It is clear that further analyses on modified synthetic peptides that could address the importance of the above-mentioned residues on the structure and activity of the antimicrobial peptides from the Vaejovidae family are required.

## 5. Conclusion

The venom produced by the different scorpion species is a rich source of biologically active peptides. The universe of sequences and activities is mind-defying. Some peptides are large and complex, but other small peptides offer the possibility of a more detailed and straightforward analysis of their structure, activity and evolution. We have found four novel transcripts from the venom glands of scorpions belonging to the family Vaejovidae. They are assumed to code for antimicrobial-like peptides, which show distinctive amino acid sequences and different biological activities, under our experimental conditions. They expand the universe of small antimicrobial peptides described to date and contribute to the understanding of the structure–function relationships that govern their activity; this could lead to the design of more effective therapeutic tools.

## Acknowledgments

This work was supported by grants DGAPA-UNAM IN204110 awarded to LDP and Silanes P156 awarded to BB. SRC and JMJV were supported by fellowships from CONACyT, 253995 and 165230, respectively. We thank M.Sc. Timoteo Olamendi for DNA sequencing and Dr. Fernando Zamudio for mass spectrometry determinations. We are in debt with M.Sc. Francia García for providing the bacterial strains used in this work.

## References

- [1] Batista CVF, Rosendo da Silva L, Sebben A, Scaloni A, Ferrara L, Paiva GR, et al. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides* 1999;20:679–86.
- [2] Bohm G, Muhr R, Jaenicke R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 1992;5:191–5.
- [3] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238–50.
- [4] Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 2001;359:35–45.
- [5] Dai L, Corzo G, Naoki H, Andriantsiferana M, Nakajima T. Purification, structure–function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1514–22.
- [6] Dai L, Yasuda A, Naoki H, Corzo G, Andriantsiferana M, Nakajima T. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:820–5.
- [7] Hale, Hancock. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5:951–9.
- [8] Lee K, Shin SY, Kim K, Lim SS, Hahn KS, Kim Y. Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:712–9.
- [9] Lewis RJ, García ML. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:790–802.
- [10] Lim SS, Kim Y, Park Y, Kim JI, Park IS, Hahn KS, et al. The role of the central L- or D-Pro residue on structure and mode of action of a cell-selective  $\alpha$ -helical IsCT-derived antimicrobial peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334:1329–35.
- [11] Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur J Biochem* 2002;268:1–12.
- [12] Mor A, Nguyen VH, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* 1991;30:8824–30.
- [13] Rodríguez A, Villegas E, Satake H, Possani LD, Corzo G. Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improve its therapeutic index. *Amino Acids* 2011;40:61–8.
- [14] Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup> channels. *Toxicon* 2004;43:865–75.
- [15] Schwartz EF, Diego-García E, Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics* 2007;8:119–25.
- [16] Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem* 2000;267:5023–31.
- [17] Tytgat J, Chandry KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:444–7.
- [18] Ulvatne H. Antimicrobial peptides: potential use in skin infections. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:591–5.
- [19] Wong H, Bowie JH, Carver JA. The solution structure and activity of caerin 1.1 an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog. *Eur J Biochem* 1997;247:545–57.
- [20] Yan R, Zhao Z, He Y, Wu L, Cai D, Hong W, et al. A new natural  $\alpha$ -helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. *Peptides* 2011;32:11–9.
- [21] Zeng XC, Corzo G, Hahn R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life* 2005;57:13–21.
- [22] Zeng XC, Li WX, Wang SX, Zhu SY, Luo F. Precursor of a novel scorpion venom peptide (BmKn1) with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB Life* 2001;51:117–20.
- [23] Zeng XC, Wang S, Nie Y, Zhang L, Luo X. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. *Peptides* 2012;33:44–51.
- [24] Zeng XC, Wang SX, Zhu Y, Zhu SY, Li WX. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 2004;25:143–50.