



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE UN COMPONENTE ANALGÉSICO OBTENIDO A
PARTIR DE LA SECRECIÓN DE PIEL DEL ANFIBIO *Trachycephalus typhonius*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. FRANCIA GARCÍA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Gerardo A. Corzo Burguete
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosa María Uribe Villegas
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
Dr. José Estuardo López Vera
[Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2018



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.

LA PRESENTE TESIS FUE REALIZADA EN

El Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, bajo la asesoría del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete.

AGRADECEMOS EL APOYO ECONÓMICO DE

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-UNAM) por el donativo IN204415.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, SEP (CONACyT-SEP) por el donativo 240616 y por la beca de doctorado 324871 otorgada a la M. en C. Francia García García.

El Programa de Estímulos a la Innovación-CONACyT por el donativo 221111.

El Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el donativo para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

Agradecimientos

Muy especialmente a mi asesor el Dr. Gerardo A. Corzo Burguete quien logró guiarme para finalizar este proyecto con sus críticas y análisis, sin olvidar el aspecto personal que siempre mantuvo como papá académico.

Por el apoyo técnico de la M. en Biotec. Herlinda Catalina Clement Carretero, Dra. Ligia Luz Corrales García y Dr. Ernesto Ortiz Suri en los experimentos de biología molecular. Al Dr. Fernando Zamudio Zúñiga, M. en B. Timoteo C. Olamendi Portugal y M. en C. Emmanuel Ríos por la determinación de masas moleculares y secuenciación. A la Dra. Rita Restano Casulini por su apoyo en la parte de electrofisiología con los experimentos de *Patch clamp* y al grupo del Dr. Enrique Soto Eguibar por su colaboración con los experimentos cultivo primario e imagen de calcio.

A mi Comité Tutor Dra. Rosa María Uribe Villegas y Dr. José Estuardo López Vera por la paciencia durante mis tutorales y las críticas realizadas a lo largo del doctorado.

A mi Jurado Evaluador Dra. Marcela Ayala Aceves, Dra. María Martha Pedraza Escalona, Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, Dr. Ramón Garduño Juárez y Dr. Humberto Lanz Mendoza por sus valiosas aportaciones en esta tesis.

Agradezco el apoyo logístico en el laboratorio brindado por María del Carmen Martínez Segura, Ricardo Mondragón y Manuela Ávila, así como el apoyo administrativo de la Unidad de Docencia proporcionados por Antonio Guillén y Gloria Villa.

Finalmente, agradezco a la Unidad de Cómputo por el apoyo técnico brindado semana tras semana a M. en C.C.T. Arturo Ocádiz, Ing. Roberto Pablo Rodríguez, M. en T.I. Juan Manuel Hurtado y MEM David Santiago Castañeda.

Agradecimientos Personales

De manera muy especial agradezco a mis padres Enriqueta y Rafael quienes me apoyaron a lo largo de este proyecto, al igual que mis hermanas Roma y Grecia quienes nunca dudaron que lo lograría. Un millón de gracias por no abandonarme a pesar de las circunstancias.

A las amistades que me han acompañado durante años en innumerables aventuras Lilu, Lili, Damaris, Arely, Mafé, Dr. Iván, Chuy, Marco, Germán, Félix, Ángel, Óscar, Fernando, Checo, Nico, Nachito, Miguel (el “señor cultedad”) y mi inseparable amiga Pilar, enfatizando el apoyo de quienes me tuvieron cerca por más de una década Dr. Corzo y Herli ¡Mil Gracias a Todos!

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. GENERALIDADES SOBRE EL DOLOR	12
1.2. NOCICEPTORES	13
1.3. NEUROFISIOLOGÍA DEL DOLOR	14
1.3.1. <i>Transducción</i>	16
1.3.2. <i>Transmisión</i>	17
1.3.3. <i>Modulación</i>	17
1.4. EPIDEMIOLOGÍA DEL DOLOR	19
1.5. ANALGÉSICOS EN LA TERAPIA PARA EL DOLOR	19
1.5.1. <i>Analgésicos opioides</i>	20
1.5.2. <i>Analgésicos no opioides</i>	20
1.6. PÉPTIDOS EMERGENTES CON ACTIVIDAD ANALGÉSICA PROVENIENTES DE ANIMALES.....	21
1.6.1. <i>El descubrimiento del Prialt®</i>	22
2. ANTECEDENTES	24
2.1. SECRECIONES DE PIEL DE ANFIBIOS COMO FUENTE DE BIOMOLÉCULAS	24
2.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS IDENTIFICADOS EN ANFIBIOS	25
2.2.1. <i>Péptidos opioides secretados por anfibios</i>	27
2.2.2. <i>Péptidos no opioides secretados por anfibios</i>	29
2.3. SECRECIONES DE PIEL DE <i>TRACHYCEPHALUS TYPHONIUS</i>	29
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32
5.1. GENERAL	32
5.2. PARTICULARES	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1. CASAS COMERCIALES DE REACTIVOS.....	33
6.2. COLECTA DE ANFIBIOS Y MANUTENCIÓN EN TERRARIOS	33
6.2.1. <i>Obtención de secreciones de piel</i>	34
6.2.1.1. Estimulación para la salamandra <i>Pseudoeurycea cephalica</i>	34
6.2.1.2. Estimulación para la cecilia <i>Dermophis mexicanus</i>	34

6.2.1.3.	Estimulación para la rana <i>Trachycephalus typhonius</i>	34
6.3.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	34
6.3.1.	<i>Cuantificación por espectrofotometría utilizando λ de 280 nm</i>	34
6.3.2.	<i>Cuantificación espectrofotométrica por el método colorimétrico de Pierce</i>	35
6.4.	ANÁLISIS BIOQUÍMICOS Y ESTRUCTURALES.....	35
6.4.1.	<i>Cromatografía líquida de alta presión de fase reversa</i>	35
6.4.2.	<i>Espectrometría de masas y secuenciación</i>	36
6.4.3.	<i>Reducción y alquilación</i>	36
6.4.4.	<i>Resolución de la estructura primaria por digestión proteolítica</i>	36
6.4.5.	<i>Determinación del patrón de enlaces disulfuro</i>	37
6.4.6.	<i>Dicroísmo circular</i>	37
6.4.7.	<i>Análisis de secuencia y modelado por homología</i>	37
6.5.	SISTEMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS	38
6.5.1.	<i>Síntesis química</i>	38
6.5.2.	<i>Expresión heteróloga en bacteria</i>	38
6.5.2.1.	Diseño y amplificación del gen sintético	38
6.5.2.2.	Clonación en el vector de expresión pQE-30	39
6.5.2.3.	Inducción de la expresión de proteínas recombinantes	39
6.5.2.4.	Purificación por cromatografía de afinidad a níquel	40
6.6.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	41
6.6.1.	<i>Inhibición de tripsina</i>	41
6.6.2.	<i>Evaluación de analgesia mediante ensayo Hot Plate</i>	41
6.6.3.	<i>Pruebas de electrofisiología por Patch clamp</i>	42
6.6.4.	<i>Cultivo primario de neuronas GRD</i>	43
6.6.5.	<i>Registro de transitorios de calcio por fluorescencia (imagen de calcio)</i>	44
7.	RESULTADOS	45
7.1.	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN PÉPTIDO BIOACTIVO	45
7.1.1.	<i>Colecta de los anfibios</i>	45
7.1.2.	<i>Cuantificación de componentes de secreción de piel</i>	46
7.1.3.	<i>Separación de los componentes de secreción por rpHPLC</i>	47
7.1.4.	<i>Identificación de péptidos con actividad analgésica</i>	49
7.1.5.	<i>Elucidación de la estructura primaria de F7</i>	50
7.1.6.	<i>Análisis de motivos conservados</i>	51
7.1.7.	<i>Modelado por homología</i>	53
7.2.	SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE Tt7 POR SÍNTESIS QUÍMICA Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA	54
7.2.1.	<i>Producción de Tt7 por síntesis química</i>	54
7.2.2.	<i>Expresión heteróloga de Tt7</i>	55

7.2.2.1.	Caracterización estructural de HisrTt7	57
7.3.	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> Tt7 Y HISRTT7	58
7.3.1.	<i>Ensayo de inhibición de actividad enzimática de tripsina</i>	58
7.3.2.	<i>Evaluación por Hot Plate de Tt7, HisrTt7 y rTt7</i>	59
7.3.3.	<i>Ensayos por Patch clamp de Tt7 y HisrTt7 en canales asociados a dolor</i>	60
7.3.4.	<i>Ensayos de fluorescencia por imagenología de calcio en neuronas GRD</i>	61
7.3.5.	<i>Modelo de nociceptores relacionados con Tt7</i>	62
8.	DISCUSIÓN	64
9.	CONCLUSIONES	68
10.	PERSPECTIVAS	69
11.	REFERENCIAS	70
12.	ANEXOS. PROTOCOLOS, FIGURAS COMPLEMENTARIAS Y PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.	76
12.1.	SOLUCIONES Y BUFFERS GENERALES	76
12.2.	SOLUCIONES PARA ESTIMULAR Y COLECTAR LAS SECRECIONES DE PIEL	76
12.3.	REACTIVOS PARA CUANTIFICACIÓN POR BCA	76
12.4.	BUFFERS PARA CROMATOGRAFÍA RPHPLC	76
12.5.	SOLUCIONES PARA REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN	77
12.6.	REACTIVOS PARA PLEGAMIENTO	77
12.7.	ENSAMBLE DEL GEN SINTÉTICO	77
12.8.	DEFOSFORILACIÓN DE VECTOR	78
12.9.	REACCIONES PARA LIGACIÓN	78
12.10.	MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES PARA MEDIOS	78
12.11.	PCR DE COLONIA	79
12.12.	PROCESO PARA DIGESTIÓN	79
12.13.	SOLUCIONES Y PREPARACIÓN DE GELES SDS-PAGE AL 15 %	80
12.14.	SOLUCIONES PARA LA PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A NÍQUEL (NI-NTA)	81
12.15.	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y PROCEDIMIENTO PARA <i>WESTERN BLOT</i>	82
12.16.	SOLUCIONES PARA ENSAYO DE INHIBICIÓN DE TRIPSINA	83
12.17.	SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANALGÉSICA POR <i>HOT PLATE</i>	83
12.18.	MEDIOS PARA REGISTROS POR <i>PATCH CLAMP</i>	83
12.19.	MEDIOS Y SOLUCIONES PARA CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS GRD	84
12.20.	MEDIOS Y SOLUCIONES PARA IMAGENOLOGÍA DE CALCIO	84
12.21.	ESPECTROS DE MASAS MOLECULARES DE Tt7, sTt7 Y HISRTT7	85
12.22.	PUBLICACIÓN EN REVISTA INDEXADA	86
12.23.	TESIS DE LICENCIATURA DIRIGIDA	96
12.24.	SOLICITUD DE PATENTE DE Tt7	97
12.25.	CARTELES PRESENTADOS EN CONGRESOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. NEUROTRANSMISORES LIBERADOS DURANTE UN DAÑO TISULAR.	14
FIGURA 2. CANALES IÓNICOS EN LOS NOCICEPTORES TIPO C PEPTIDÉRGICOS.....	15
FIGURA 3. NEUROFISIOLOGÍA GENERAL DEL DOLOR	18
FIGURA 4. TOXINAS DE ANIMALES Y SUS BLANCOS DE ACCIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS	22
FIGURA 5. FILOGENIA DE LA SUPERFAMILIA HYLOIDEA	30
FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN EN MÉXICO DE LOS ANFIBIOS <i>TRACHYCEPHALUS TYPHONIUS</i> , <i>PSEUDOEURECEA CEPHALICA</i> Y <i>DERMOPHIS MEXICANUM</i>	45
FIGURA 7. SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE SECRECIÓN DE <i>T. TYPHONIUS</i>	47
FIGURA 8. SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE SECRECIÓN DE <i>D. MEXICANUM</i>	48
FIGURA 9. ENSAYO DE ANALGESIA POR HOT PLATE DE FRACCIONES OBTENIDAS DE LA SECRECIÓN DE PIEL DE <i>T. TYPHONIUS</i>	50
FIGURA 10. CROMATOGRAMAS DE F7 REDUCIDA Y ALQUILADA Y FRAGMENTOS OBTENIDOS POR PROTEÓLISIS DE F7 CON ASP-N	51
FIGURA 11. ALINEAMIENTO DE Tt7 CON SECUENCIAS RELACIONADAS EN ESTRUCTURA (SCOPE) Y FUNCIÓN (PFAM).....	52
FIGURA 12. MODELADO POR HOMOLOGÍA DE Tt7 Y ESTRUCTURAS POR RMN DE ANTOXINA Y LMKTT-1A.	53
FIGURA 13. PURIFICACIÓN POR RPHPLC DE Tt7 NATIVO, SINTÉTICO Y ENSAYO DE COELUSIÓN	54
FIGURA 14. EXPRESIÓN DE Tt7 EVALUADA POR SDS-PAGE 15%	55
FIGURA 15. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE HISRTt7	56
FIGURA 16. ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE Tt7 Y HISRTt7	57
FIGURA 17. EMPALME DE CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR DIGESTIÓN PROTEOLÍTICA DE HISRTt7.....	58
FIGURA 18. MECANISMO DE REACCIÓN TRIPSINA FRENTE A BAPNA	58
FIGURA 19. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE TRIPSINA PARA Tt7 Y HISRTt7.....	59
FIGURA 20. ENSAYO DE ANALGESIA POR HOT PLATE DE Tt7, rTt7 Y HISRTt7	60
FIGURA 21. ENSAYO POR PATCH CLAMP DE Tt7 Y HISRTt7 EN CHO-hNA _v 1.7	61
FIGURA 22. ENSAYO FLUORIMÉTRICO POR IMAGEN DE CALCIO DE Tt7 SOBRE NEURONAS GRD	62
FIGURA 23. POSIBLES NOCICEPTORES IMPLICADOS CON LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DE Tt7	63



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS FIBRAS SENSITIVAS CUTÁNEAS Y PROPORCIÓN RELATIVA DE CADA UNA.....	13
TABLA 2. PRINCIPALES NOCICEPTORES Y ALGUNOS DE SUS BLOQUEADORES	16
TABLA 3. AFINIDAD DE DERMORFINAS Y DELTORFINAS HACIA LOS RECEPTORES OPIOIDES μ , δ Y κ , ASÍ COMO SU POTENCIA ANALGÉSICA EN RATA VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR O SUBCUTÁNEA.....	28
TABLA 4. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA EN SECRECIONES DE PIEL DE ANFIBIOS.	46
TABLA 5. DETERMINACIÓN DE MASAS MOLECULARES Y SECUENCIAS N-TERMINAL DE COMPONENTES SECRETADOS POR LA PIEL DE <i>T.</i> <i>TYPHONIUS</i>	48
TABLA 6. SECUENCIA Y MASA MOLECULAR DE FRAGMENTOS DE HIDRÓLISIS DE Tt7 (F7).....	51
TABLA 7. ALINEAMIENTO DE SECUENCIA Tt7 CON ANTOXINAS. SE INDICA EL SITIO DE INTERACCIÓN DE TRIPSINA EN CADA UNA ...	52
TABLA 8. COMPARACIÓN DE RENDIMIENTO DE PURIFICACIÓN Y PLEGAMIENTO DE sTt7.....	54
TABLA 9. COMPARACIÓN DE RENDIMIENTO DE LOS PÉPTIDOS RECOMBINANTES HISRTt7 Y RTt7.....	56

RESUMEN

Estudios recientes consideran que alrededor del 20% de la población mundial sufre dolor crónico causado por osteoartritis, cáncer, enfermedades cardiacas o diabetes. El tratamiento típico para este tipo de dolor incluye analgésicos periféricos no opioides, pero si el dolor persiste es necesario utilizar analgésicos de tipo opioide. En ambos casos se ha demostrado la ocurrencia de efectos secundarios severos como alteraciones cardiacas, en el caso de analgésicos periféricos, y tolerancia o dependencia, con el uso de opioides. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos fármacos con propiedades analgésicas, pero con efectos secundarios menores respecto a los fármacos que existen en el mercado.

Un ejemplo exitoso de este tipo de componente es el PRIALT, obtenido de veneno de un caracol marino, cuya potencia analgésica es mayor respecto a la morfina, pero con efectos colaterales menores. A la fecha, varios componentes de venenos o secreciones de animales con propiedades analgésicas han sido caracterizados, los cuales funcionan mediante el bloqueo de nociceptores (receptores encargados de transmitir la señal de dolor), como: canales de calcio activados por voltaje de tipo N, canales de sodio activados por voltaje, receptores de potencial transitorio (TRP), canales iónicos sensibles a ácido (ASIC), canales purinérgicos, entre otros.

Entre los componentes analgésicos identificados más recientemente se encuentran algunos péptidos obtenidos de la secreción de piel de la rana *Hyla annectans*, conocidos como antoxinas. Además, otros estudios reportan la presencia de moléculas con principios bioactivos de tipo analgésico a partir de varios anfibios, por ello este trabajo tuvo como finalidad la búsqueda de péptidos con potencial antinociceptivo, aislados de la secreción de piel de anfibios mexicanos (salamandras, cecilias y ranas).

En este estudio se logró aislar un péptido a partir de la rana *Trachycephalus typhonius* con actividad analgésica frente a un estímulo térmico (método *Hot Plate*). El péptido denominado Tt7 presentó 59 residuos incluidas cuatro cisteínas y se le determinó una estructura tipo Kunitz (una hoja beta-antiparalela y un alfa-hélice en el extremo amino terminal). La caracterización bioquímica de Tt7 nos permitió desarrollar un método para su producción de manera recombinante, obteniendo el péptido HisrTt7, con el cual logramos asignar el siguiente patrón de enlaces disulfuro: Cys1-Cys4 y Cys2-Cys3.

Por otro lado, los experimentos de imagen de calcio realizados en ganglio de raíz dorsal de rata (aplicando como estímulo una solución a pH ácido), lograron asignar a Tt7 como un posible bloqueador de canales ASIC. Sin embargo, faltaría determinar si Tt7 tiene otros blancos moleculares (nociceptores), que se activen con estímulos de tipo térmico, como algunos de los miembros de la familia TRP.



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.

ABSTRACT

Recent studies consider that around 20% of the world population suffers chronic pain caused by osteoarthritis, cancer, heart disease or diabetes. Typical pain treatment includes peripheral non-opioid analgesics, but if the pain persists it is necessary to use opioid analgesics. In both cases, the occurrence of severe side effects such as cardiac alterations (in the case of peripheral analgesics), and tolerance or dependence (with the use of opioids) has been demonstrated. This has led to the search for new drugs with analgesic properties, but with minor side effects compared to commercial drugs.

A successful example of this type of component is PRIALT, whose analgesic potency is greater than morphine, but with minor side effects. To date, several analgesic components from venoms or animal secretions have been characterized, which work by blocking nociceptors (receptors responsible for transmitting the pain signal), such as: N-type voltage-gated calcium channels, voltage-gated sodium channels, transient receptor potential channels (TRP), acid-sensing ion channels (ASIC), ATP-gated cation channels, among others.

Among the most recently identified analgesic components are peptides obtained from the skin secretion of *Hyla annectans* frog, known as antoxins. In addition, other studies report the presence of molecules with analgesic activity from several amphibians, so this work was aimed at the search for antinociceptive peptides, isolated from the skin secretion of Mexican amphibians (salamanders, caecilians and frogs).

In this study, it was possible to isolate a peptide from *Trachycephalus typhonius* frog with analgesic activity against a thermal stimulus (Hot Plate test). The peptide called Tt7 presented 59 residues including four cysteines, and a Kunitz type structure (an antiparallel beta-strand, and an alpha-helix at the amino terminal) was determined. The biochemical characterization of Tt7 allowed us to develop a method for its recombinant production, obtaining the HisrTt7 peptide, and we were able to assign the following pattern of disulfide bonds: Cys1-Cys4 and Cys2-Cys3.

On the other hand, calcium imaging experiments performed on dorsal root ganglia of rat (applying an acid solution as a stimulus), were able to assign Tt7 as a possible blocker of ASIC channels. However, it would be necessary to determine if Tt7 has other molecular targets (nociceptors), which are activated with thermal stimuli, such as some of the members of the TRP family.

1. Introducción

1.1. Generalidades sobre el dolor

El dolor es un mecanismo de protección que se manifiesta cuando un tejido se lesiona¹, y de acuerdo a su escala temporal se puede dividir en dolor rápido-agudo y dolor lento-crónico, aunque existen otras diferencias que a continuación se describen.

El dolor rápido es la consecuencia inmediata ocurrida por la activación de los nociceptores mediante estímulos químicos, mecánicos o térmicos, el cual es capaz de percibirse en ~0.1 segundos y se puede describir como dolor intenso o punzante, es decir tiene una función de protección biológica¹⁻³. Los síntomas psicológicos son escasos y limitados a una ansiedad leve¹. La manera terapéutica de controlarlo es mediante el tratamiento con analgésicos no opioides como paracetamol o medicamentos antiinflamatorios no esteroides, entre otros. Sin embargo, existen algunas limitantes con el uso de estos medicamentos, ya que dependiendo del individuo y de la concentración administrada pueden causar efectos secundarios como náuseas, sangrado estomacal o problemas renales⁴.

En contraste, el dolor lento es persistente y tarda en aparecer un segundo o más, no posee una función protectora y suele estar acompañado por la destrucción de tejidos, más que un síntoma se considera como una enfermedad¹. Suele ser refractario a los tratamientos y se asocia con importantes síntomas psicológicos. De manera convencional se utilizan los analgésicos opioides (morfina, metadona, etc.) para el tratamiento de este tipo de dolor¹, siendo la morfina el opioide empleado por excelencia⁵. Asimismo, su uso como medicamento se ve limitado por los efectos secundarios tan marcados que se manifiestan como la inhibición de la movilidad gastrointestinal, depresión respiratoria, tolerancia y dependencia física⁶⁻⁸.

De acuerdo a su localización el dolor se define como somático o visceral. El somático es el resultado de la activación de nociceptores localizados en piel, músculos, articulaciones, ligamentos o huesos, se percibe como un estímulo bien localizado circunscrito a la zona dañada y caracterizado por sensaciones claras y precisas⁹. Por otro lado, el visceral procede de las vísceras huecas o parenquimatosas, manifestándose como un dolor vago, mal localizado y que se extiende más allá de los órganos lesionados, está acompañado por respuestas reflejas motoras y autónomas¹⁰.

En función de los mecanismos fisiopatológicos que ocurren el dolor puede clasificarse como nociceptivo o neuropático. Siendo el primer caso la consecuencia de lesiones somáticas o viscerales, activando el sistema neurofisiológico constituido por nociceptores periféricos (terminaciones nerviosas sensoriales con receptores que se activan frente a estímulos nocivos), vías centrales de la sensación dolorosa y corteza cerebral; mientras que en el segundo caso se altera la transmisión de la información nociceptiva como resultado de una lesión o enfermedad del sistema nervioso periférico o central¹.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1.2. Nociceptores

Los nociceptores se expresan en las terminaciones periféricas de neuronas bipolares, (las cuales presentan su cuerpo neuronal en el ganglio raquídeo de la raíz dorsal), y al activarse envían la señal hasta sistema nervioso central. Este tipo de fibras nerviosas se agrupan en función de su tamaño y de la velocidad de conducción del estímulo, siendo las de tipo C más pequeñas en diámetro y más lentas, a diferencia de las fibras A β y A δ que además de tener mayor diámetro, están recubiertas con vainas de mielina favoreciendo la conducción saltatoria y por ende la velocidad de propagación del estímulo **Tabla 1**^{11,12}. Ambas fibras se expresan en piel y tejidos somáticos profundos, aunque a nivel visceral predominan las fibras de tipo C¹.

*Tabla 1. Clasificación de las fibras sensitivas cutáneas y proporción relativa de cada una*¹².

Tipo de fibra	Diámetro (μm)	Mielinización	Velocidad de conducción (m/seg)	Porcentaje
A β	>10	Gruesa	30-100	20
A δ	2-6	Fina	12-30	10
C	0.4-1.2	Ausente	0.5-2	70

En general las fibras C se consideran polimodales porque son sensibles a estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Por otro lado, los nociceptores A δ pueden ser de tipo I y II, siendo los primeros aquellos que reconocen estímulos mecánicos y en ciertas circunstancias estímulos térmicos o químicos; a diferencia del tipo II que responden a estímulos térmicos y son insensibles a estímulos mecánicos¹².

El dolor integra la función de las fibras nociceptoras para optimizar su efecto homeostático en los tejidos, por péptido relacionado al gen de la calcitonina (o nervio motor) son aquellos que envían señales aferentes a la asta dorsal, además de tener una función eferente. Estas fibras liberan de forma antidrómica sustancia P y péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) liberados en el sitio del daño tisular. Ambos neurotransmisores al ser liberados provocan vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y liberación de mediadores locales como mastocitos y otras células; tal respuesta es referida como inflamación neurogénica, **Figura 1**^{13,14}.

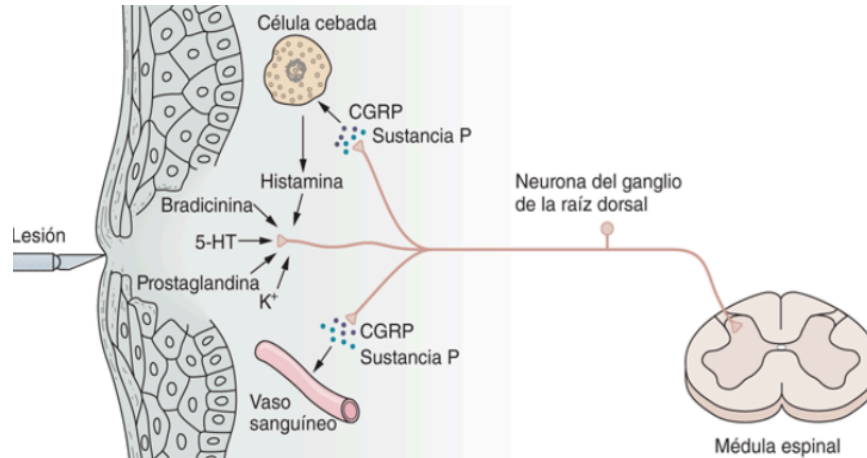


Figura 1. Neurotransmisores liberados durante un daño tisular. Tomado de Barrett et al., 2010¹⁵.

Las neuronas sensoriales utilizan varios receptores, transmisores y moduladores para generar diversas respuestas en función de cada estímulo. Los canales iónicos transductores y transmisores de potenciales de acción son fundamentales en la señalización del dolor. Por ejemplo, los receptores de potencial transitorio (TRP) de la superfamilia de los canales iónicos y los canales de potasio de dos poros (TREK), son activados por estímulos como el calor, frío, protones, lípidos, fosforilación, alteración de osmolaridades y presión. Otros receptores importantes son los canales de sodio activados por voltaje, siendo los subtipos $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$, expresados a nivel periférico, los encargados de generar una señal de dolor;¹³ sin embargo, estudios recientes sugieren al subtipo $Na_v1.1$ como un canal importante para la transmisión de estímulos nocivos¹⁶. Asimismo, los canales sensibles a ácido (ASIC), los purinérgicos activados por ATP (P2X), los de calcio tipo-N (Ca_v-N), entre otros, también están involucrados en las respuestas nociceptivas, **Figura 2**¹⁴. Cada uno de ellos, así como sus variantes se activan por diferentes estímulos y se inactivan con antagonistas específicos, como lo indica la **Tabla 2**.

1.3. Neurofisiología del dolor

Los diferentes niveles de integración que están involucrados en la percepción del dolor inician con la transducción del estímulo nocivo a potenciales de acción, lo cual ocurre a nivel de receptores especializados llamados nociceptores. Posteriormente, el potencial de acción se propaga para transmitir la señal dolorosa por la vía ascendente del sistema nervioso periférico y central, siendo este último el que se encargará de modular o atenuar la señal nociva (o nociceptiva). Finalmente, la conjunción de todos estos procesos con la experiencia emocional de cada persona se percibe como dolor.

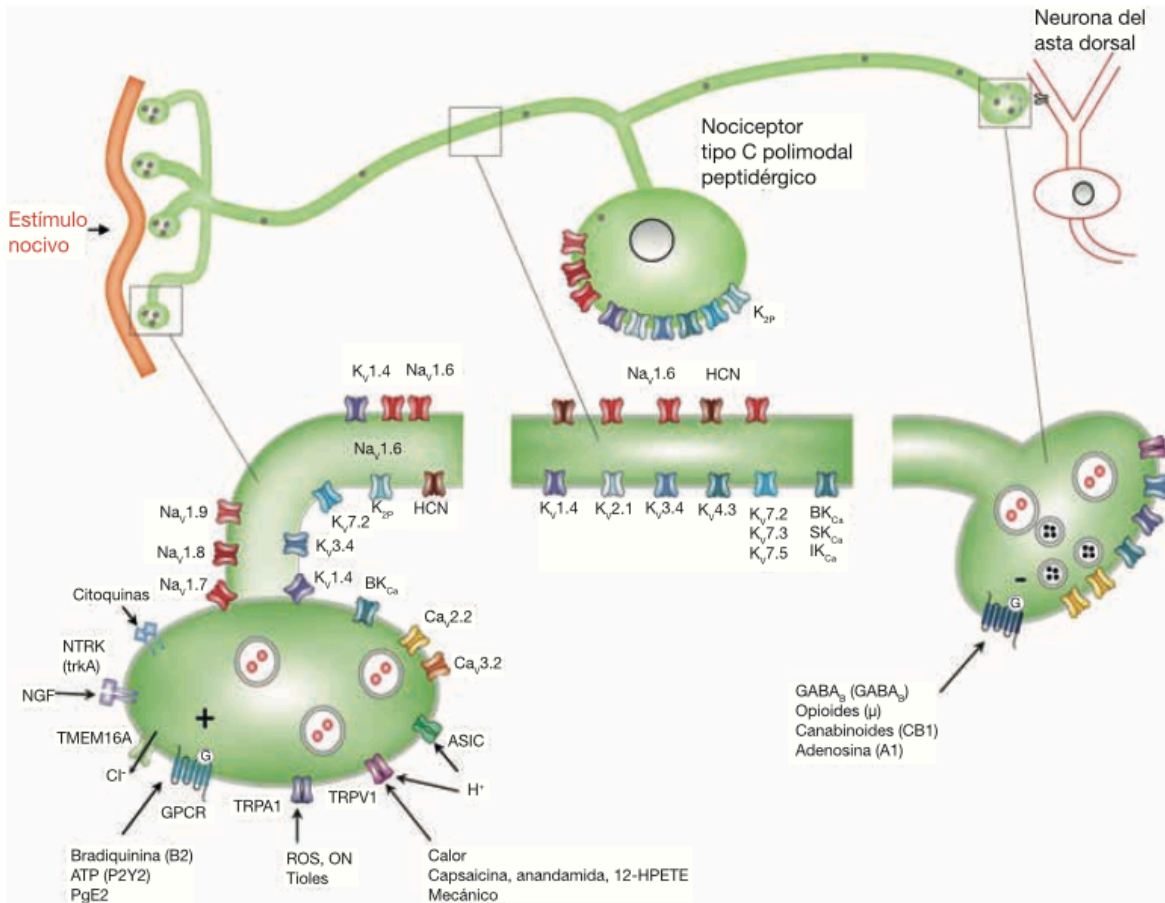


Figura 2. "Canales iónicos en los nociceptores tipo C peptidérgicos. Los nociceptores, particularmente las fibras C, son altamente heterogéneos. Una población peptidérgica de nociceptores C expresan sustancia P y CGRP, además de L-glutamato, que es el neurotransmisor primario. Otros marcadores de los nociceptores C peptidérgicos son el receptor de la tirosina cinasa A (trkA) para el factor de crecimiento del nervio (NGF) y el potencial transitorio del receptor (TRP) de canales vaniloide tipo 1 (TRPV1) y anquirina 1 (TRPA1). Los nociceptores también expresan un repertorio único de canales de potasio (K^+), incluyendo voltajes dependientes (K_v), activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) y canales con dos dominios de poros (K_{2p}); canales catiónicos sensibles a ácido (ASIC); canales activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN); y canales de cloro (Cl^-) activados por calcio (Ca^{2+}) de la familia de la proteína transmembrana 16 (TMEM16). La actividad de estos canales está regulada por productos de la inflamación, incluyendo protones (H^+), prostaglandina E2 (PgE2), adenosin trifosfato (ATP) y bradicinina, actuando a través de sus respectivos receptores acoplados a proteína G (GPCR) a través de vías desencadenadas por G_q o G_s . Como también citosinas, NGF, especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico y ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico (12-HPETE) también sensibilizan directamente los canales TRPV1 y TRPA1. La liberación de neurotransmisor a nivel del asta dorsal está regulada de forma negativa por varias señales actuando a través de receptores acoplados a $G_{i/o}$, incluyendo ácido g-aminobutírico (GABA), opioides, canabinoides (receptores CB1) y adenosina (receptores A1)". Tomado de Bernaroch, 2015¹⁴.

Tabla 2. Principales nociceptores y algunos de sus bloqueadores. Se indica la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) con cada bloqueador.

Canal	Estímulos activadores	Bloqueadores	IC ₅₀ de bloqueadores	Ref
ASIC 3	Ácido	Amilorida (ASIC humano)	16 μM (pH 4)	17, 18
		Mecánico	Amilorida (ASIC rata)	
	Mecánico	Aspirina/Diclofenaco	~92 μM (corr. sostenida)	17, 19
		APETx2	~0.063 μM	
ASIC2b+3	Ácido	APETx2	~0.117 μM (ác. salicílico y diclofenaco)	17
ASIC1b+3	Ácido	Amilorida	112 μM	17
	Mecánico	APETx2	~0.9 μM	
ASIC1a+3	Ácido	APETx2	~2 μM	17, 20
	Mecánico			
ASIC1a+2a	Ácido	Amilorida	20 μM (pH 4)	17
		Mambalginas	0.246 μM	
ASIC1a+2b	Ácido	PcTx1 (psalmotoxina)	~0.0027 μM	17
		Mambalginas	0.061 μM	
TRPV1	Calor >42 °C	Voacangina	50 μM (capsaicina)	21
	Ácido Irritante	Capsazepina	0.324 μM (capsaicina)	
TRPV2	Calor >52 °C	Bloqueo con rojo rutenio, 1 μM	ND	22
	Químicos	Bloqueo con SKF 96365, 259 μM	ND	
TRPV3	Calor >33 °C	WO 2006122156 A2 (patente)	1 μM	23
	Irritante			
TRPA1	Frío <17 °C	HC-030031 humano	6.2 μM	23
	Ácido	AP18 ratón	4.5 μM	
	Irritante	AP18 humano	3.1 μM	
TRPM3	Calor >30 °C	Diclofenaco	6.2 μM	24
	Químico	Maprotilina	1.3 μM	
		Primidona	0.6 μM	
TREK-1	Frío <25 °C	Prozac	19 μM	25
	Mecánico	Norfluoxentina	9 μM	
TRPM8	Frío <25 °C	BCTC	0.143 μM	23,26
	Químicos	Voacangina	9 μM (capsaicina)	
Nav1.7	Mediadores inflamatorios	TTX (tetordotoxina)	0.004 μM	27,28
		Benzazepinona	0.09 μM	
Nav1.8	NGF	TTX	60 μM	28
		Pirazina	0.030 μM	
Nav1.9	Mediadores inflamatorios	TTX	40 μM	28
P2X3	Mecánico (ATP)	Pyrolopyrimidinona	0.013-0.03 μM	29

ND, IC₅₀ no determinada.

1.3.1. Transducción

La transducción inicia cuando un estímulo es percibido por los nociceptores, los cuales son capaces de activar y modificar la sensibilidad. La activación ocurre cuando un estímulo se convierte en una señal eléctrica o potencial de acción como consecuencia de la fuerza motriz eléctrica generada por la concentración de iones en el medio intracelular y extracelular¹¹. Posteriormente, los potenciales de acción se propagan a lo largo de los axones de las fibras aferentes A ó C hasta la terminal nerviosa que desemboca en las láminas I y II del cuerno

dorsal de la médula espinal **Figura 3**. Las láminas son estructuras formadas dentro de la espina dorsal como resultado de la organización topográfica de células y fibras, cuya función principal es la modulación sensorial. Las láminas I a IV se encargan de las sensaciones exteroceptivas, pero las láminas más superficiales I y II están involucradas de manera directa en la nocicepción (sensaciones dolorosas).

1.3.2. Transmisión

Una vez que la señal nociva es transmitida por la neurona de primer orden hasta las láminas I y II se liberan neurotransmisores pro-nociceptivos como el glutamato y la sustancia P, que son los activadores de las neuronas postsinápticas ubicadas en el cuerno dorsal, permitiendo la continuación de la señal aferente a través del haz espinotalámico¹¹. La conducción por este haz es la vía más importante para la transmisión de las señales aferentes del dolor que viaja de la médula espinal a la corteza, y se divide en neoespinotalámico y paleoespinotalámico.

El haz neoespinotalámico es la vía primaria para la señal de dolor rápido, por lo que se compone de fibras tipo A δ que transmite principalmente estímulos mecánicos y térmicos. Estas fibras finalizan en la lámina I (núcleo marginal) de las astas dorsales y, tras la liberación de sustancias como el glutamato, excitan a las neuronas de segundo orden que se cruzan al lado opuesto de la médula pasando por las comisuras anteriores (cruce ipsilateral), para luego ascender en dirección al encéfalo por las columnas anterolaterales y, finalmente, terminar en el tronco encefálico y el tálamo **Figura 3**. La activación de esta vía permite localizar el sitio exacto del dolor, así como su intensidad¹.

El haz paleoespinotalámico transmite el dolor lento crónico a través de fibras de tipo C, siendo la sustancia P el neurotransmisor principal en esta vía. Las fibras C son capaces de percibir estímulos químicos (H⁺, K⁺, histamina, bradicinina, etc.) que surgen como consecuencia de daños tisulares, o bien, por causa de algún proceso inflamatorio **Figura 1**. Las fibras neuronales se proyectan hacia la circunvolución poscentral de la médula y se extienden en forma bilateral a los núcleos inespecíficos del tálamo, alcanzando las zonas frontales de la corteza **Figura 3**. Las conexiones neuronales tan amplias evita que los estímulos nocivos no puedan localizarse con precisión, llegando a ser difusos¹.

1.3.3. Modulación

La percepción del estímulo doloroso es sensibilizada en el cerebro por numerosas clases de canales iónicos y receptores que participan en la propagación y procesamiento de las señales, lo que lleva a la activación del sistema de modulación endógeno del dolor. Este sistema está conformado por neuronas intermedias dentro de la capa superficial de la médula espinal y los tractos neurales descendentes, mismos que se encargan de inhibir las señales nociceptivas.

Comienza la liberación de endorfinas, encefalinas y dinorfinas a través de las neuronas moduladoras descendentes, localizadas en la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo, las cuales se proyectan hacia la formación reticular medular y al locus cerúleo; iniciando la producción de serotonina y norepinefrina, respectivamente. A partir de esta zona las fibras nerviosas descendentes se proyectan hasta el funículo dorsolateral de la médula espinal, haciendo sinapsis con la neurona aferente primaria.

La liberación de los neurotransmisores opioides, así como la serotonina y norepinefrina inhiben la liberación de transmisores del dolor secretados en las neuronas aferentes nociceptivas, evitando la señal de dolor^{1,30}.

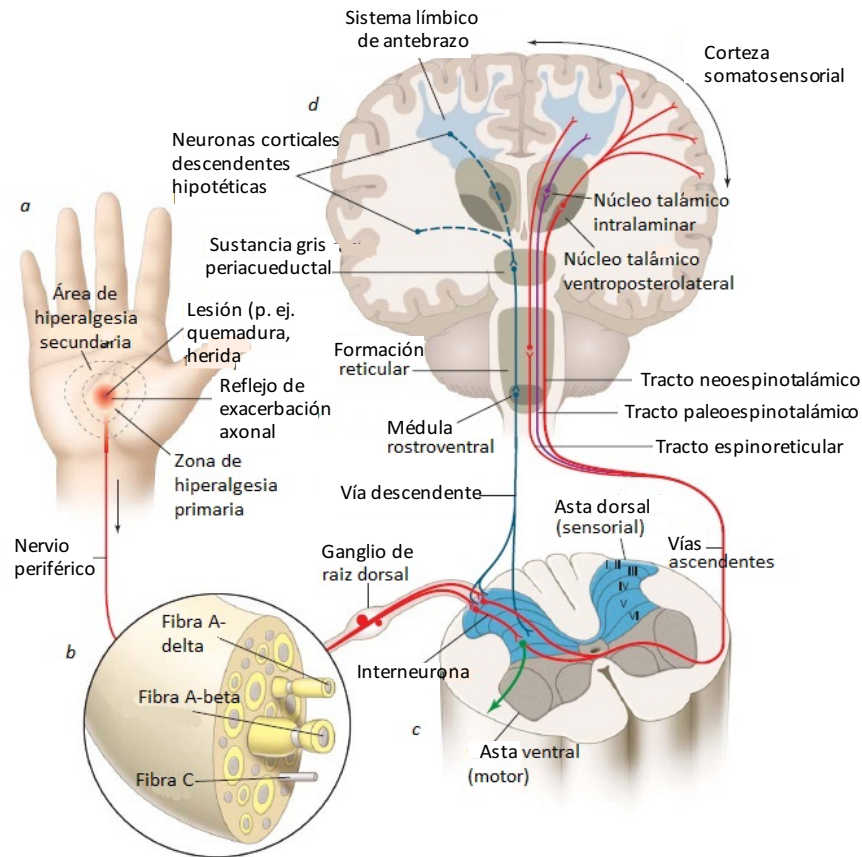


Figura 3. Neurofisiología general del dolor. "A) Estimulación de las fibras C por lesión intradérmica generando dolor agudo, también se muestra el dolor generado por estímulo mecánico cerca del sitio de la lesión (hiperalgesia primaria, sensibilidad aumentada al dolor) y el área de hiperalgesia secundaria (dolor mecánico aumentado por un estímulo nocivo) que queda fuera del área de hiperalgesia primaria y es producida por la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y el sistema nervioso central (SNC), activado como consecuencia de los impulsos nociceptivos aferentes. B) Cuando se presentan estímulos de tipo mecánico, térmico o químico, los nociceptores conducen las señales aferentes hacia la médula espinal. C) El asta dorsal de la médula espinal constituye el primer centro de relevo sensorial en el SNC. La señal nociceptiva que llega a este nivel es sometida a una modulación antes de definir su vía ascendente. D) En función de las áreas de activación en el tálamo y la corteza cerebral, las proyecciones secundarias como el tracto espinotalámico, el tracto de la columna dorsal y otras vías nociceptivas conducirán la señal de dolor". Tomado de Oaklander, 2011¹³.

1.4. Epidemiología del dolor

A la fecha se estima que 20% de la población adulta a nivel mundial sufren problemas de dolor, siendo las afecciones de tipo crónico y neuropático las de mayor incidencia³¹. El manejo inadecuado de este padecimiento puede tener consecuencias a nivel social, psicológico y económico, reduciendo significativamente la calidad de vida, por ello existen estrategias combinadas para el manejo del dolor como: procedimientos quirúrgicos, fisioterapia e intervenciones farmacológicas. Como terapia de primera línea se utilizan fármacos AINE (antiinflamatorios no esteroideos) y opioides administrados por vía oral, aunque en algunos casos se requieren antidepresivos y anticonvulsivos. No obstante, alrededor del 30% de los pacientes tratados con terapia de primera línea no muestran mejoría, lo cual se debe en parte a la dosis permitida para algunos medicamentos, incluso con la administración adecuada de los fármacos, su uso a largo término está asociado con efectos secundarios severos como ocurre con el uso de los opioides¹¹.

Entre las afecciones que provocan el dolor neuropático se encuentra la diabetes como una de las más importantes. Estudios epidemiológicos estiman la prevalencia de diabetes en 366 millones de personas a nivel mundial, tan sólo en 2011, y se predice un aumento a 566 millones para 2030³². Por esta razón, el desarrollo de agentes farmacológicos para tratar neuropatía periférica, en diabéticos, resultan atractivos para varias farmacéuticas.

Hasta el 2013 sólo siete agentes han sido aprobados en Estados Unidos para el tratamiento de afecciones que provocan dolor neuropático: lidocaína (parche transdérmico), gabapentina, duloxetina, pregabalina, gabapentina (gastro-retentiva), capsaicina (parche transdérmico) y tapentadol³². Por ello, los avances en farmacología se centran en evaluar rutas de administración alternas, así como la identificación de nuevos componentes con blancos moleculares más específicos^{6,11}.

1.5. Analgésicos en la terapia para el dolor

El objetivo del uso de analgésicos como tratamiento farmacológico para el dolor consiste en modificar los mecanismos periféricos y centrales implicados en la aparición del dolor. Aunque también se debe considerar la baja respuesta a los analgésicos convencionales y la dificultad que implica el tratamiento en cada caso, como puede ser la vía de administración, efectos secundarios, costos, etc.

El uso de analgésicos no opioides como son los salicilatos y AINE, están indicados en enfermedades musculoesqueléticas, ya que pueden reducir el dolor y la inflamación de algunas enfermedades crónicas. Por otro lado, los analgésicos opioides se emplean para el dolor visceral moderado o intenso. A continuación, se describe brevemente la clasificación de los analgésicos de acuerdo a la OMS³³.

1.5.1. Analgésicos opioides

El término opioide se refiere a todos los productos con afinidad a los receptores opioides, ya sea exógenos (incluyendo los derivados del opio) o endógenos (como endorfinas y encefalinas). Mientras que el término opiáceo se refiere exclusivamente a los productos derivados del opio (*Papaver somniferum*) como la morfina, codeína, papaverina, etc.^{34,35} Estos componentes se caracterizan porque el aumento de dosis disminuye el dolor, aunque también aumentan los efectos adversos.

Previo al conocimiento de los opioides endógenos como las encefalinas se había postulado sobre la existencia de los receptores opioides, debido a las respuestas farmacológicas que se presentan después de la administración de una sustancia opioide. Fue en 1973 cuando se identificaron dos receptores opioides en cerebro de ratón: el receptor μ activado por morfina, que induce analgesia supraespinal y, el receptor κ activado por ketaciclazocina, que provoca analgesia espinal^{35,36}. Años más tarde se identificó el receptor δ , que induce analgesia, pero en menor medida en comparación al receptor μ . Asimismo, se propusieron diferentes subtipos para cada uno: μ_1 , μ_2 , δ_1 , δ_2 , κ_1 , κ_2 y κ_3 ³⁷. A la fecha se han caracterizado 17 receptores opioides entre los que figuran ϵ , ι , λ y ζ como los más representativos; estos son capaces de reconocer ligandos como las β -endorfinas, pero sus efectos principales no son precisamente analgésicos, en algunos casos responden más al estrés, mientras que en otros aún se desconoce su acción³⁸.

A nivel estructural se sabe que los receptores μ , δ y κ , pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, en particular a aquellos que se internalizan después de ser fosforilados, indicándonos que se localizan a nivel transmembranal. También se sabe que estas proteínas son de tipo G_i , es decir, son capaces de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa, reduciendo significativamente el AMPc^{37,39}. Con esto se sugieren dos posibles respuestas fisiológicas, la primera se refiere al cierre de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje en las terminales presinápticas de neuronas primarias, las cuales conducen señales nociceptivas, y consecuentemente, la reducción de liberación de neurotransmisores. La segunda alternativa consiste en la activación de canales de potasio en la neurona postsináptica de vías de conducción de dolor, ocasionando una hipepolarización^{37,40}.

1.5.2. Analgésicos no opioides

Los salicilatos y otros AINE, son analgésicos no opioides con actividad antiinflamatoria. Se caracterizan por no pertenecer a la clase de los narcóticos y actuar bloqueando la síntesis de prostaglandinas, mediante inhibición de la enzima ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1, COX-2); sin embargo, las prostaglandinas mantienen la integridad y proliferación de la mucosa gástrica asegurando un adecuado riego sanguíneo, por lo que la inhibición de éstas también resulta muchas veces contraproducente⁴¹. Este grupo de analgésicos se caracteriza por tener

un techo analgésico, es decir, existe una dosis a partir de la cual incrementos del fármaco aumentan los efectos secundarios sin que esto se traduzca en una mayor eficacia analgésica.

Entre los salicilatos más empleados se encuentra el ácido acetilsalicílico o aspirina, teniendo como efectos principales los antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos y antiagregantes; tras su administración por vía oral, la dosis se absorbe a través del tubo gastrointestinal. Se administra para el tratamiento del dolor leve o moderado, como la cefalea, crisis agudas de migraña, dolor musculoesquelético transitorio y dismenorrea, y para reducir la fiebre. El ácido acetilsalicílico se debe evitar en niños menores de 16 años, debido al riesgo de síndrome de Reye (encefalopatía y hepatopatía), y en niños o adolescentes con infección vírica o fiebre³³.

Por otro lado, los AINE como el ibuprofeno, tienen efectos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos. A una dosis completa regular, tienen un efecto analgésico y antiinflamatorio duradero, por lo que están indicados en el dolor continuo y regular. El diclofenaco y el naproxeno combinan una actividad antiinflamatoria de moderada potencia con una incidencia de efectos adversos relativamente baja (pero la incidencia es mayor que la del ibuprofeno). El ibuprofeno está indicado para el tratamiento del dolor leve o moderado, y para el tratamiento del dolor y la inflamación de la artritis reumatoide y la artritis juvenil. También puede ser útil en cuadros más inespecíficos de dolor de espalda y enfermedades de tejidos blandos. Los efectos adversos más frecuentes son generalmente gastrointestinales, como náusea, vómitos, diarrea y dispepsia, aunque también se han descrito reacciones de hipersensibilidad, como anafilaxia, broncoespasmo y erupción cutánea; así como retención de líquidos³³.

A diferencia de la aspirina y los AINE el paracetamol es un analgésico no opioide con escasa o nula actividad antiinflamatoria. Está indicado en el tratamiento del dolor leve o moderado, como la cefalea y las crisis agudas de migraña. Se utiliza en pacientes en los que los salicilatos u otros AINE están contraindicados, como los asmáticos o con antecedentes de úlcera péptica, o en niños menores de 16 años en los que los salicilatos se deben evitar a causa del riesgo de síndrome de Reye. Su poca actividad antiinflamatoria, limita su utilidad para el tratamiento a largo plazo del dolor asociado a inflamación; sin embargo, es útil en el tratamiento de la artrosis, en la que el componente inflamatorio es mínimo. Una sobredosificación puede producir necrosis hepatocelular, y con menor frecuencia, necrosis tubular renal³³.

1.6. Péptidos emergentes con actividad analgésica provenientes de animales

Actualmente se han identificado componentes con capacidad analgésica en el veneno o secreciones de: anémonas, conos marinos, arañas, reptiles y anfibios^{42,43}. El caso más representativo es el péptido ω -conotoxina MVIIA obtenido del veneno de un cono marino⁴⁴. Asimismo, también se han aislado los péptidos: APETx2 de anémona, μ -SLPTX-Ssm6a de

escolopendra, β -TRTX-Tp2a de araña, Mambalina-1 de serpiente y Dermorfinas de ranas, entre muchos otros. Todos ellos han mostrado tener un efecto analgésico mayor con respecto a otros que se encuentran disponibles para su venta comercial, y en algunos casos han demostrado tener especificidad en nociceptores **Figura 4**⁴⁵⁻⁴⁸.

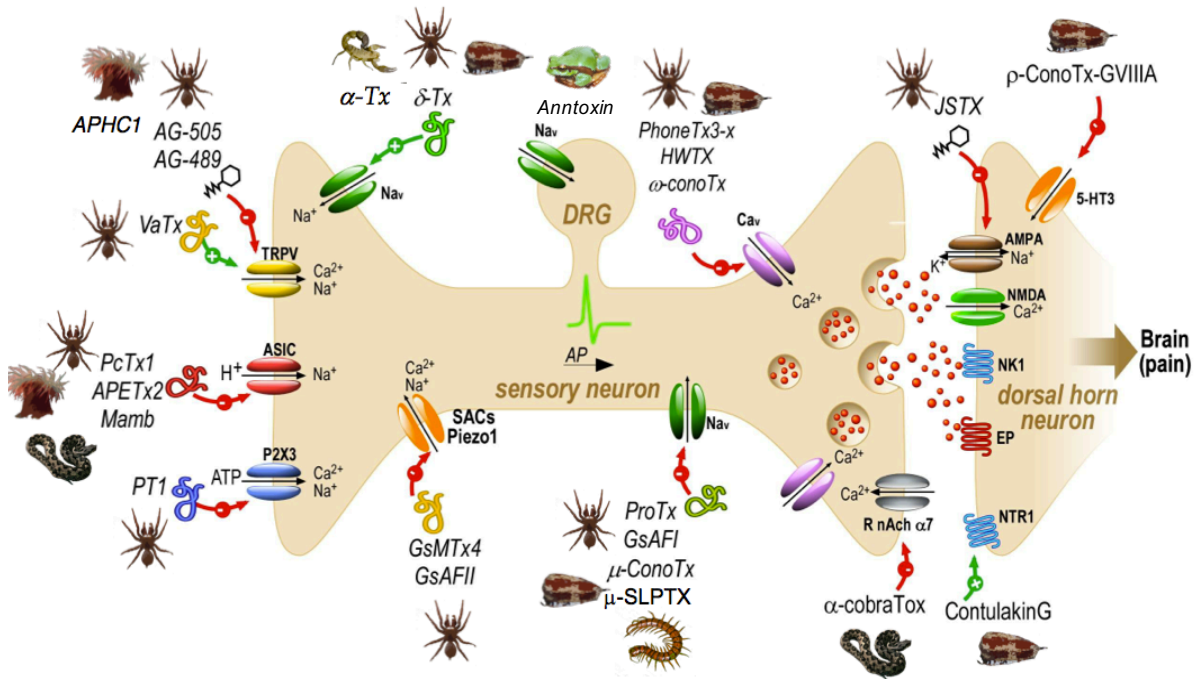


Figura 4. Toxinas de animales y sus blancos de acción en células de mamíferos. Tomada y modificada con permiso de Diochot⁴⁹.

1.6.1. El descubrimiento del Prialt®

Los conos o caracoles marinos (género *Conus*) son predadores invertebrados venenosos que comprenden alrededor de 700 especies, cada especie de cono produce de 100 a 200 péptidos en su veneno que son utilizados para inmovilizar y digerir a su presa, así como también para defenderse de sus depredadores⁵⁰. Se ha demostrado que muchos péptidos de conos tienen blancos específicos a canales iónicos activados por ligando y dependientes de voltaje localizados en el sistema nervioso de sus presas, aunque también se ha visto que actúan sobre canales iónicos homólogos de mamíferos⁵¹.

Los péptidos de conos marinos como las μ -conotoxinas y ω -conotoxinas, generalmente son utilizadas como estándares en el área de la neurociencia. Las μ -conotoxinas son utilizadas para inmovilizar los músculos esqueléticos sin afectar los eventos sinápticos o axonales, ya que tienen la habilidad de bloquear los canales de Na^+ musculares del subtipo $\text{Na}_v1.4$, pero no los canales de Na^+ de los subtipos $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.6$ - $\text{Na}_v1.9$. Por otro lado, las ω -conotoxinas son usadas como estándares de agentes farmacológicos en

investigaciones relacionadas a los canales de Ca^{+2} activados por voltaje, y son utilizadas como bloqueadores en la liberación de neurotransmisores; además, han sido utilizadas para diagnosticar enfermedades relacionadas a los canales de Ca^{+2} , como el síndrome de Lambert-Eaton^{11,52}.

De todas las conotoxinas conocidas ω -conotoxina MVIIA, aislada de *Conus magus*, es la más importante hasta el momento. Es un péptido con blanco de acción sobre los canales de Ca^{+2} tipo N, los cuales están relacionados con la algesia en el sistema nervioso. Su equivalente sintético se conoce como ziconotide (Prialt®; Elan Pharmaceuticals, Inc.), y fue el primer fármaco derivado del veneno de un cono en ser aprobado en Estados Unidos por la Food and Drug Administration (FDA). Actualmente es utilizado para el tratamiento de dolor crónico severo siendo su vía de administración intratecal^{53,54}.

Otros péptidos derivados de conos marinos como CGX-1007, CGX1160, CGX-1051, ACV1 y Xen2174, están siendo probados en tratamientos clínicos. CGX-1007 (Conantokin G), aislado de *Conus geographus*, es un antagonista del receptor NMDA está siendo probado para el tratamiento de convulsiones epilépticas. CGX1160 (Contulakin-G), también de *C. geographus*, es un agonista del receptor de neurotensina subtipo 1 (NTS1), y se está evaluando para el tratamiento del dolor crónico severo en pacientes que requieren administración de fármacos vía intratecal. CGX-1051 aislado de *Conus purpurasens*, es un inhibidor del canal de K^{+} y es utilizado como un tratamiento potencial en los infartos al miocardio. ACV1 (conotoxina Vc1.1), identificado en *Conus victoriae* es un antagonista del receptor nAChR, está siendo empleado en dolor de tipo neuropático crónico y post quirúrgico. Además, otros componentes de venenos de conos han mostrado tener actividades como: inducción antinociceptiva, antiepiléptica, neuroprotectora o cardioprotectora, entre otras⁴⁴.

2. Antecedentes

2.1. Secreciones de piel de anfibios como fuente de biomoléculas

La amplia distribución de este grupo de vertebrados a nivel mundial nos habla de su gran capacidad de adaptación morfológica, fisiológica, bioquímica y conductual, motivo que los convierte en parte fundamental de la cadena alimenticia, ya sea como presas o predadores. Entre sus presas se incluyen tanto insectos como artrópodos, aunque algunos tienen hábitos carnívoros, en cuanto a sus predadores pueden variar desde reptiles hasta mamíferos superiores⁵⁵.

Los anfibios no poseen medios de defensa como dientes, garras o espinas, por lo que se ven obligados a recurrir a otros sistemas de defensa. Por ejemplo, en el caso de los anuros, cuando se sienten amenazados hinchando de aire sus pulmones para que sean difíciles de ingerir, o bien, permanecen inmóviles y después saltan sorpresivamente al tiempo que expulsan su orina. Sin embargo, el mecanismo de defensa más importante descrito en anfibios es su piel, la cual no sólo es esencial para su respiración cutánea y para mantener su humedad corporal, también es capaz de secretar sustancias nocivas cuando se aplica una presión externa sobre los animales, llegando a ser altamente tóxicas en algunos casos⁵⁶⁻⁵⁸.

Estructuralmente su piel está constituida por dos capas: la epidermis y la dermis; la primera corresponde a la más superficial o externa, mientras que la segunda está situada entre la epidermis y el tejido muscular. En la dermis podemos ubicar las glándulas de mucosa encargadas de regular tanto la humedad como la viscosidad de la piel, dos características constantes en estos animales⁵⁶. En esta misma capa, aunque en menor proporción se sitúan las glándulas granulares o venenosas, en ellas se sintetizan una gran cantidad de componentes químicos con diferentes actividades biológicas⁵⁸.

Las secreciones son mezclas heterogéneas de biomoléculas que resultan irritantes o tóxicas para sus depredadores, incluso sirven para protegerlos de algunos microorganismos patógenos como hongos, bacterias y protozoarios^{59,60}. Hasta el momento los diferentes componentes identificados se agrupan en: 1) aminas biogénicas, 2) esteroides, 3) alcaloides y 4) péptidos y proteínas.

El grupo de aminas biogénicas se subdivide a su vez en tres tipos de compuestos: a) indol-alquilaminas y derivados N-metilados, b) imidiazol-alquilaminas e hidroxifenil-alquilaminas y c) epinefrina y derivados de norepinefrina. De estos podemos destacar el grupo de las indol-alquilaminas por las propiedades alucinógenas, hipertensivas y vasoconstrictoras que presentan, pudiendo producir convulsiones en algunos casos⁶¹.

Los componentes del segundo grupo se caracterizan por presentar un núcleo de tres hexanos y un pentano conocido como núcleo esteroide. Un ejemplo representativo de este grupo son las bufotalinas (obtenidas de secreciones de piel de los sapos del género *Bufo*), las



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

cuales presentan propiedades cardio-aceleradoras y en algunos casos efectos anestésicos locales⁶².

Los alcaloides, miembros del tercer grupo, son bases nitrogenadas exclusivas de plantas y artrópodos, cuya importancia está dada por los efectos psicoactivos que provocan. Sin embargo, es posible encontrar alcaloides en las secreciones de algunos anfibios porque gran parte de su dieta está constituida por pequeños insectos. Entre los alcaloides más estudiados encontramos las bufoteninas, y al igual que las bufotalinas también se aislaron a partir de las secreciones de sapos⁶³.

El cuarto grupo incluye oligopéptidos, péptidos y proteínas, mismos que han mostrado actividades biológicas de tipo antimicrobianas, antifúngicas, analgésicas, entre otras. Por ello este grupo se ha convertido en uno de los más interesantes desde el punto de vista farmacológico⁶⁴⁻⁶⁶.

2.2. Péptidos bioactivos identificados en anfibios

Los primeros trabajos realizados con extractos de piel de anfibios se realizaron con miembros del orden anura (ranas y sapos), principalmente de la familia Phyllomedusinae, a partir de los cuales lograron identificar diferentes componentes de naturaleza peptídica con actividades tipo ceruleína (estimulador de secreciones gástricas), traquicinina (neuropéptido), bradicinina (vasoactivo), bombesina (liberador de gastrina), sauvagina (osmoregulador), entre otras⁶⁷⁻⁷⁰. Sin embargo, fue hasta 1980 cuando se identificaron componentes peptídicos con actividad analgésica tipo opioide^{67,70}. Estudios más recientes han identificado componentes con otro tipo de efectos interesantes, tales como inhibidores de serino-proteasas, enzimas con actividad fosfolipasa A₂, inhibidores de canales de sodio activados por voltaje sensibles a tetrodotoxina y analgésicos de tipo local^{45,46,71-73}.

En cuanto al orden urodela (salamandras, sirenas y tritones), podemos citar los trabajos con extractos de piel de salamandras pertenecientes a los géneros *Salamandra*, *Eurycea*, *Ambystoma*, *Plethodon*, *Taricha* y *Nothophthalmus*; así como estudios de tritones del género *Triturus* y de la sirena *Pseudobranchius striatus*^{59,67,71}. Además de la tetrodotoxina identificada en *Nothophthalmus viridescens*, destaca el alcaloide samandarina obtenido a partir de *Salamandra salamandra terrestris*. Sobre la samandarina se sabe que presenta efectos anestésicos locales; no obstante, su alta toxicidad en mamíferos (LD₅₀=70 µg/kg ratones y LD₅₀=700-900 µg/kg perros), limita su uso terapéutico. Hasta el momento se desconoce el mecanismo de acción de este alcaloide, aunque se sabe que actúa sobre médula espinal, causando sobre-excitación muscular, hipertensión, pupilas dilatadas, sialorrea, convulsiones, disnea, parálisis y eventualmente la muerte^{74,75}.

En el caso del orden gymnophiona (cecilias), los estudios se ven limitados tanto por el número de especies, considerablemente menor respecto a otros anfibios, así como por las áreas de distribución de estos animales a nivel mundial. Sobre las cecilias existe un trabajo

de la especie *Chthenoherpeton indistinctum*⁶⁷, y otro más con *Siphonops paulensis*, encontrando que la secreción de *S. paulensis* presenta actividad hemolítica y citotóxica^{76,77}.

Cabe destacar que la preparación de extractos de piel involucra el sacrificio de los animales, provocando un daño irreparable a la biodiversidad, siendo esto una de las causas para que en estudios subsecuentes se comenzara a trabajar con biopsias o con las secreciones de piel, más que con los extractos. Los métodos para toma de muestras por biopsia son los rutinarios, mientras que para la obtención de secreciones se requiere administrar un agente químico⁷¹, un estímulo manual^{58,78}, o un estímulo eléctrico^{66,79,80}.

Algunos ejemplos de obtención de biopsias se describen en el trabajo de Cardall⁸¹, donde se indica la toma de muestras a partir de la piel del tritón *Taricha granulosa* con fines de evaluar si este anfibio sintetizaba tetradotoxina⁸¹. Para el caso de estímulo químico podemos citar el trabajo de Smith y colaboradores, donde inducen la producción de secreciones de piel mediante norepinefrina, una catecolamina sintetizada en respuesta a estrés⁷¹, o bien el trabajo con cecilias de Schwartz donde satura el aire con éter etílico⁷⁷. Para el caso del estímulo por presión manual podemos citar el trabajo de Pimenta, donde mostró la efectividad para obtener secreciones de la rana *Phyllomedusa hypochondrialis*, la cual presenta proteínas y péptidos bioactivos capaces de inducir fisiopatologías locales o sistémicas en ratón, tales como hiperemia, edema, necrosis, entre otras⁷⁸.

Sin embargo, la técnica de estimulación eléctrica es la más utilizada, al respecto podemos citar el trabajo de Chen, quienes a su vez demostraron la posibilidad de hacer transcriptómica (construyendo bibliotecas de cDNA) a partir de las secreciones de piel de seis especies de ranas (*Agalychnis callidryas*, *Pachymedusa dacnicolor*, *Xenopus laevis*, *Rana pipiens*, *Litoria caerulea*, *Kassina maculata*) y un sapo (*Bombina maxima*), aprovechando la liberación de restos celulares que se desprenden durante el proceso de estimulación, a partir de los cuales se puede obtener RNA⁷⁹.

En referencia a los estudios de secreciones de anfibios mexicanos existen trabajos con *Agalychnis callidryas*, *Bufo marinus*, *Hyla eximia* y *Pachymedusa dacnicolor*, entre otros, siendo las últimas dos especies endémicas de nuestro país. Entre los grupos mexicanos podemos citar el análisis peptidómico en *P. dacnicolor* desarrollado por Batista, quien logró identificar: dos inhibidores de proteasas, una bradiginina con una modificación postraduccional y nuevos péptidos antimicrobianos tipo dermaseptina, pero no identificó péptidos de tipo analgésico⁶⁶. Asimismo, el estudio con *H. eximia* mostró la presencia de componentes peptídicos con actividad antimicrobiana y antiparasitaria⁸². No obstante, no lograron identificar péptidos analgésicos que se han aislado en especies de este mismo género, aunque localizadas en continentes distintos.

2.2.1. Péptidos opioides secretados por anfibios

Las secreciones de las ranas del Amazonas (*Phyllomedusa bicolor*) han sido utilizadas durante décadas por la tribu Matses durante ritos chamánicos para mejorar la suerte durante la cacería; no obstante; cuando eran frotadas en heridas de piel expuestas, las secreciones causaban efectos cardiovasculares y gastrointestinales severos en poco tiempo, seguidos de afecciones a nivel central como el incremento en la fuerza física, aumento de los sentidos, resistencia al hambre y la sed, así como exaltaciones ante respuestas de estrés **Figura 5**⁸³.

A pesar del conocimiento sobre los efectos causados por las secreciones de *P. bicolor*, pasaron varios años antes de lograr identificar y sintetizar por primera vez un péptido con actividad analgésica tipo opioide a partir de *P. bicolor*^{69,70,84,85}. Entre las características de este heptapéptido se observa la ocurrencia de una D-alanina en la segunda posición y la amidación en su extremo carboxilo, convirtiéndose en el primer péptido natural que mostraba un aminoácido con este tipo de isomería^{65,86}, esta peculiaridad sumada a su gran especificidad sobre el receptor opioide μ , le valieron su denominación como dermorfina. Años más tarde se identificaron variantes peptídicas con características semejantes **Tabla 3**^{65,70,72,87}.

Estudios posteriores con librerías de cDNA, diseñadas a partir de pieles de la rana *Phyllomedusa sauvagei*, mostraron la existencia de otros péptidos con cierta similitud a las dermorfinas, pero con una D-metionina en la segunda posición y alta especificidad hacia el receptor opioide δ , por lo que se les agrupó en otra familia, las deltorfinas **Tabla 3**^{70,88}.

Con el descubrimiento de las dermorfinas y las deltorfinas se iniciaron varios estudios a nivel bioquímico y biológico, con el fin de determinar su potencial en la industria comercial^{8,65}. Uno de los primeros estudios de éstos péptidos, refería a la ocurrencia natural del aminoácido en conformación D, logrando determinar el precursor de cDNA codificado por un L-isómero, por lo que se pensó que la conversión a D-enantiómero estaba mediado por una inusual modificación postraducciona⁷⁰. Fue hasta el 2011 que se logró identificar una enzima denominada peptidil-aminoacil-L/D-isomerasa a partir del sapo *Bombina orientalis*, cuya función era (como su nombre lo indica) invertir la quiralidad del carbono α del segundo residuo⁷².

En cuanto a su estructura, podemos observar un tripéptido N-terminal común en ambas familias (Tyr-D-Xaa-Phe), dominio indispensable para la unión a los receptores opioides; aunque el dominio esencial para la selectividad al tipo de receptor está en el extremo carboxilo⁸⁷. En las dermorfinas el dominio carboxilo está cargado positivamente, favoreciendo la unión en los dominios II y III del receptor μ , que están cargados negativamente. Por el contrario, el tetrapéptido carboxilo de las deltorfinas tiene carga negativa, aumentando la selectividad hacia el sitio de unión de los receptores δ que mantienen carga positiva⁷⁰.

Tabla 3. Afinidad de dermorfinas y deltorfinas hacia los receptores opioides μ , δ y κ , así como su potencia analgésica en rata vía intracerebroventricular o subcutánea⁷⁰.

Componentes	Estructura	Organismos en donde se han identificado	K _i , nM (mean ± S.E.)			Analgnesia AD ₅₀ (nmol/rata)
			μ	δ	κ	
Morfina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	<i>Papaver somniferum</i>	11 ± 1.5	500 ± 48	--	8.7 ± 1.1
Dermorfinas						
Dermorfina	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	<i>P. sauvagei</i> , <i>P. burmeisteri</i> , <i>P. rohdei</i> , <i>P. hypochondrialis</i> , <i>P. tarsius</i> , <i>Agalychnis</i> sp.	0.6 ± 0.02	929 ± 41	8162 ± 979	0.035 ± 0.01
[Hyp ⁶]der	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Hyp-Ser-NH ₂	<i>P. sauvagei</i> , <i>P. burmeisteri</i> , <i>P. rohdei</i> , <i>P. hypochondrialis</i> , <i>P. tarsius</i> , <i>Agalychnis</i> sp.	0.7 ± 0.03	1200 ± 131	--	--
[Lys ⁷]der	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Lys	<i>P. bicolor</i>	0.09 ± 0.008	1150 ± 185	617 ± 66	0.026 ± 0.009
[Trp ⁴ ,Asn ⁷]der	Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Tyr-Pro-Asp	Macerado de piel de varias especies de la subfamilia Phyllomedusinae	0.32 ± 0.026	690 ± 57	427 ± 47	2.86 ± 0.31
[Trp ⁴ ,Asn ⁵]der	Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Asp	Macerado de piel de varias especies de la subfamilia Phyllomedusinae	0.9 ± 0.052	480 ± 45	177 ± 12	0.43 ± 0.04
Deltorfinas						
D-Met ² -delt	Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH ₂	<i>P. sauvagei</i> , <i>P. burmeisteri</i> , <i>P. rohdei</i> , <i>P. tarsius</i>	693 ± 37	1.18 ± 0.21	>10,000	20 ± 5
D-Ala ² -delt I	Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH ₂	<i>P. bicolor</i>	1985 ± 224	0.78 ± 0.08	>10,000	15 ± 3
D-Ala ² -delt II	Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH ₂	<i>P. bicolor</i>	2222 ± 233	1.03 ± 1.09	>10,000	54 ± 6
D-Leu ² -delt-17	Tyr-D-Leu-Phe-Ala-Asp-Val-Ala-Ser-Thr-Ile-Gly-Asp-Phe-Phe-His-Ser-Ile-NH ₂	<i>P. burmeisteri</i>	>10,000	>10,000	>10,000	--
D-Ile ² -delt	Tyr-D-Ile-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH ₂	<i>Pachymedusa dacnicolor</i> , <i>Agalychnis annae</i>	1021 ± 57	24 ± 3	>10,000	6.7 ± 1

En cuanto a su actividad biológica, las dermorfinas muestran una alta afinidad y selectividad hacia los receptores opioides μ , la cual resulta ser 100 veces mayor que la morfina, cuando es probada en preparaciones de ileon de cerdo de Guinea. Sin embargo, cuando es inyectada vía intracerebro-ventricular la potencia es 280 veces mayor, mientras que la administración subcutánea induce una potencia comparable a la de la morfina debido a su baja permeabilidad en el sistema nervioso central^{65,70,88}.

Por otro lado, D-Ala²-deltorfina resultó tener mayor selectividad al receptor δ , y fue ligeramente más potente respecto a la morfina evaluada por vía intracerebro-ventricular. Entre otras características, resulta relevante su alta resistencia a la degradación enzimática y su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica *in vivo* e *in vitro*^{8,70}.

2.2.2. Péptidos no opioides secretados por anfibios

En 2009 el grupo de Lai⁷³ descubrió un péptido con toxicidad sobre mamíferos utilizado dosis elevadas (10 mg/kg de peso de ratón), pero al evaluar dosis menores mostraba propiedades analgésicas (entre 0.6 a 2.5 mg/kg de peso de ratón), lo que llevó al estudio bioquímico y molecular más detallado de este compuesto. La antoxina, denominada así por ser aislada a partir de las secreciones de la rana *Hyla annectans*, es un péptido de 60 residuos que inhibe el canal de sodio activado por voltaje sensible a tetrodotoxina **Figura 5**. Este péptido mantiene cierta homología con las toxinas tipo Kunitz, aunque antoxina contiene únicamente dos de los tres puentes disulfuro que forman las Kunitz⁷³. Esto llevó a la búsqueda y determinación del gen codificante para la molécula, al tiempo que realizaban una serie de pruebas de analgesia con este péptido. Así lograron identificar otros componentes bioactivos en esta rana y en otra especie más perteneciente al mismo género, *Hyla simplex*^{45,73}.

Con los estudios de las secreciones de *H. simplex* identificaron distintos componentes bioactivos interesantes, siendo las analgesinas una nueva familia de péptidos analgésicos aisladas de esta especie. La analgesina a1 y analgesina a2 son péptidos de 5 residuos, que han sido evaluadas en pruebas antinociceptivas brindando buenos resultados⁴⁶. Por ello es factible pensar que otras especies de este mismo género (o géneros emparentados) pudieran presentar componentes con actividad analgésica.

2.3. Secreciones de piel de *Trachycephalus typhonius*

En algunas prácticas de campo, como en muestreos de densidad poblacional de animales, las personas suelen abstenerse de utilizar guantes durante la colecta y liberación de aquellos que típicamente se consideran como inofensivos. Esto ha llevado a la identificación de especies tóxicas para el hombre, como en el caso de la rana *Trachycephalus typhonius*, de la cual se han descrito intoxicaciones causadas por la secreción de su piel al entrar en contacto con mucosas de mamíferos. Entre los síntomas reportados se encuentran: irritación, dolor y

edema, provocando conjuntivitis aguda^{89,90}. Otros síntomas como: escozor, estornudos, así como sensación de entumecimiento y hormigueo en lengua, fueron descritos durante la manipulación de *T. typhonius* en el laboratorio (datos no publicados). Tales síntomas se deben entre otras causas a la presencia de una toxina en la secreción de piel de esta rana, ya que la administración en ratones vía intraperitoneal presentó un efecto letal con 7.2 µg (datos no publicados). Aunque aún no se ha logrado aislar este componente se sabe que corresponde a una proteína de alto peso molecular; sin embargo, la ocurrencia de otros síntomas en humanos al contacto con las secreciones de *T. typhonius* permite suponer la presencia de otras moléculas bioactivas **Figura 5**.

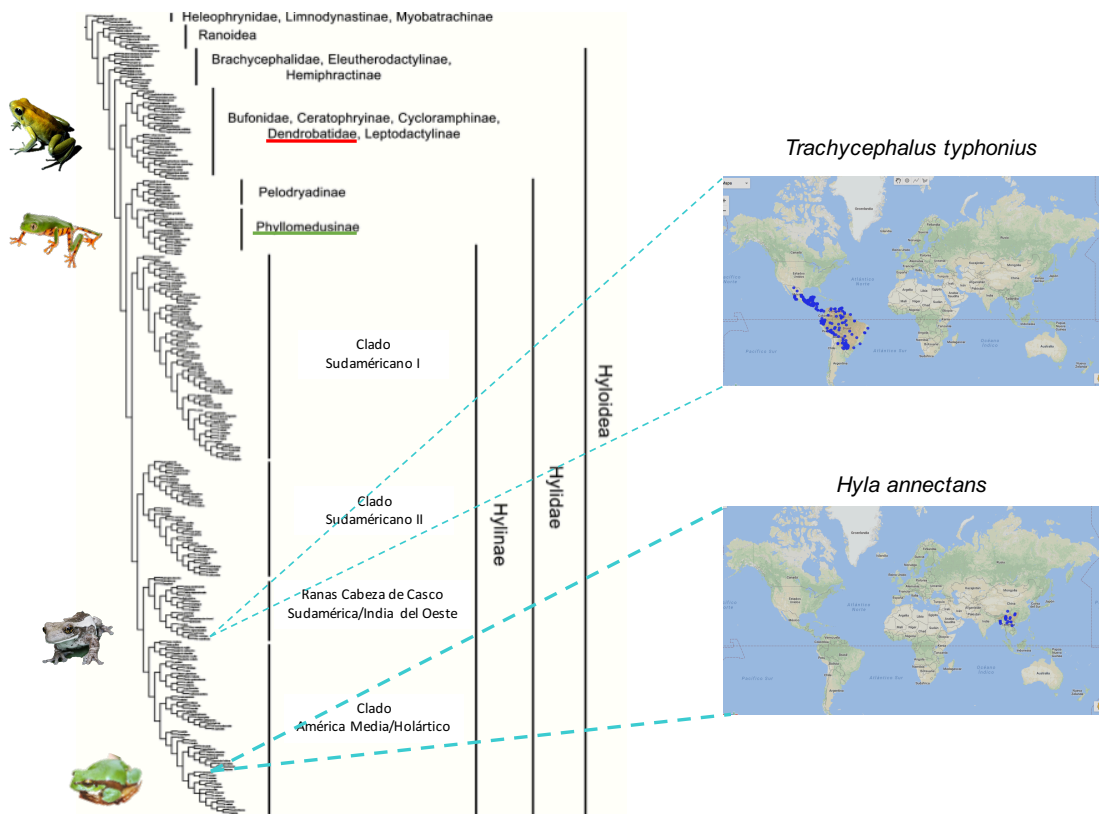


Figura 5. Filogenia de la superfamilia Hyloidea. Se indican algunos anuros capaces de secretar componentes de interés biotecnológico a partir de su piel: género Dendrobatidae (toxinas), subfamilia Phyllomedusinae (analgésicos opioides), la especie asiática *H. annectans* (analgésicos no opioides) y la especie americana *T. typhonius* (aún en estudio), se muestran las zonas de distribución geográfica de las dos especies referidas⁹¹.

3. Justificación

Considerando que México ocupa el quinto lugar de diversidad en anfibios a nivel mundial (con 359 especies descritas), así como el amplio repertorio de moléculas bioactivas identificadas en estos animales, sería ideal el estudio biológico y bioquímico de especies endémicas o con distribución limitada por ser fuentes novedosas de posibles principios activos de tipo analgésico.

4. Hipótesis

Las secreciones de la piel de ranas, salamandras y cecilias, contienen componentes bioactivos de carácter peptídico o proteico que presentan propiedades analgésicas.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

5. Objetivos

5.1. General

Aislar péptidos con actividad analgésica a partir de la secreción de piel de anfibios mexicanos.

5.2. Particulares

- i. Identificar componentes con actividad analgésica a partir de las secreciones de piel de la rana *T. typhonius*, la salamandra *P. cephalica* o la cecilia *D. mexicanus*.
- ii. Caracterizar bioquímicamente la o las fracciones con actividad analgésica.
- iii. Desarrollar una estrategia de producción sintética o recombinante de la o las moléculas con actividad analgésica.



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.

6. Materiales y Métodos

6.1. Casas comerciales de reactivos

Los materiales y reactivos fueron adquiridos grado reactivo a partir de diferentes casas comerciales: Roche, Sigma Aldrich, Novagen, Agilent, Waters, Biolabs, Thermo Scientific, Fermentas.

6.2. Colecta de anfibios y manutención en terrarios

La colecta de salamandras se realizó en Amecameca, Estado de México. Debido al tamaño tan pequeño de estos animales (> 7 cm de longitud), se requirió la colecta de varios ejemplares que fueron liberados en el sitio de captura inmediatamente después de obtener las secreciones de su piel.

La cecilia *Dermophis mexicanum* fue adquirida en Octolab y colectada en San Andrés Tuxtla, Veracruz, debido a la dificultad para colectar estos animales sólo se trabajó con un individuo adulto (45 cm de longitud). La adaptación del terrario (50cm x 35cm x 20cm) se consideró según los hábitos fosoriales propios de las cecilias. El sustrato utilizado fue lodo de platanares manteniendo 20 a 30% de humedad relativa, el alimento (lombrices y tenebrios) se suministró cada 15 días. Este animal no requiere luz debido a su condición de ceguera y siempre se mantuvo a temperatura ambiente.

Finalmente, la amplia distribución de las ranas *Trachycephalus typhonius* permitió la colecta de varios ejemplares adultos (hembras), colectados en las localidades Jalcomulco, Veracruz; Calakmul, Campeche y Puerto Morelos, Quintana Roo. Para estos animales también se adaptó un terrario (peceras de 50 litros) con un tipo de hábitat semi-húmedo, como sustrato se utilizó pet-mos con humedad relativa de 30 a 40% y plantas para trepar. El alimento fue suministrado dos veces por semana (grillos espolvoreados con calcio y vitaminas) y para el mantenimiento de la temperatura se colocaron placas térmicas dentro de los terrarios. Los animales se mantuvieron a temperatura ambiente.

Para la colecta de cada especie se consideraron los lineamientos permitidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y los permisos de colecta para el mantenimiento de los animales en cautiverio, así como para la obtención de secreciones de su piel.



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.

6.2.1. Obtención de secreciones de piel

*6.2.1.1. Estimulación para la salamandra *Pseudoeurycea cephalica**

Para cada ejemplar se retiró el exceso de tierra con agua destilada y, en un recipiente estéril, se sumergieron por 15 minutos en 30 mL de acetato de sodio 25 mM, transcurrido el tiempo se recuperó el buffer y se almacenó en nitrógeno líquido. Inmediatamente después, se realizó una segunda inmersión con las mismas salamandras por 5 min en 30 mL de acetato de sodio 25 mM adicionando norepinefrina 200 mM (Anexo 12.2), se retiró el buffer y se almacenó en nitrógeno líquido⁹². Las muestras se descongelaron y centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min a 4 °C para eliminar restos celulares, se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso.

*6.2.1.2. Estimulación para la cecilia *Dermophis mexicanus**

Aunque en algunos trabajos se reporta la inducción de secreciones de piel por administración de un agente químico como el éter etílico^{76,77}, considerando la limitada información sobre el sistema biológico de las cecilias, se decidió inducir la liberación de secreciones por estimulación manual. Se retiró el excedente de tierra con agua destilada y se colocó al ejemplar en un recipiente de vidrio estéril adicionando 40 mL de agua destilada, se agitó el recipiente con movimientos circulares por tres o cuatro minutos⁸². Finalmente, el agua destilada se colectó y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue liofilizado y almacenado a -20 °C.

*6.2.1.3. Estimulación para la rana *Trachycephalus typhonius**

Típicamente, en ranas se aplica un estímulo eléctrico sobre el dorso de los animales de 3 V durante 2 segundos⁹³. No obstante, en el caso específico de *T. typhoniu* se siguió el protocolo empleado para la cecilia, debido a que ésta especie produce una gran cantidad de secreciones de su piel, de coloración blanca y consistencia espesa (de ahí su nombre común “rana lechera”), variando solamente el volumen de colecta que fue de 15 mL. El producto obtenido se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min para eliminar los detritos celulares, el sobrenadante colectado fue liofilizado y almacenado a -20 °C.

6.3. Determinación de la concentración de proteína

6.3.1. Cuantificación por espectrofotometría utilizando λ de 280 nm

La espectrofotometría es la medida de absorción de luz por una muestra a una o más longitudes de onda, de manera que podemos estimar la concentración de proteínas totales en muestras heterogéneas (como las secreciones de piel de anfibios) o para cuantificar una

proteína pura. Para determinar la concentración de proteína en los extractos totales o sus fracciones se utilizó un equipo de espectrofotometría Eppendorf BioPhotometer con una longitud de onda de 280 nm, en los casos donde se conocía el coeficiente de extinción molar teórico se utilizó la ecuación de Lambert-Bear, descrita a continuación:

$$A = \epsilon d c$$

Donde: A, es la absorbancia

ϵ , es el coeficiente de extinción molar (en el caso de Tt7 es de $6210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d, es la distancia que atraviesa el haz de luz (1 cm)

c, es la concentración de la sustancia absorbente en el medio (expresado en molaridad, M)

6.3.2. Cuantificación espectrofotométrica por el método colorimétrico de Pierce

El método de *BCA Protein assay Reagent Kit*[®] Pierce, es un método espectrofotométrico que permite determinar la concentración de proteína en una solución acuosa. El método consiste en combinar la reacción de Biuret (una proteína que al reaccionar con Cu^{2+} en medio alcalino produce Cu^{1+}) con una segunda reacción, en la que se desarrolla un color púrpura (con un máximo de absorbancia) a 562 nm como resultado de la interacción de dos moléculas de ácido bicinconínico (BCA) con un ion Cu^{1+} .

Previo a la cuantificación por BCA, se debe estimar la concentración de las muestras problema por absorbancia a 280 nm y se hacen diluciones de acuerdo al rango de sensibilidad del método (10 a 320 $\mu\text{g/mL}$). Asimismo, se debe incluir en el ensayo una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA).

En una placa de 96 pozos (tipo ELISA), se coloca 200 μL de reactivo BCA por pozo y se agrega 20 μL por pozo de muestra problema, de BSA o de blanco de reacción e incubar la placa a 37 °C por 2 horas (Anexo 12.3). Las lecturas de absorbancia se obtienen en el lector de placas tipo ELISA (Tecan, SUNRISE) utilizando un filtro de 570 nm para obtener la gráfica y los valores de regresión lineal de la curva estándar con el programa GraphPadPrism versión 5.0a. y calcular la concentración de proteína problema con apoyo del programa Microsoft Excel.

6.4. Análisis bioquímicos y estructurales

6.4.1. Cromatografía líquida de alta presión de fase reversa

Los componentes de secreción fueron separados por HPLC de fase reversa (rpHPLC) utilizando una columna semipreparativa C8 (250 mm x 10 mm) con un gradiente de 0 a 60%

de disolvente B (acetonitrilo, TFA 0.1% v/v), en un lapso de 60 min (1%/min). En el caso de péptidos de las secreciones y fragmentos peptídicos resultantes de proteólisis, se utilizó una columna semipreparativa C18 (250 mm x 10 mm) con las mismas condiciones de rpHPLC (Anexo 12.4).

Las secreciones fueron reconstituídas en agua, inyectando cada evento cromatográfico rpHPLC: 4 mg de *T. typhoni*, 0.4 mg de *D. mexicanus* y 0.1 mg de *P. cephalica*. Cada uno de los picos representados en los cromatogramas fueron colectados como fracciones independientes, las cuales fueron secadas y concentradas por centrifugación al vacío (*savant*). Las fracciones se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4.2. Espectrometría de masas y secuenciación

Las masas moleculares de los péptidos con actividad fueron determinadas en la unidad de proteómica del IBt mediante ionización por electrospray (ESI-MS) usando un equipo Finnigan LCQ-DUO ion trap (San José, CA, USA). Las secuencias N-terminal de los péptidos se determinaron mediante un equipo automatizado LF3000 (Beckman, CA, USA) de secuenciación de péptidos (degradación de Edman).

6.4.3. Reducción y alquilación

Se disolvieron 50 μg de péptido en 150 μL Tris-HCl 200 mM, pH 8.6 y se adicionaron 10 μL de DTT 32 μM . Para eliminar el oxígeno presente en la muestra se burbujeó con N_2 por 5 minutos, cubriendo con *parafilm*. Se centrifugó por 30 segundos a 14,000 rpm y se incubó a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 min (Anexo 12.5).

Se añadieron 25 μL de una solución de ácido yodoacético y se burbujeó nuevamente con N_2 por 1 minuto. Después de centrifugar 30 segundos a 14,000 rpm, se cubrió la reacción con aluminio e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, el producto de reacción se purificó por rpHPLC con las condiciones establecidas anteriormente (acetonitrilo, TFA 0.1% v/v, 1%/min en 60 min), para la determinación de masas se considera el peso adicional en el péptido como parte de la reacción de carboximetilación.

6.4.4. Resolución de la estructura primaria por digestión proteolítica

El liofilizado de la endoproteinasa Asp-N (Sigma Aldrich) se reconstituyó en 50 μL de agua destilada, según las especificaciones del proveedor. La concentración final fue 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, de dónde se tomaron 1.2 μg para la reacción de digestión. El péptido se reconstituyó en el buffer de reacción a una concentración final de 0.5 mg/mL . La relación enzima-péptido fue 1:20 (1.2 μg de enzima por 25 μg de péptido), incubando a temperatura ambiente por 18 horas y realizando un paso de purificación por rpHPLC. Los fragmentos fueron evaluados por masas y secuencia N-terminal.

6.4.5. Determinación del patrón de enlaces disulfuro

Se realizaron dos digestiones peptídicas independientes con elastasa, la primera con el péptido HisrTt7 oxidado, y la segunda con péptido HisrTt7 reducido y alquilado (300 µg por reacción). Tanto la enzima como los péptidos se reconstituyeron en 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 (según especificaciones del proveedor), y se incubaron a temperatura ambiente toda la noche.

Posteriormente se purificó el producto de cada reacción por rpHPLC en eventos independientes (C18, 0-60 % B, 1 mL/min). El empalme de los cromatogramas definió algunas fracciones que aparecen en la reacción con péptido oxidado, y desaparecen en la reacción del reducido, tales fracciones correspondieron a los fragmentos unidos por enlaces disulfuro. Estas se caracterizaron por masa molecular y se compararon con las masas moleculares teóricas obtenidas por digestión *in silico* con el programa MS-Digest Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>).

6.4.6. Dicroísmo circular

El espectro obtenido por dicroísmo circular (DC) sirve para evaluar la proporción de estructura secundaria de péptidos. Se utilizó un espectropolarímetro Jasco J-710 (Ja, Japan), y se tomaron registros de 190 a 260 nm, considerando tres repeticiones por muestra. La concentración final de las muestras fue 0.5 mg/mL utilizando trifluoroetanol (TFE) al 60% v/v como disolvente (Anexo 12.1). La toma de colecta de datos fue a temperatura ambiente cada 0.5 nm a una velocidad de 20 nm/min, se utilizó una celda de cuarzo de 1 mm de diámetro. Los porcentajes de estructura secundaria se calcularon a partir del espectro obtenido usando el servidor K2D3 (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d3/>).

6.4.7. Análisis de secuencia y modelado por homología

El análisis para identidad de secuencia se realizó por BLAST y el alineamiento por Clustal Ω . La identificación de motivos conservados se ejecutó mediante HHpred con el uso de tres algoritmos simultáneos: pdb70_nr, con los que se descarta 70 % de secuencias redundantes; SCOPE, que selecciona aquellas secuencias con estructura similar y Pfam, que elige familias proteicas con función semejante. Los análisis se ejecutaron en la página Bioinformatics Toolkit del Max-Planck Institute (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/>)⁹⁴.

El modelado por homología se realizó mediante iTASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)⁹⁵, servidor que selecciona los 10 modelos cristalográficos más relacionados al péptido en estudio (Tt7). Este servidor hace empatar las coordenadas asignadas para cada átomo de las diez estructuras cristalográficas, obteniendo así un promedio final para la posición de cada residuo y por consiguiente la estructura tridimensional.

6.5. Sistemas para la producción de péptidos

6.5.1. Síntesis química

El péptido sintético crudo (Tt7) se compró en las casas comerciales Genscript, USA (100 mg). Se purificó por rpHPLC en una columna C18 analítica, bajo las condiciones de purificación descritas anteriormente, y se seleccionó la fracción de interés en base a su masa molecular. La reacción de plegamiento se llevó a cabo con 10 mM de glutatión reducido y 1 mM de glutatión oxidado aforando a 5 mL con agua destilada acidificada con TFA 0.1% v/v, ambos preparados en el momento (Anexo 12.6). Finalmente, se añadió 1 mL de 1M Tris-HCl, pH 8 y se incubó a 37 °C por 20 h. El producto se purificó por rpHPLC (0-60 % B, 1%/min).

La identidad entre el péptido nativo y el péptido sintético se corroboró determinando la masa molecular y mediante un ensayo de coelusión. Para este último experimento se mezclaron 3 µg de péptido nativo y 3µg de péptido sintético, la reacción fue inyectada en rpHPLC bajo las condiciones establecidas.

6.5.2. Expresión heteróloga en bacteria

6.5.2.1. Diseño y amplificación del gen sintético

A partir de la secuencia de aminoácidos se realiza la traducción reversa *in silico*, adicionando la secuencia de corte para BamH1 (*GGATCC*) y Factor Xa (*ATCGAGGGACGC*) en el extremo N-terminal, mientras que en la parte C-terminal se adicionan dos secuencias de paro (*TAATAG*) y el sitio de corte para Pst1 (*CTGCAG*). La siguiente secuencia muestra el diseño del gen sintético con los sitios de corte establecidos:

```
5'GGATCCATCGAGGGACGCGAACAAGATCCGAAATGTCTGTTACCTCGTAATCTTGTAAGGG  
CAAAGGAAGCACCATTTCGCTATTACTATGACAAAAGTGCAGGTACATGCAAGTCATTTAAATAT  
AAAGGCACGCAGGGGAACGGTAATCGGTTCAAGTCTAAAGAGGATTGTGAAGCCGCGTGC GTT  
ACTGCTTAATAGCTGCAG3'
```

Partiendo de la secuencia anterior se diseñaron cuatro oligonucleótidos con los extremos empalmados entre sí para la amplificación del gen por la técnica de *megaprimers*. Se utilizó la técnica *hot start* para evitar la formación de estructuras secundarias entre los oligonucleótidos y una enzima de alta eficiencia para evitar la adición de adeninas por la enzima Taq polimerasa (Anexo 12.7).

6.5.2.2. Clonación en el vector de expresión pQE-30

Una vez amplificado el gen por PCR se purificó la banda con el kit de Qiagen (según las especificaciones del proveedor) y se cuantificó por absorbancia a 260 nm mediante nanodrop.

Se utilizó el vector de clonación pKS Bluescript II (+) linearizado con EcoRV y defosforilado (Anexo 12.8). Para la reacción de ligación (Anexo 12.9) la proporción vector-inserto fue 1:3 (150 ng vector por 30 ng inserto) y el producto obtenido se utilizó para la transformación bacteriana por electroporación en condiciones de esterilidad y frío (4 °C). Se adicionaron 5 µL de la reacción de ligación al vial de células electrocompetentes *E. coli* DH5α (40 µL), se disolvió la mezcla y se transfirió suavemente a una celda de electroporación (0.1 mm diámetro), previamente fría. Después de limpiar la celda se aplicó una corriente de 2.5 kV y se recuperaron las células en 1 mL de medio SOC, mezclando suavemente. Las células transformadas se incubaron a 37 °C por una hora en agitación y se sembraron diluciones 1:10 y 1:100 en cajas Petri con LB-ampicilina-X-gal (Anexo 12.10).

Después de incubar a 37 °C toda la noche se seleccionaron las colonias blancas y aisladas para realizar un PCR de colonia, para ello se estiró cada clona en una caja de Petri con LB-ampicilina, y el resto de la asada se inoculó en 5 µL de H₂O. A cada inóculo se adicionó 5 µL de la mezcla de reacción empleando los oligonucleótidos del vector para el enriquecimiento por PCR (Anexo 12.11). Las colonias con el tamaño esperado se crecieron en 3 mL de medio Lb-ampicilina para amplificar el ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Midi Prep, kit Roche). Los plásmidos con el tamaño correcto son digeridos con BamH1 y Pst1 para obtener el inserto (Anexo 12.12), el cual se purificó y se ligó al vector de expresión pQE-30, previamente defosforilado (Anexo 12.8, 12.9).

Para la transformación bacteriana se adicionaron los 20 µL del producto de ligación a un vial de células quimiocompetentes *E. coli* Origami, en condiciones de esterilidad y frío. La mezcla se incubó 30 min en hielo y se aplicó un shock térmico por 1 min a 45 °C, después se incubó en hielo por 10 min. La reacción se incubó en 250 µL de medio SOC por 1 hora a 37 °C y se sembró en una caja Petri con Lb-ampicilina. La caja se incubó toda la noche a 37 °C y las colonias con el tamaño correcto se analizaron a nivel de secuencia nucleotídica en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología.

6.5.2.3. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes

Se inoculó 50 mL de medio Lb-ampicilina con una asada de la transformación bacteriana incubando 12 h a 37 °C, del inóculo se transfirieron 10 mL a 1 litro de medio Lb-ampicilina hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0.8 a 1.0 para inducir con 1 mM de IPTG. Se dejó crecer por 6 horas a 37 °C con agitación constante a 230 rpm y se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min a 4 °C en un rotor JA-14 (Beckman). Se desechó el sobrenadante y se almacenaron las células (*pellet*) a -20 °C para su posterior lisis celular.

6.5.2.4. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel

La cromatografía de afinidad se basa en la propiedad de unión no covalente (afinidad) de una molécula (ligada a un soporte tipo cromatografía, Ni-NTA) a otra molécula distinta (ligando o proteína con etiqueta de Histidinas). La capacidad de unión disminuye en presencia de otra molécula competidora del ligando (elución con imidazol).

El *pellet* almacenado fue lisado con la mezcla de lisis celular BugBuster[®] Protein Extraction Reagent (Anexo 12.14), 1 mL por cada 100 mL de cultivo durante 30 min a temperatura ambiente para facilitar la degradación tanto del ADN como de la pared celular bacterianos. El homogenado se centrifugó a 15,000 rpm por 10 min a 4 °C utilizando el rotor JA-20 (Beckman), para evaluar si la proteína es soluble o insoluble se analizó el sobrenadante (fracción soluble) y los cuerpos de inclusión (fracción insoluble) por SDS-PAGE 15% (Anexo 12.13).

La purificación de la proteína a partir de fracción soluble se realizó mediante una columna de 1 cm diámetro x 20 cm altura y 1 cm de resina de nitrocelulosa asociada a níquel (Ni-NTA). La resina se pre-equilibró con agua y posteriormente con 10 mL de solución de equilibrio FS. Posteriormente, se hizo pasar el sobrenadante con un flujo lento, haciéndose pasar el recirculante una vez más para después adicionar 20 mL de solución de lavado FS. Finalmente, se adicionaron 10 mL de solución de elución FS, colectando fracciones de 1 mL cada una. La columna se lavó con solución de equilibrio FS y se almacenó en etanol 30 % a 4 °C (Anexo 12.14).

Para la purificación de la proteína a partir de fracción insoluble (cuerpos de inclusión) se resuspendió el *pellet* en 5 mL de solución de equilibrio FI toda la noche a temperatura ambiente, y se realizó la ruptura celular por prensa francesa, el producto obtenido fue centrifugado a 15,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se hizo pasar por una columna Ni-NTA, previamente pre-equilibrada con 10 mL de solución de equilibrio FI. Posteriormente, se realizó un lavado con 20 mL de solución de lavado FI y se realizó la elución con 10 mL de solución de elución FI, colectando 10 tubos de 1 mL cada uno. La columna se lavó con solución de lavado FI y se almacenó en etanol 30 % v/v a 4 °C (Anexo 12.14).

Los eluatos se evaluaron por SDS-PAGE y *Western blot*, utilizando el protocolo de metanol-cloroformo para eliminar el exceso de sales (sólo fracciones con cloruro de guanidinio). Las fracciones con la proteína de interés fueron re-purificadas por rpHPLC bajo las condiciones establecidas y se realizó un análisis por *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-histidinas (Anexo 12.15).

6.6. Ensayos de actividad biológica *in vivo* e *in vitro*

6.6.1. Inhibición de tripsina

El experimento se realizó en una placa tipo ELISA de 96 pozos, utilizando buffer Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8.2 en un volumen total de 280 µl, correspondientes a 40 µl de péptido o inhibidor, 40 µl de tripsina y 200 µl de sustrato, colocados en ese orden. Tanto las diluciones del péptido a evaluar y del inhibidor comercial *soybean trypsin inhibitor* (SBTI) se prepararon directamente en los pozos, considerando un volumen de 40 µl con Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8.2 y muestras por triplicado. Se evaluaron diez dosis de cada péptido o inhibidor en diluciones seriadas decrecientes 1:2, partiendo de 7.5 µg de SBTI y Tt7 (27 µg/ml), y de 120 µg de HisrTt7 (429 µg/ml), aprovechando la disponibilidad de péptido recombinante. Después, se adicionó 1.3 µg de tripsina sobre cada muestra (33.3 µg/ml) y se incubó la mezcla por 30 minutos a 25 °C. Finalmente se adicionaron 97.4 µg de sustrato N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) sobre cada muestra (0.487 mg/ml) utilizando una pipeta multicanales. Se incubó la reacción por 10 min y se comenzó la lectura de absorbancia con λ a 405 nm en un lector de ELISA cada dos minutos hasta completar cinco mediciones. La reacción se detiene con ácido acético 30 % v/v (Anexo 12.16).

El control positivo de la reacción se realizó incubando la tripsina con el sustrato BAPNA en ausencia del inhibidor (100 % de actividad de tripsina, o 0% de inhibición). Para el control negativo se consideró una reacción incubando la tripsina con el sustrato BAPNA y un inhibidor comercial (SBTI). La substracción de la línea base se realizó con una mezcla de buffer (80 µl) y sustrato (en ausencia de tripsina e inhibidor). Los datos se graficaron en el programa GraphPad Prisma, presentados con desviación estándar.

6.6.2. Evaluación de analgesia mediante ensayo *Hot Plate*

Se utilizó el equipo de *Hot Plate* o placa caliente para inducir dolor agudo aplicando un estímulo térmico de 55 °C a través de una placa de acero. Este ensayo se realizó por triplicado en grupos de 3 ratones CD1 machos de 14 g, adquiridos del Bioterio del IBt, UNAM, Cuernavaca. Además, se obtuvo la aprobación del comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM para los ensayos de analgesia en modelos *in vivo*.

La administración de los péptidos o drogas fue vía intracraneal e intraperitoneal para evaluar actividad en SNC y SNP, respectivamente⁹⁶⁻⁹⁸. Los componentes evaluados fueron: péptido nativo (0.5 mg/kg), péptido recombinante (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/kg) y péptido recombinante digerido (1.5 mg/kg). Como analgésicos de referencia se utilizó el analgésico AINE ketorolaco (5 mg/kg), y el opioide dermorfina (0.1 mg/kg), para evaluación en sistema nervioso periférico (SNP) y central (SNC), respectivamente; como control negativo se empleó la solución vehículo PBS (Anexo 12.17).

Cada animal fue acondicionado durante tres días colocándolo sobre el equipo *Hot Plate*, pero sin estar encendido. Debido a que es una prueba donde se evaluó el comportamiento, aquellos animales que se mostraron alterados durante el acondicionamiento (que saltaron o lamieron las patas con regularidad) se excluyeron del experimento. Todos los experimentos se realizaron a una hora fija y en las mismas condiciones de temperatura y luz.

Después del acondicionamiento los animales se pesaron (20 a 22 g) y se separaron los grupos para cada tratamiento. En este momento se prepararon las dosis de los componentes a probar, la solución vehículo y el agente de referencia. Debido a que el tiempo de corte establecido fue de 30 segundos (tiempo máximo que se coloca al animal sobre la placa caliente), fue necesario realizar las inyecciones cada 45 ó 60 segundos. A partir de la inyección se realizó la prueba con cada individuo en cada tiempo postratamiento establecido (cada 15 min hasta llegar a los 90 min).

La prueba consistió en colocar a los animales sobre la placa caliente que se mantuvo rodeada por un cilindro de acrílico transparente para observar la conducta del ratón (salto o lamida de patas). El tiempo que tardó cada animal en saltar o lamerse las patas se registró como tiempo latencia (tiempo que tarda el ratón en responder al calor), en ausencia de estas conductas el tiempo de latencia se registró como 30 segundos y se retiró al animal de la placa caliente. Debido a los requerimientos del ensayo fue prescindible trabajar con un límite de 30 ratones por experimento. El análisis estadístico se determinó por *ANOVA two-way*, *Bonferroni test* mediante el software GraphPad Prisma, los datos se expresan como media \pm SEM, con significancia estadística * $p < 0.05$ y ** $p < 0.025$, comparados con el grupo vehículo (PBS).

6.6.3. Pruebas de electrofisiología por *Patch clamp*

Los ensayos de electrofisiología se realizaron en colaboración con la Dra. Rita Restano, quien nos proporcionó las líneas celulares que expresan $Na_v1.7$ y $Na_v1.3$, además de apoyarnos en la toma de registros. Los péptidos a probar se disolvieron en el medio extracelular EK-80, pH 7.3 (Anexo 12.18) y se centrifugaron 2 min a 14,000 rpm para eliminar posibles precipitados. El péptido nativo se probó con dosis única de 30 μ M, el recombinante se utilizó a concentraciones de 5, 15 y 50 μ M.

Como medio intracelular se utilizó CsCl (Anexo 12.18) para sustituir los iones K^+ por iones Cs^+ , que sirven como bloqueadores de los canales de potasio evitando las corrientes de estos canales. Se registraron corrientes de canales de sodio $Na_v1.7$ humanos expresados en una línea estable de células CHO (CHO-h $Na_v1.7$), usando la técnica de *Patch clamp* en modo de célula completa. También se realizaron ensayos en el canal de sodio $Na_v1.3$ expresados en la línea celular HEK (HEK-h $Na_v1.3$). Las corrientes se obtuvieron por despolarización de membrana en pasos de 10 mV (-120 a 20 mV). El potencial de retención se fijó en -90 mV.

Los registros se adquirieron utilizando el amplificador MultiClamp 700B y Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

El protocolo de aplicación comenzó adicionando tetrodotoxina (TTX) a una concentración de 300 nM (control positivo) y después de un lavado se aplicó el péptido a evaluar, finalmente se realizó un lavado para aplicar los pulsos despolarizantes (permitiendo evaluar la afinidad del componente a evaluar).

6.6.4. Cultivo primario de neuronas GRD

Los experimentos se llevaron a cabo en neuronas provenientes de ganglios de raíz dorsal (GRD) de ratas Long Evans, con un tiempo de vida de 7 a 10 días, sin distinción de sexo, provenientes del Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP, Puebla.

El cultivo celular se llevó a cabo en una campana de flujo laminar seguridad I (Nuair, Plymouth, MN, USA) y una incubadora con control de temperatura y CO₂. El material utilizado fue esterilizado previamente mediante exposición a luz ultravioleta.

Tanto para determinar el efecto de los compuestos a evaluar sobre los cambios de fluorescencia de calcio producidos por cambios de pH extracelular, como para los registros de fijación de voltaje (*Patch clamp*) se requirió el sacrificio de diez animales por cada concentración probada para obtener las curvas dosis-efecto del péptido.

Los organismos fueron anestesiados con sevoflurano (que reduce la función respiratoria y la presión arterial, sin afectar los canales ASIC), y posteriormente, sacrificados por decapitación de acuerdo con la norma oficial vigente NOM 062-ZOO-1999, con los lineamientos establecidos por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio). Posteriormente, se obtuvieron los ganglios de la raíz dorsal por disección y con ayuda de un microscopio estereoscópico (American Optical) con técnicas quirúrgicas convencionales.

Los ganglios aislados se colocaron en medio de cultivo Leibovitz L-15 y después se depositaron en un tubo estéril con 2ml de solución de disociación (Anexo 12.19). El tubo con los ganglios se incubó a 37° C en una atmósfera de CO₂ (5%) y aire (95%) durante 30 minutos, posteriormente se hizo cambio de medio tres veces, centrifugando a 4000 rpm/2 minutos entre cada cambio.

La suspensión celular se depositó en placas de vidrio de 12 x 10 mm (Corning) tratados con poli-D-lisina. Las células se incubaron de 4 a 6 horas en medio L-15 modificado, de esta manera se obtendrá un homogenizado de neuronas que se mantendrán en cultivo primario (Anexo 12.19).

6.6.5. Registro de transitorios de calcio por fluorescencia (imagen de calcio)

Empleando la técnica de imagenología de calcio, se realizaron registros para determinar el efecto de la toxina Tt7 sobre los niveles de fluorescencia de calcio producidos por cambios de pH extracelular en condiciones control y en presencia de Tt7. Para ello se realizó un análisis fluorimétrico en células cargadas con la sonda sensible a calcio Fluo 4-AM (Invitrogen). Antes de cada experimento, las células con un tiempo de cultivo de 18 a 24 horas, se incubaron con la forma permeable Fluo 4-AM (acetoximetilester) (4 μ M) en solución extracelular para cultivos, a 37° C durante 60 minutos.

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo con un microscopio Nikon Eclipse Ti (Japón) provisto de una cámara CCD IC-200 (USA) con un monocromador DeltaRAM XTM (USA) y un filtro pasa alto de 510 nm (siendo el máximo de excitación y emisión de Fluo-4 a 480 nm y 510 nm, respectivamente), considerando que la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de calcio intracelular.

Los cristales con las células cargadas se colocaron en una cámara bañada de forma continua con solución extracelular mantenida a temperatura ambiente (22-25°C). Para activar los canales ASICs se perfundió la preparación con una solución a pH 6.1 (considerado como el pH de activación promedio de los canales ASIC presente en los GRDs), produciendo un cambio indirecto en los niveles de calcio intracelular que es claramente detectable con el sistema de imagenología. Se añadió capsazepina 10 μ M a esta solución, con la finalidad de evitar la activación de receptores de TRPV1 presentes en las neuronas de GRD.

Se estudió el cambio de fluorescencia producido por un pH en condiciones control y en presencia del péptido Tt7. En los experimentos iniciales se utilizó 100 nM de Tt7, para definir las concentraciones posteriores a estudiar.

La solución de alto potasio a 20 mM fue utilizada para establecer el estado funcional de las neuronas y del registro, considerándose como viables aquellas que mostraron un incremento de calcio durante la aplicación de este estímulo. Entre cada estímulo se dejó un tiempo de descanso de aproximadamente 5 minutos perfundiendo con la solución pH 7.4. Cada estímulo tuvo una duración de 30s y en la aplicación de Tt7 se perfundió el péptido antes del estímulo con solución ácida y durante, inmediatamente después se hizo un lavado y se probó nuevamente la solución con pH 6.1 sin presencia de Tt7 (Anexo 12.20).

Para la cuantificación y el análisis de imágenes, se utilizó el paquete informático ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) con el que es posible cuantificar la intensidad de la fluorescencia de cada neurona. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron normalizados para su uso estadístico y gráfico. El análisis y la representación gráfica de los datos se realizaron a posteriori con el programa Origin 8 (Origin Lab, EE.UU.).

7. Resultados

7.1. Identificación y caracterización de un péptido bioactivo

7.1.1. Colecta de los anfibios

Después de la colecta se realizó la identificación taxonómica con apoyo de Biólogos de la Universidad del Estado de Morelos (UAEM) y del laboratorio Octolab en Jalapa, Veracruz. Como se muestra en los mapas de distribución reportados por CONABIO, la colecta de ranas fue relativamente sencilla por su amplia distribución en México y sus hábitos arborícolas, lo que facilitó su visualización **Figura 6a**. A diferencia de la salamandra cuya colecta resultó más complicada, por su zona de distribución tan limitada y los hábitos nocturnos de esta especie **Figura 6b**. En el caso de la cecilia, pese a tener una distribución extensa, sus hábitos fosoriales complicó la colecta por ello se colectó un solo ejemplar **Figura 6c**.

a. *Trachycephalus typhonius*



b. *Pseudoeurycea cephalica*



c. *Dermophis mexicanum*



Figura 6. Distribución en México de los anfibios *Trachycephalus typhonius* (a), *Pseudoeurecea cephalica* (b) y *Dermophis mexicanum* (c). Mapas de distribución tomados de CONABIO.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

7.1.2. Cuantificación de componentes de secreción de piel

La determinación de la concentración proteica fue crucial para decidir si contábamos con material biológico suficiente, y considerando que los componentes de piel pueden incluir moléculas no proteicas que pueden interferir con el espectro de absorción de proteínas, se decidió utilizar dos métodos de cuantificación con blancos distintos.

El primer método se eligió por la rapidez y facilidad para recuperar la muestra, consistió en evaluar la absorción de las secreciones mediante UV a 280 nm, teniendo como blanco las moléculas con residuos de tirosina, triptófano y en menor medida fenilalanina. El segundo método (BCA), se eligió en función de su sensibilidad y rapidez respecto a otros como Lowry, Bradford, etc. BCA se basa en el reconocimiento de estructuras protéicas y cuatro residuos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina), permitiendo la absorción a 562 nm como resultado de la reacción de Biuret (producción de Cu^{1+}) y la quelación posterior de Cu^{1+} mediante BCA. Los resultados de cuantificación obtenidos para cada anfibio se muestran en la **Tabla 4**.

En el caso de la rana podemos considerar que el valor de absorbancia a 280 nm pudiera estar sobreestimado por la presencia de moléculas no protéicas que pudieran estar interfiriendo (como aminos biogénicos), por ello consideramos el método BCA como mejor alternativa para cuantificar mezclas complejas como las secreciones de piel de anfibios. No obstante, debido a que resulta imposible recuperar la muestra en estudio, ésta técnica se vuelve útil sólo en algunos casos.

Tabla 4. Cuantificación de la concentración proteica en secreciones de piel de anfibios.

Especie	Orden	Tipo de anfibio	Estímulo	No. ejemplares	A ₂₈₀ (mg/ml)	BCA (mg/ml)
<i>Trachycephalus venulosus</i>	Anura	Rana	Manual	3 adultos	12.30	1.8
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	Urodela	Salamandra	Químico	7 juveniles y adultos	0.03	ND
<i>Dermophis mexicanus</i>	Gymnophiona	Cecilia	Manual	1 adulto	0.4	0.4

ND, no determinada debido a la cantidad limitada de muestra

En el caso de salamandra, la determinación proteica de las secreciones sólo se realizó por el método de absorbancia, ya que el buffer con norepinefrina presentó interferencia con los reactivos de BCA. Por otro lado, considerando el número de ejemplares capturados y la cantidad tan limitada de proteínas obtenidas en la secreción de piel, se decidió no continuar con la caracterización de los componentes secretados por la salamandra.

En el caso de la cecilia se obtuvieron valores de cuantificación iguales por ambos métodos, sugiriendo la presencia de componentes que presenten tanto aminoácidos aromáticos como enlaces peptídicos, como péptidos y proteínas.

7.1.3. Separación de los componentes de secreción por rpHPLC

La migración electroforética de los componentes totales de la rana *T. typhonius* **Figura 7a**, indicó la presencia de algunas proteínas de bajo, mediano y alto peso molecular; sin embargo, el perfil cromatográfico mostró la ocurrencia de componentes proteicos y peptídicos adicionales que no se evidencian por gel **Figura 7b**. Cada una de las fracciones fue evaluada en cuanto a su masa molecular (ESI-MS), lo que nos permitió identificar la presencia de dos o más componentes en algunas de las fracciones (15, 17, 21, 22, 24 y 25), además de identificar la secuencia N-terminal (degradación de Edman) para algunas de ellas **Tabla 5**. Los análisis preliminares mediante BLAST de los segmentos N-terminal mostraron semejanza con inhibidores de tripsina y péptidos de rana para la fracción 7, esfingomielinasa y proteínas hipotéticas para la fracción 10, una proteína de transporte ABC para la fracción 22 y enzimas de tipo ligasa y carboxiviniltransferasa para el caso de la fracción 23 (la más abundante).

Se aisló un total de 35 fracciones por rpHPLC bien definidas siendo la 23 y 25 las de mayor proporción y con masas de aproximadamente 29 kDa, concordante con las bandas mayoritarias observadas por SDS-PAGE. Asimismo, las fracciones 22 y 24 podrían corresponder a las bandas observadas con menor intensidad en el gel (hacia la parte inferior). Con respecto a la banda que se observa por los 50 kDa no se logró asignarle su posible eluato.

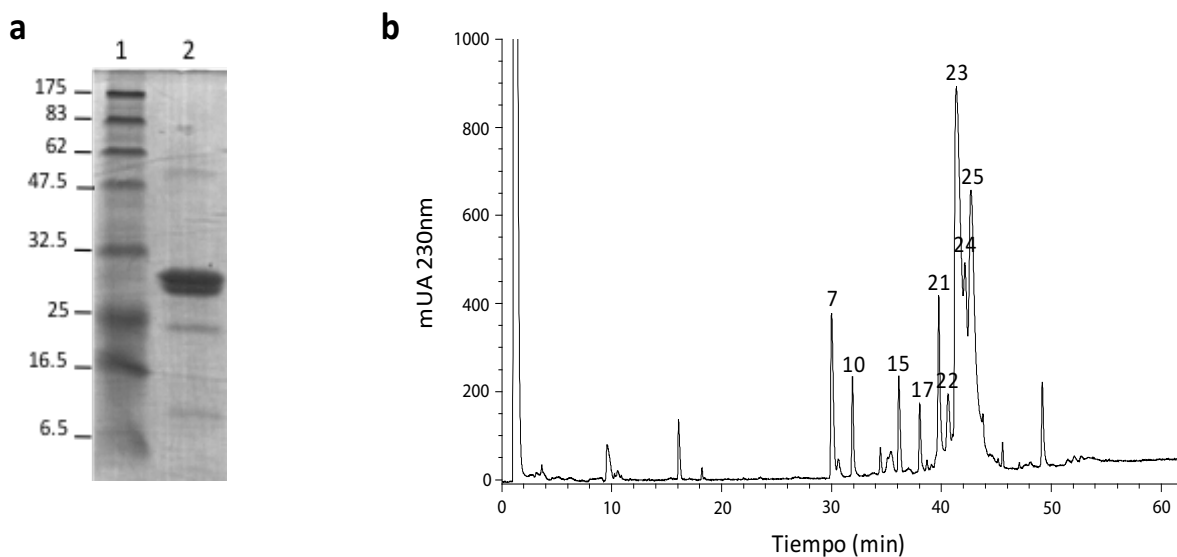


Figura 7. Separación de los componentes de secreción de *T. typhonius*. a) SDS-PAGE 15%, tinción con Azul brillante de Coomassie. MW (carril 1) y 30 μ g de secreción total de piel (carril 2). b) Perfil cromatográfico rpHPLC inyectando 1 mg de secreción total de piel. Las fracciones con número fueron ensayadas para actividad analgésica.

Tabla 5. Determinación de masas moleculares y secuencias N-terminal de componentes secretados por la piel de *T. typhoni*us.

Fracción	Masas moleculares	Secuencia N-terminal
7	6,509.7	EQDPKCLLPRLGKGGKSTI...
10	10,145.47	SQNPKY / SQTKYNPNYKNNTGVPVKPYVQVYEV...
15	1,845.05*; 2,260.28; 3,691.09	ND
17	14,448.84*; 14,430.84	ND
21	6,055.46*; 6,469.66; 6,883.87	ND
22	8,565.62; 14,991.45*	AFPYTVGFXPSYXFEAANT...
23	29027.25	DEIKTVPTSDPFPEVWAXXIQQ...
24	22,116.45*; 22,288.65	ND
25	28,877.94*; 28,925.94	ND

N.D. no determinada; (*) representa la masa molecular con mayor señal en el espectro de masas.

En el caso de la cecilia el ensayo electroforético mostró mayor cantidad de proteínas aparentes respecto a la rana, siendo proteínas de mediano y alto peso molecular. Durante la colecta de secreciones de piel se logró recuperar una parte soluble y otra insoluble, la migración por SDS-PAGE de ambas muestras no indicó diferencia en cuanto a la composición de moléculas presentes en una u otra **Figura 8a**. La separación por rpHPLC respaldó los datos obtenidos por SDS-PAGE, ya que se colectaron varios eluatos; sin embargo, ninguno de ellos parecía estar completamente aislado, indicando la presencia de dos o más componentes por cada fracción **Figura 8b**. El grado de impureza dificultó la obtención de masas moleculares y N-terminal de los eluatos.

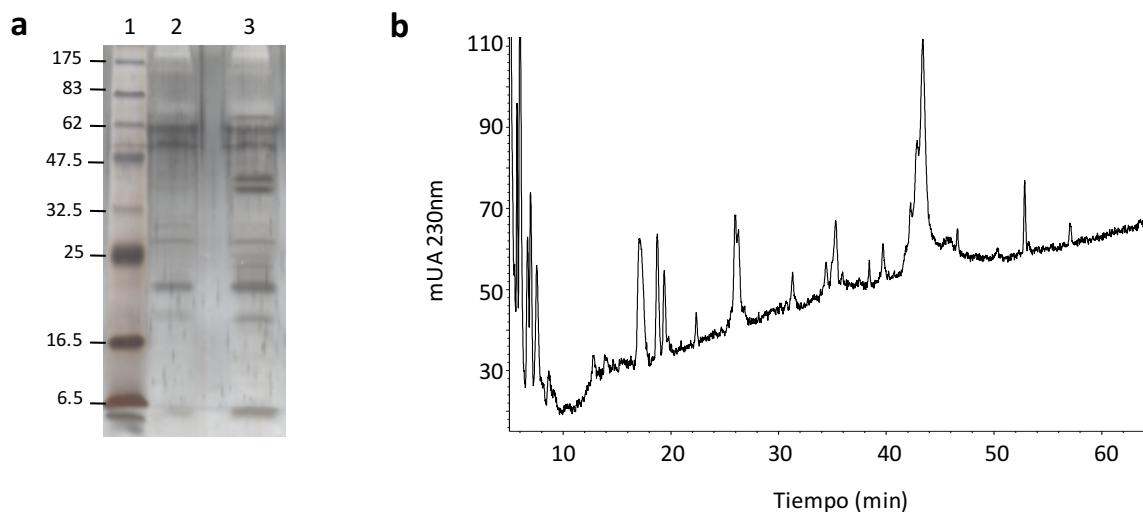


Figura 8. Separación de los componentes de secreción de *D. mexicanum*. a) SDS-PAGE 15%, tinción con plata. MW (carril 1), 5 μ L de secreción de piel en forma insoluble (carril 2) y 5 μ g de secreción total de piel en forma soluble. b) Perfil cromatográfico rpHPLC inyectando 300 μ g de secreción total de piel.

7.1.4. Identificación de péptidos con actividad analgésica

Considerando que la secreción de la rana *T. typhonius* tiene un componente tóxico de alto peso molecular la actividad analgésica fue evaluada únicamente con fracciones aisladas de pesos moleculares medios o bajos, el ensayo consistió en determinar la capacidad analgésica de cada eluato frente al dolor térmico agudo, mediante la prueba *Hot Plate*. De todas las fracciones ensayadas sólo la 7 (F7) presentó actividad analgésica vía intraperitoneal e intracraneal ($p < 0.5$), lo cual se traduce en un efecto biológico a nivel de sistema nervioso periférico (**Figura 9a**) y central (**Figura 9b**), respectivamente. La actividad analgésica en ambas vías de administración se evidencia a partir de los 30 min, manteniéndose hasta los 60 min a nivel periférico y hasta por 90 min a nivel central. Al correlacionar F7 con su masa molecular, observamos que corresponde a un péptido no mayor a 7 kDa **Tabla 5**. Asimismo, su extremo N-terminal nos permitió relacionar F7 con otras moléculas proteicas obtenidas de la piel de especies de rana, por lo que decidimos continuar con la caracterización estructural de F7 **sección 7.1.5**. Sin embargo, también se consideró un sistema de producción sintético o recombinante para la caracterización completa de F7, ya que este componente corresponde a menos del 10% de la secreción total de la rana **sección 7.2.1**.

Otra fracción que mostró efecto biológico por *Hot Plate* fue la fracción 25 (F25), aunque su actividad fue más limitada, ya que sólo se observó efecto vía intracraneal y únicamente al minuto 60 **Figura 9a**. Correlacionando su masa molecular observamos que el eluato 25 corresponde a una proteína no mayor a los 29 kDa (**Tabla 5**) y a diferencia de F7, para F25 no fue posible obtener su extremo amino terminal. Considerando que F25 es una molécula más difícil para caracterizar con respecto a F7, además de tener un efecto biológico de menor espectro de acción (sólo intracraneal), se optó por no continuar los estudios de la fracción F25.

A diferencia de la rana, la concentración de cada eluato obtenido de *D. mexicanum* es menor, por ello se decidió realizar la prueba de analgesia con el extracto total administrado vía intracraneal (0.5 mg/kg) e intraperitoneal (1 mg/kg). No obstante, los resultados en ambos ensayos fueron negativos para la actividad analgésica (datos no mostrados), por ello se descartó el trabajo con las secreciones de piel de este animal.

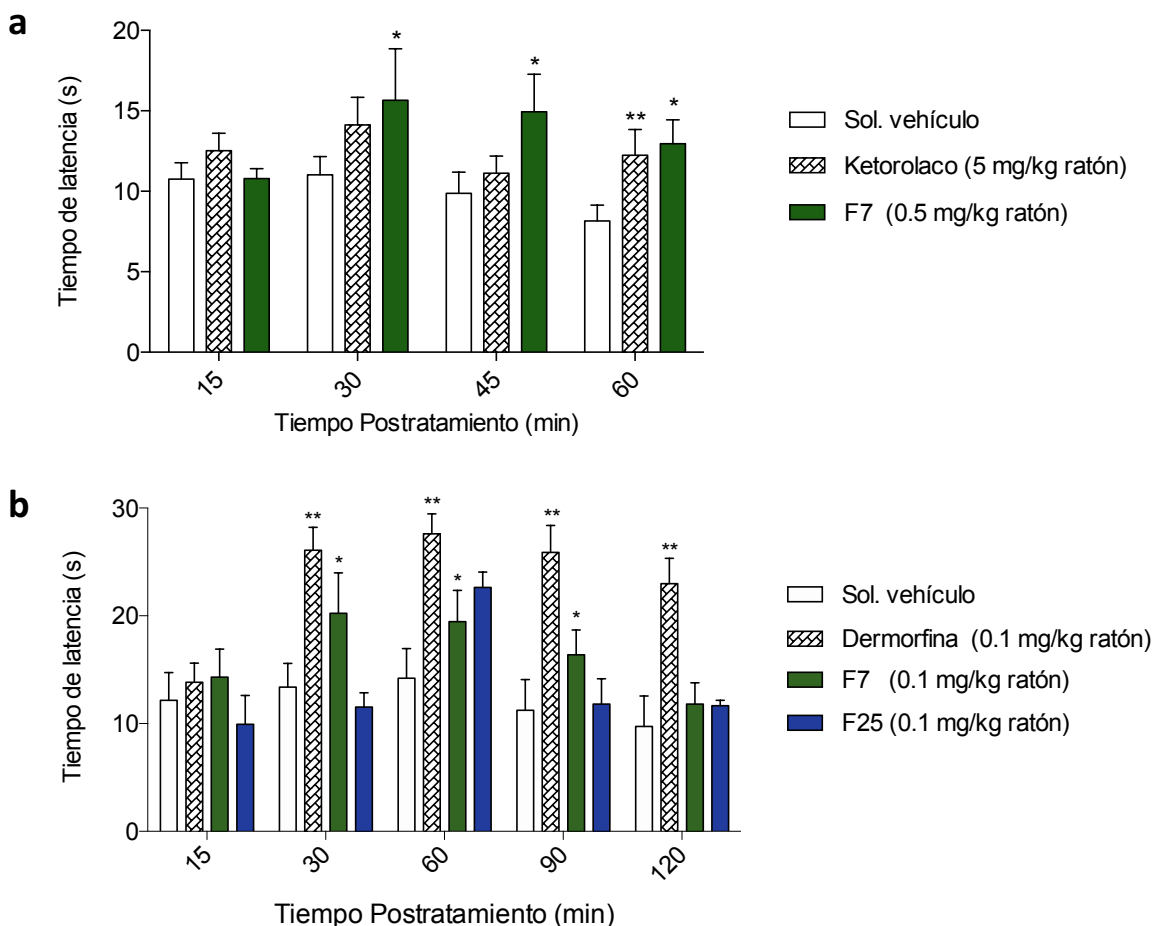


Figura 9. Ensayo de analgesia por Hot Plate de fracciones obtenidas de la secreción de piel de *T. typhoni*us. Administración via intraperitoneal (a) e intracranial (b) sólo se muestran las fracciones que mostraron efecto biológico. ANOVA two-way, Bonferroni test, datos expresados como media \pm SEM * p <0.05, ** p <0.025 comparados con la solución vehículo (PBS); ratones CD1 machos, 18-20 g; sol. vehículo, dermorfina y ketorolaco n =9, F7 y F25 n =6).

7.1.5. Elucidación de la estructura primaria de F7

Con base en el extremo N-terminal determinado para F7, se realizó un alineamiento parcial por BLAST, encontrando similitud de secuencia con el péptido analgésico antoxina proveniente de la rana *Hyla annectans*. A continuación, se muestra la secuencia N-terminal de F7 comparada con antoxina, resaltando las cisteínas (negritas) y el ácido aspártico (itálicas) como sitio de corte de Asp-N, así como sus masas moleculares (Anexo 12.21-A).

F7 (N-terminal)	EQDPKCLLPRLNGKGGSTIRYYDKSAGT C K S -----	6,509.3 Da
Antoxina	AQDYRCQLSRNYGKGSFTNYYDKAT S S C KTFRYRGS G GN R FK T LE D CEAT C VT A E	6,724.3 Da

Primero se hizo la reducción y alquilación de F7 seguida de un paso de purificación por rpHPLC para determinar su masa molecular **Figura 10a**. La diferencia de masas entre el

péptido alquilado (6,742.7) y el péptido oxidado (6,509.7) fue de 233 Da, el cual corresponde al incremento por alquilación de las cisteínas presentes, 57 Da por cada cisteína. Posteriormente se realizó la hidrólisis con Asp-N y los fragmentos obtenidos se aislaron por rpHPLC, obteniendo tres fragmentos con la masa molecular esperada (considerando el peso adicional por la alquilación) **Figura 10b**. Asimismo, se determinó la masa molecular de los fragmentos en estado oxidado y se comparó con la masa teórica calculada por ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) **Tabla 5**. Finalmente, se obtuvo la secuencia de los tres fragmentos de interés obteniendo así la estructura primaria para F7, que a partir de ahora llamaremos Tt7.

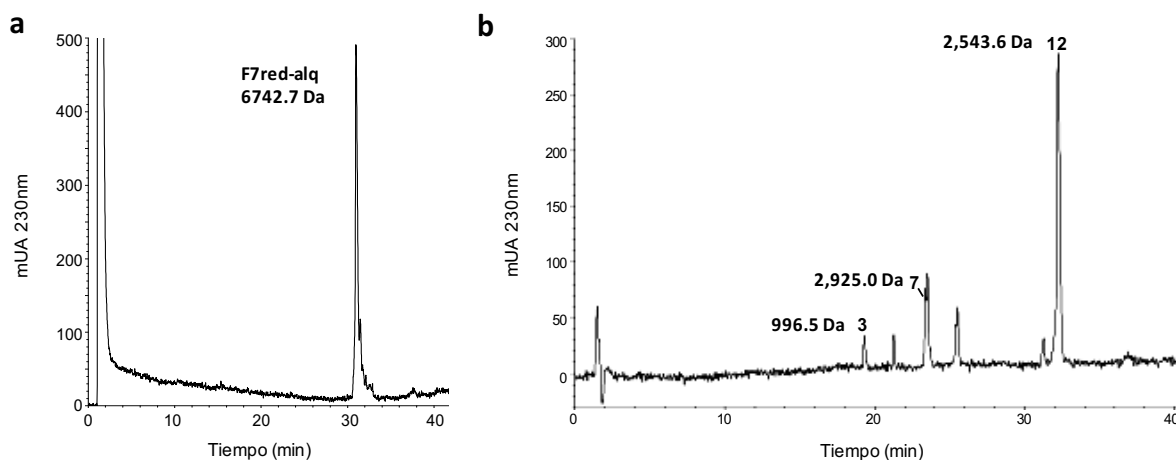


Figura 10. Cromatogramas de F7 reducida y alquilada (a) y fragmentos obtenidos por proteólisis de F7 con Asp-N (b).

Tabla 6. Secuencia y masa molecular de fragmentos de hidrólisis de Tt7 (F7). El segmento "directo" corresponde al N-terminal del péptido F7 alquilado previo a la digestión.

Fragmento	Secuencia	MW _{exp} (Da)	MW _{teo} (Da)
Tt7 (F7)	EQDPKCLLP RNLGKGKGS TIRYYDKSAG TCKSFYKGT QGNGNRFKSKE DCEAACVTA	6,509.7	6,509.3
Directo	EQDPKCLLP RNLGKGKGS TIRYYDKSAG TCK		
Asp-N #12	--DPKCLLP RNLGKGKGS TIRYYY	2,543.6	2,542.9
Asp-N #7	-----DKSAG TCKSFYKGT QGNGNRFKSKE	2,868.0	2,866.8
Asp-N #3	-----DCEAACVTA	882.5	881.9

7.1.6. Análisis de motivos conservados

El análisis por BLAST mostró identidad de secuencia con el resto de las antoxinas (56 a 64 %), conservando además la posición de las cisteínas con Tt7, lo que podría indicar el mismo arreglo en los puentes disulfuro (C6-C56 y C31-C52), **Tabla 7**. Además, el análisis mostró un motivo conservado en las antoxinas (KGSXSXT), correspondiente a un sitio de

interacción con tripsina, mientras que en Tt7 este motivo estructural se ubicó en la posición 14 a 20 (KGKGSXI). Aunque el motivo de antoxinas respecto al de Tt7 difiere en dos residuos, se decidió ensayar su capacidad para interactuar con tripsina mediante experimentos de inhibición enzimática; no obstante, los resultados mostraron que Tt7 no tiene actividad inhibitoria sobre tripsina **sección 7.3.1.**

Tabla 7. Alineamiento de secuencia Tt7 con antoxinas. Se indica el sitio de interacción de tripsina en cada una.

Péptido	Secuencia aminoacídica	No. aa.	% Ident.
Tt7	-EQDPKCLLPRNLG KGKGS TI RYYYDKSAGTCKSFYKGTQGNNGNRFKSKEDCEAACVTA-	59	100
Antoxina	-AQDYRCQLSRNYG KGS SFTNYYYDKATSSCKTFRYRSGGNGNRFKTLLEDCEATCVTAETAE	60	64
AntoxinaS5	AAADHRCGLIRNLG KGS SFTI RYYYDKATNSCKTFRYRGTGGNGNRFRTLEECETT CVTG-	60	61
AntoxinaS2	AAADHRCGLIRNLG KGS SFTNYYYDKATNSCKTFTYRGTGGNGNRFKTLLEECGTT CVTG-	60	61
AntoxinaS3	-ASDYRCNLSRSY KGS SFTNYYYDKATNSCKTFTYRGTGGNGNRFKTLLEECETACV TG-	59	60
AntoxinaS4	-ASDYRCNLSRSY KGS SFTNYYYDKATNSCKTFTYRGTGGNGNRFKTLLEECETT CVTG-	59	58
AntoxinaS1	-ASDYRCNLSRSY KGS SFTNYYYDKATNSCKTFTCRGTGGNGNRFKTLLEECETT CVTG-	59	56

Como parte de la identificación de otros motivos estructurales conservados con implicaciones funcionales, se realizó un análisis por HHpred con SCOPE y Pfam (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/hhpred>), logrando asociar Tt7 con otras 365 proteínas. De ese análisis se identificó un triplete conservado de residuos aromáticos en la mayoría de las secuencias, resultando tres tirosinas para Tt7 ubicadas en la posición 22 a 24 **Figura 11.**



Figura 11. Alineamiento de Tt7 con secuencias relacionadas en estructura (SCOPE) y función (Pfam). Se eligieron las primeras 20 secuencias del análisis. Se indica el triplete de aromáticos (rojo), las uniones asignadas entre cisteínas (negritas) y el posible sitio de interacción con tripsina (itálicas).

7.1.7. Modelado por homología

Las estructuras utilizadas para obtener el modelo de Tt7 fueron: LmKTT-1a (una neurotoxina del escorpión *Lychas mucronatus*), y antoxina (un analgésico de *Hyla annectans*), ambas resueltas mediante resonancia magnética nuclear (RNM). Al igual que en antoxina y LmKTT-1a, en el modelo de Tt7 se observa un arreglo estructural tipo Kunitz, que consta de una hoja β -antiparalela, un α -hélice en el extremo carboxilo y una pequeña hélice en el amino terminal. Asimismo, para antoxina y LmKTT-1a se muestra su sitio de interacción con tripsina (rojo), concordante con lo reportado en la literatura. En el caso de Tt7 se sabe que no actúa como inhibidor de tripsina **sección 7.3.1**; sin embargo, se indica este posible sitio de interacción (rojo). También, se demostró que Tt7 no presenta efectos letales en ratón como se presenta en antoxina y LmKTT-1a.

Por otro lado, se indica el triplete de aromáticos localizado al centro de cada estructura (gris), del que se desconoce su papel en las tres moléculas, pero pudiera estar relacionado con su arreglo estructural **Figura 12**.

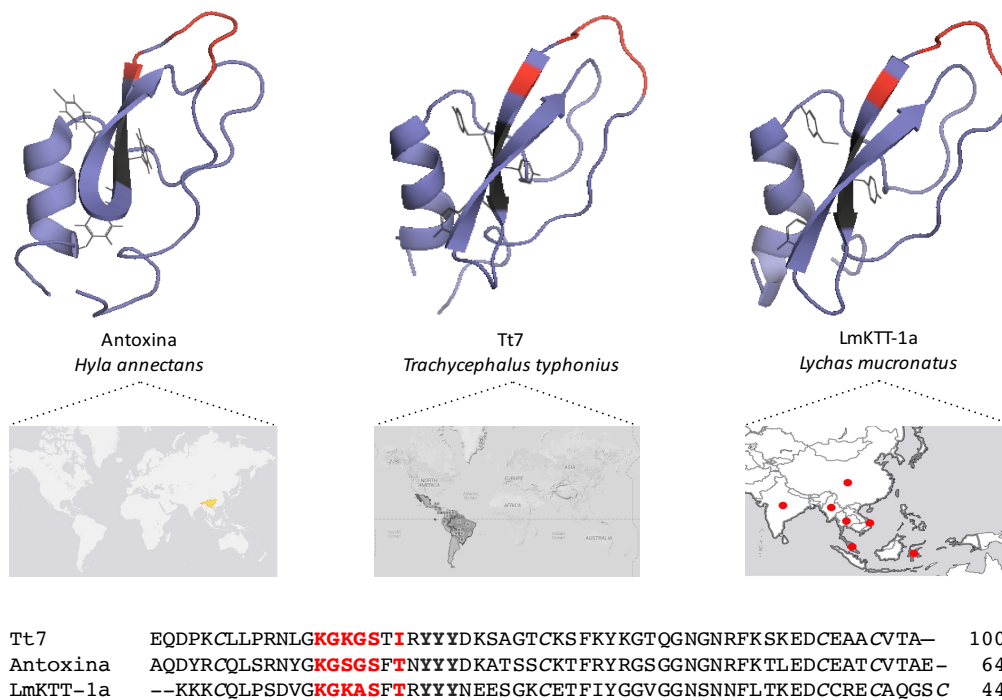


Figura 12. Modelado por homología de Tt7 y estructuras por RMN de antoxina y LmKTT-1a. Los mapas indican la distribución geográfica de cada especie, en la parte inferior se muestra el alineamiento de las tres secuencias.

Los mapas muestran la distribución en la región asiática y de la india para la rana *H. annectans* y el escorpión *L. mucronatus*, mientras que *T. typhonius* se distribuye exclusivamente en la región neotropical, esto podría ser indicativo de la gran estabilidad que presentan las moléculas con arreglo tipo Kunitz, aunque con pérdidas o ganancias de función.

7.2. Sistemas de producción de Tt7 por síntesis química y expresión heteróloga

7.2.1. Producción de Tt7 por síntesis química

El péptido Tt7 se sintetizó químicamente en modo crudo en dos casas comerciales, ChinaPeptides y GenScript. El primer paso de purificación se realizó por rpHPLC, obteniendo el péptido sintético Tt7 (sTt7) en forma reducida. Después de la reacción de plegamiento de sTt7 se requirieron dos eventos adicionales de purificación para obtener el péptido oxidado y puro, obteniendo como rendimiento final 4 μg por cada mg de péptido crudo, correspondiente al 0.4 % del producto inicial adquirido. El rendimiento final en ambas casas comerciales fue el mismo, lo cual muestra la reproducibilidad del método para purificación y plegamiento de péptidos sintéticos **Tabla 8** (Anexo 12.21-B).

Tabla 8. Comparación de rendimiento de purificación y plegamiento de sTt7.

Casa Comercial	sTt7 crudo (μg)	sTt7 reducido (μg)	sTt7 oxidado (μg)	Rendimiento (%)
ChinaPeptides	1000	130	3.9	0.39
GenScript	1000	160	3.8	0.38

Finalmente, un ensayo con Tt7 (nativa) y sTt7 (sintético), purificados de manera independiente y en mezcla (coelusión), mostró que sTt7 tiene el mismo tiempo de retención de Tt7 (21.5 min), determinando que ambos péptidos presentan el mismo plegamiento **Figura 13**. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos de sTt7 no se lograron concretar los ensayos biológicos por *Hot Plate*. Por lo que se recurrió a la expresión heteróloga para aumentar la producción de Tt7.

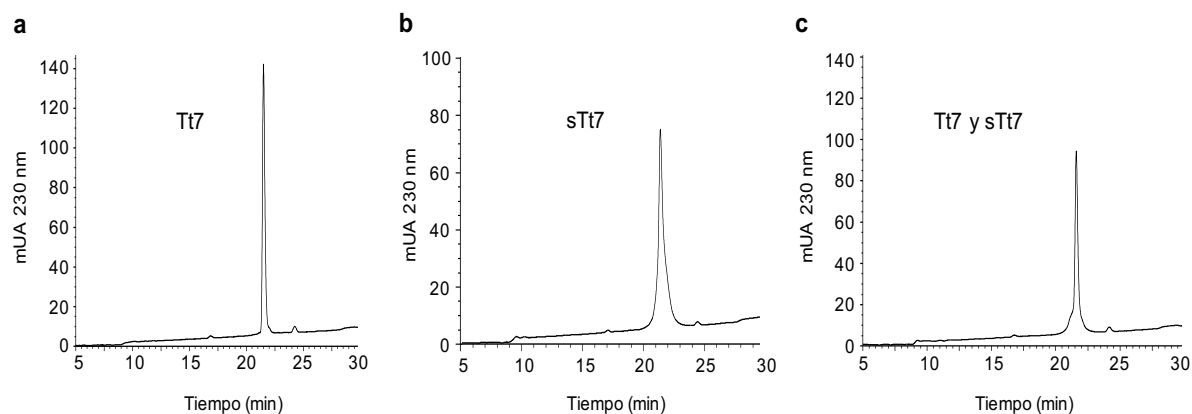


Figura 13. Purificación por rpHPLC de Tt7 nativo, sintético y ensayo de coelusión. Se inyectaron 6 μg de Tt7 (a) y 6 μg de sTt7 (b). Para el ensayo de coelusión se inyectaron 6 μg de la mezcla Tt7 y sTt7 (3 μg de cada péptido).

7.2.2. Expresión heteróloga de Tt7

El ensamble del gen Tt7 (207 pb) se realizó por la técnica de *megaprimers* (Anexo 12.7), obteniendo un producto que fue clonado en pBluescript KS (+) y expresado en el vector pQE-30, éste último tiene como peculiaridad la adición de seis histidinas en el extremo amino del gen. Además de corroborar la secuencia nucleotídica correcta del gen Tt7, se verificó la presencia de la caja TATA que forma parte del promotor y resulta prescindible para la transcripción. A continuación, se muestra la secuencia del péptido recombinante esperado, indicando la serie aminoácidos incorporados por el vector (itálicas) y la secuencia de reconocimiento del Factor Xa (negritas).

*MRGSHHHHHHGS***IEGRE**QDPKCLLPRLGKKGKSTIRYYYDKSAGTCKSFKYKGT
QGNNGNRFKSKEDCEAACVTA

Para la transformación bacteriana se ensayaron las cepas Origami, M15 y BL21, utilizando 1 mM IPTG e incubación a 37 °C por 6 h como condiciones óptimas para la inducción y expresión, respectivamente. El análisis por SDS-PAGE nos permitió identificar la cepa más conveniente, aunque en los tres casos se observó la expresión de una proteína con el tamaño esperado (8,362.7 Da), la cepa Origami tuvo mejores rendimientos aparentes, a diferencia de BL21 que mostró expresión mínima para la proteína esperada **Figura 14**.

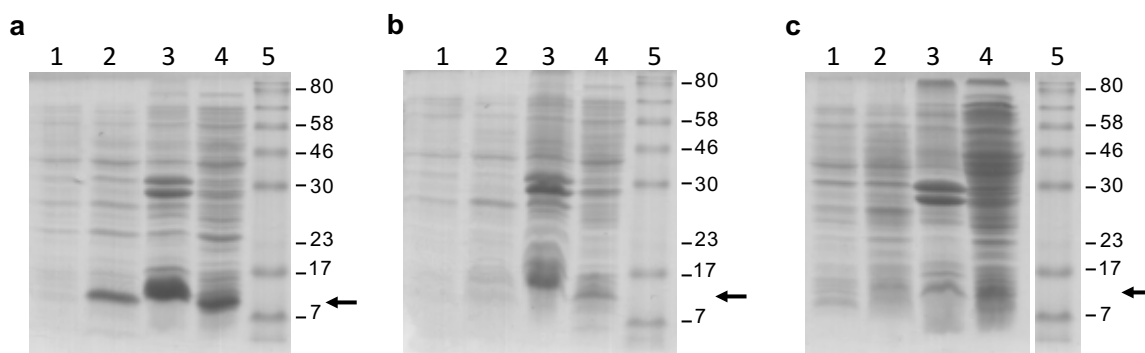


Figura 14. Expresión de Tt7 evaluada por SDS-PAGE 15%. a) Origami, b) M15 y c) BL21, indicando la expresión antes de inducir (carril 1), después de inducir (carril 2), fracción insoluble (carril 3), fracción soluble (carril 4) y MW (carril 5). Se indica la banda del tamaño esperado en cada caso (flecha). Tinción con Azul brillante de Coomassie (20 µl/carril).

Después de seleccionar la cepa Origami como la mejor productora de Tt7, se realizó la purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la parte soluble e insoluble, teniendo mejor rendimiento en los eluatos de fracción soluble, mismos que se re-purificaron por rpHPLC. Finalmente, mediante la técnica *Western blot* se determinó que tanto los eluatos colectados de la cromatografía de afinidad a níquel, así como la fracción re-purificada por

rpHPLC, correspondían a la masa molecular (Anexo 12.21-C) de la proteína Tt7 recombinante que ahora llamaremos HisrTt7 **Figura 15**.

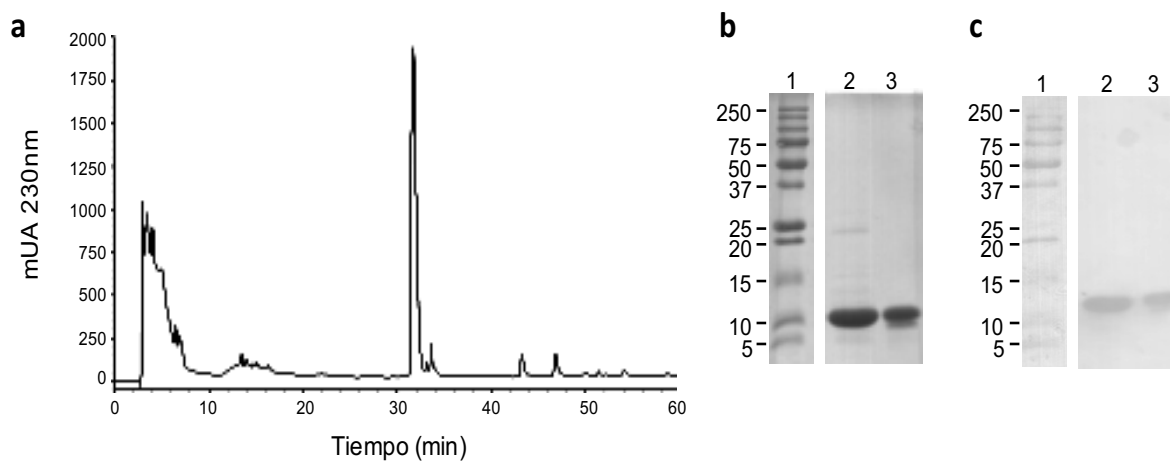


Figura 15. Purificación de la proteína recombinante HisrTt7. Re-purificación por rpHPLC de eluatos colectados por níquel utilizando 300 mM imidazol, Tris-HCl, pH8.0 (a). SDS-PAGE 15%, tinción con coomassie (b) y Western blot, utilizando anti-histidinas (c); MW (carril 1), eluato de NiNTA con 300 mM imidazol (carril 2) y repurificación por rpHPLC (carril 3).

El rendimiento final de HisrTt7 fue 1.2 mg por litro de cultivo, superando la producción respecto a la obtenida por síntesis química. Por otro lado, considerando la adición del sitio de reconocimiento para Factor Xa en el gen Tt7, se realizó un corte proteolítico con esta enzima para escindir la etiqueta de histidinas que agrega el vector **Tabla 9**. No obstante, el rendimiento disminuyó considerablemente (37 μ g/l de cultivo), por lo que se decidió analizar la estructura de HisrTt7 y comparar su actividad biológica con el péptido nativo Tt7, esperando encontrar actividad analgésica con HisrTt7.

Tabla 9. Comparación de rendimiento de los péptidos recombinantes HisrTt7 y rTt7.

Péptido	Purificación por afinidad a Ni (mg/l cultivo)	Purificación por RP-HPLC (mg/l cultivo)	Hidrólisis con Factor Xa y purificación RP-HPLC (mg/l cultivo)	% Recuperación (por l de cultivo)
HisrTt7	1.3 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	NA	66.3
rTt7	1.3 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.037 \pm 0.005	2.9

NA, no aplica

7.2.2.1. Caracterización estructural de HisrTt7

La estructura secundaria de Tt7 y HisrTt7 se determinó por dicroísmo circular (DC). El espectro DC muestra un arreglo conformacional tipo α/β para ambos péptidos, ya que se observa una señal de absorbancia mínima a 208 nm y otra a 222 nm, característica en moléculas con este arreglo estructural **Figura 16**.

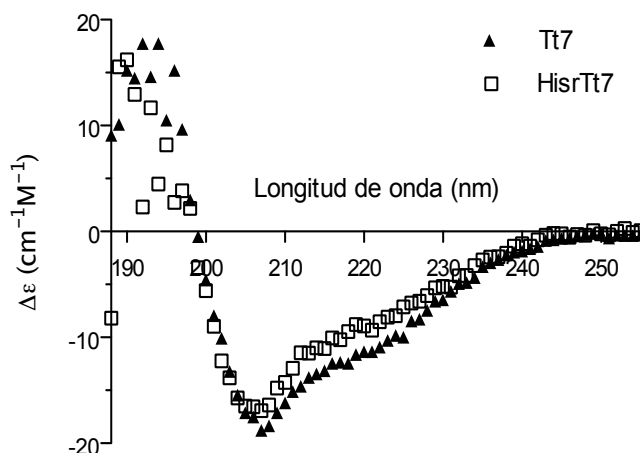


Figura 16. Espectro de dicroísmo circular de Tt7 y HisrTt7. Ensayo en 60% TFE a temperatura ambiente.

Los datos experimentales se analizaron a través del servidor K2D3 para la asignación del porcentaje estructural, en el caso de Tt7 se determinó un 57.7% de α -hélice y 16.6 % de hoja- β , mientras que para HisrTt7 los porcentajes asignados fueron de 62.6% α -hélice y 13.8% hoja- β . La estructura secundaria asignada concuerda con el modelo tridimensional propuesto en la **Figura 12**.

Para determinar el patrón de enlaces disulfuro de HisrTt7 se realizaron digestiones proteolíticas (con elastasa) del péptido oxidado y reducido, determinando las masas moleculares para cada una. La **Figura 17** muestra el empalme de los perfiles cromatográficos obtenidos por digestión enzimática, en azul se muestran las fracciones obtenidas del péptido oxidado y en rojo las fracciones obtenidas del péptido reducido. De esta manera se identificaron dos fracciones que aparecen en el cromatograma en azul (señaladas con flecha), y desaparecen en el cromatograma rojo. El análisis de masa molecular para ambas fracciones (1,999.52 Da y 1,564.01 Da) determinó que correspondían a fragmentos peptídicos unidos de manera covalente por cisteínas, estos datos se corroboraron por un análisis de digestión *in silico* mediante ProteinProspector en MS-Digest (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>), confirmando la masa molecular teórica para ambos fragmentos (1,999.18 y 1,564.75), concordante con la secuencia de aminoácidos. Este análisis nos permitió determinar el arreglo entre las cisteínas de HisrTt7 Cys1-Cys4 y Cys2-Cys3, concordante con el modelo propuesto para Tt7 y con el patrón de las antoxinas.

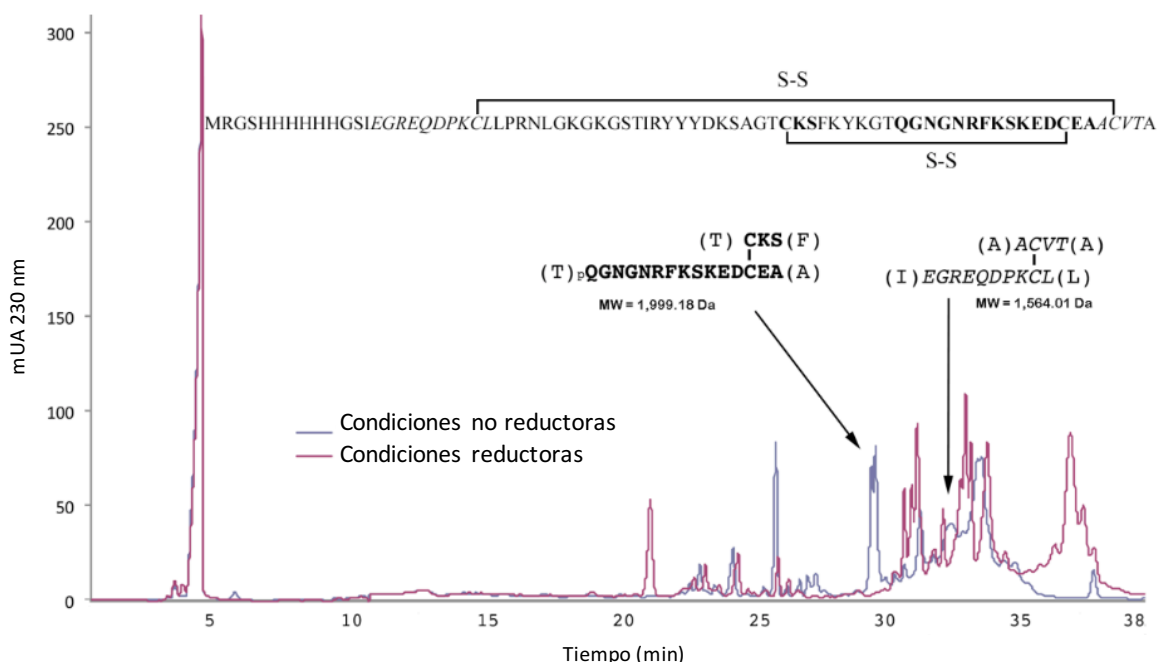


Figura 17. Empalme de cromatogramas obtenidos por digestión proteolítica de HisrTt7. Digestión con elastasa de HisrTt7 oxidado (azul) y reducido (rojo). Los fragmentos señalados se mantienen unidos por cisteínas aún después de la digestión (flecha). En la parte superior se muestra el patrón de unión asignado para los enlaces disulfuro.

7.3. Determinación de actividades biológicas *in vivo* e *in vitro* Tt7 y HisrTt7

7.3.1. Ensayo de inhibición de actividad enzimática de tripsina

Para conocer la relevancia funcional del motivo KGKGSXI presente en Tt7, identificado como posible inhibidor de tripsina **sección 7.1.6**, se realizó un ensayo de inhibición de actividad enzimática. Como base experimental sabemos que la reacción enzimática entre la tripsina con el sustrato BAPNA (N α -Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide), genera N α -Benzoyl-DL-Arginine y p-Nitroaniline, de los cuales el último componente produce un color amarillo característico con absorbividad a 405 nm **Figura 18**.

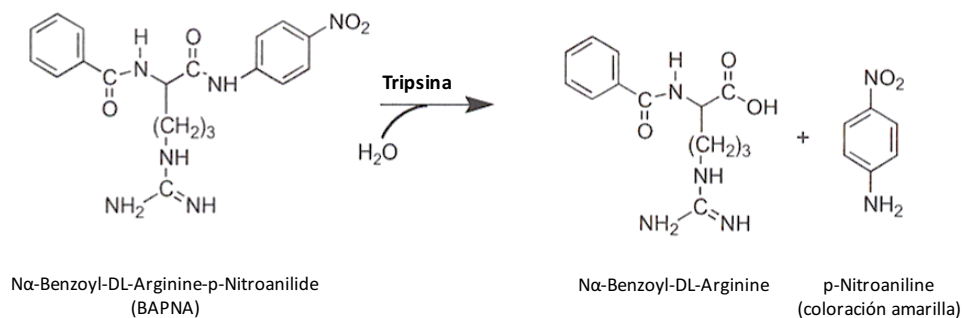


Figura 18. Mecanismo de reacción Tripsina frente a BAPNA. Los productos generados son N α -Benzoyl-DL-Arginine y p-Nitroaniline.

El experimento consistió en evaluar el efecto de Tt7 y HisrTt7 en presencia de tripsina, los cuales en principio podrían formar un complejo Tripsina-Inhibidor (Tripsina-Tt7 y Tripsina-HisrTt7), como ocurre con inhibidores comerciales como SBTI (*Soybean Trypsin Inhibitor*). De tal manera que la interacción de tripsina con sus inhibidores evitaría la formación del producto p-Nitroaniline, lo que se traduce en la ausencia de color amarillo con absorbancia a 405 nm.

En la **Figura 19** se observa en verde el efecto enzimático de la tripsina utilizando 33.3 $\mu\text{g/ml}$ (400 nM) en presencia del sustrato BAPNA (100 % de actividad), asimismo se muestra en rojo el efecto de la tripsina en presencia de BAPNA y de un inhibidor comercial (100 % de inhibición). En el caso de Tt7 se ensayó un máximo de 27 $\mu\text{g/ml}$ por ser la cantidad de material disponible (azul), con la cual no se observó ningún efecto de inhibición. De igual manera, al ensayar el péptido recombinante HisrTt7 en una cantidad equivalente y en exceso respecto al nativo (27 $\mu\text{g/ml}$ y 429 $\mu\text{g/ml}$), se obtuvo un efecto de actividad enzimática del 100%, permitiendo descartar a Tt7 como inhibidor de tripsina.

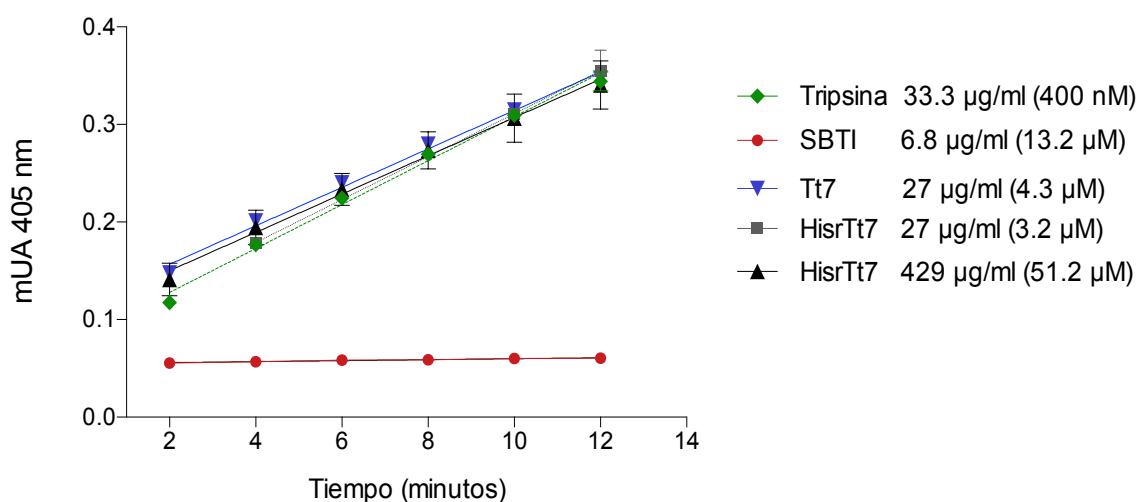


Figura 19. Ensayo de inhibición de tripsina para Tt7 y HisrTt7. Se cuantificó el producto generado p-Nitroaniline.

7.3.2. Evaluación por *Hot Plate* de Tt7, HisrTt7 y rTt7

Para determinar el efecto de las histidinas en el péptido recombinante, se decidió ensayar el péptido con la serie de histidinas (HisrTt7), así como el péptido recombinante sin histidinas (rTt7), incluyendo como control el péptido nativo (Tt7). En la prueba por *Hot Plate* se observa el efecto de Tt7 (0.5 mg/kg) a partir de los 30 min y hasta los 60 min, tendencia observada para el péptido sin histidinas rTt7. Sin embargo, en el caso de HisrTt7 podemos ver un efecto importante a partir de los 15 min, disminuyendo drásticamente a los 45 min **Figura 20**. La tendencia observada para HisrTt7 al no ser comparable con los péptidos Tt7 y rTt7, hace pensar que la serie de histidinas adicionales en el péptido recombinante tienen

alguna afinidad en los sistemas biológicos *in vivo*, resultado comparable con los ensayos *Patch clamp*. Esto se puede traducir como la capacidad de HisrTt7 para asociarse con otros nociceptores, pero por un tiempo relativamente corto.

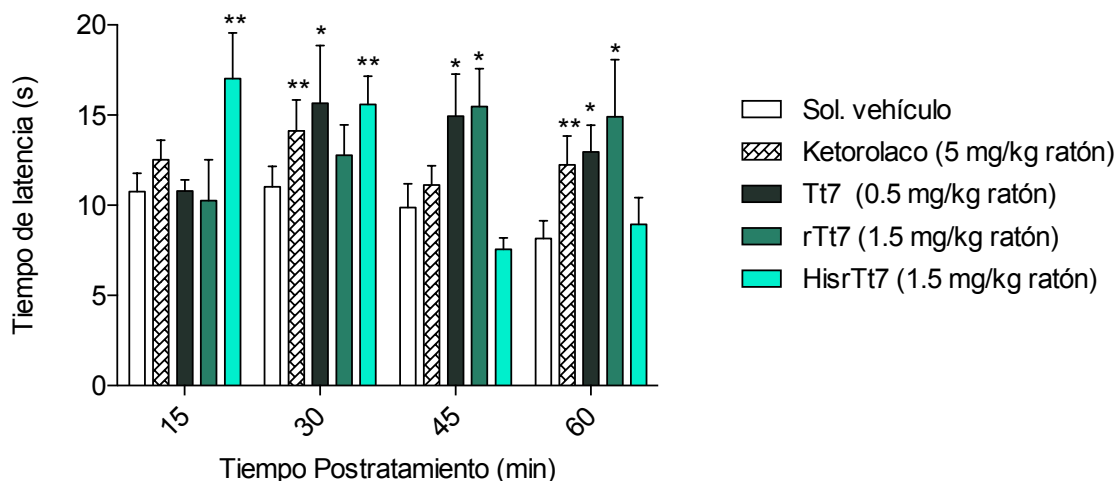


Figura 20. Ensayo de analgesia por Hot Plate de Tt7, rTt7 y HisrTt7. Comparación del efecto biológico del péptido nativo (Tt7), recombinante sin histidinas (rTt7) y recombinante con histidinas (HisrTt7). Administración vía intraperitoneal. ANOVA two-way, Bonferroni test, datos expresados como media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.025$ comparados con la solución vehículo (PBS); ratones CD1 machos, 18-20 g, Tt7 $n=6$, rTt7 $n=3$, PBS, Ketorolaco y HisrTt7 $n=14$.

7.3.3. Ensayos por *Patch clamp* de Tt7 y HisrTt7 en canales asociados a dolor

De acuerdo a la actividad de Tt7 sobre SNP (sección 7.1.4), y considerando que el blanco de las antoxinas apunta a los canales Na_v sensibles a tetrodotoxina (TTX-S), se eligió el subtipo $\text{Na}_v1.7$ para los ensayos electrofisiológicos (considerando que de los cinco canales Na_v vinculados a dolor, el subtipo $\text{Na}_v1.7$ es el único TTX-S y además se expresa en SNP). El péptido Tt7 se probó en concentraciones de 5 y 30 μM , observando un bloqueo del 7% al utilizar la concentración máxima **Figura 21a**. No obstante, el bloqueo no modifica la activación o inactivación del canal **Figura 21b**. En el caso de HisrTt7 se probaron concentraciones crecientes de 5, 15 y 50 μM , siendo la concentración máxima la que mostró un efecto de bloqueo de 76%. Además, se observó un corrimiento de HisrTt7 en el tiempo al pico (T_{peak} , tiempo que tardan en abrirse todos los canales), que fue significativamente mayor respecto a Tt7 ($\text{HisrTt7 } \Delta T_{\text{peak}}=0.32$, $\text{Tt7 } \Delta T_{\text{peak}}=0.04$), **Figura 21c**. Esto explica la activación de los canales a potenciales más positivos para HisrTt7 (-20 mV), respecto al control (-30 mV). Asimismo, la inactivación de los canales ocurre a potenciales más positivos, **Figura 21d**. Los ensayos por *Patch clamp* mostraron diferencias en términos electrofisiológicos de Tt7 y HisrTt7, por lo que el ensayo por *Hot plate* se volvió fundamental para evaluar las implicaciones de HisrTt7 en sistemas *in vivo*.

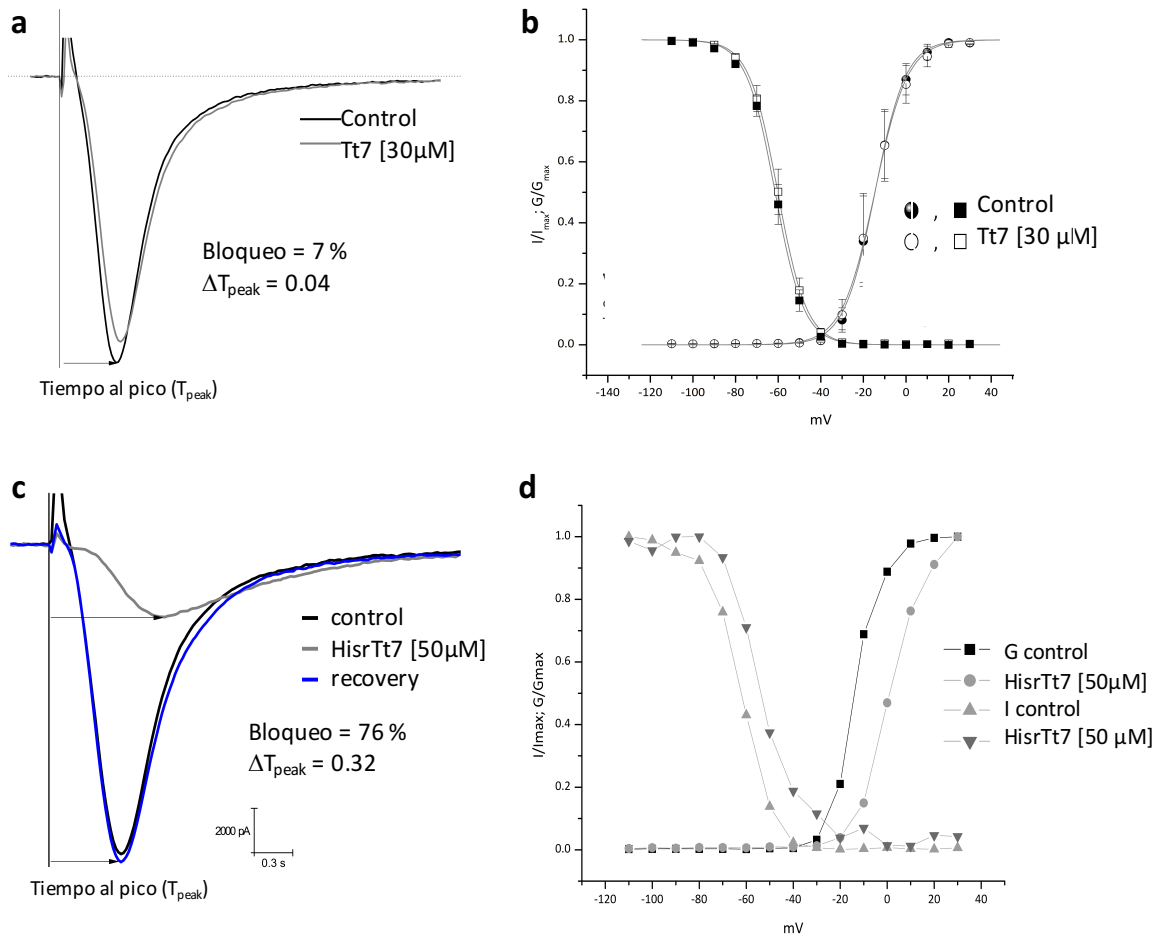


Figura 21. Ensayo por Patch clamp de Tt7 y HisrTt7 en CHO-hNa_v1.7. El registro de Tt7 30 μM (a) muestra un bloqueo de 7% (trazo gris), a diferencia del registro con HisrTt7 50 μM (c) que muestra con bloqueo del 76% (trazo gris). Se indica la diferencia en corrimiento del tiempo al pico en ambos casos (flecha). Las curvas de activación e inactivación con Tt7 (b) no se ven alteradas, en contraste con el efecto de HisrTt7 (d) cuya activación (círculos) e inactivación (triángulo invertido) del canal ocurre a potenciales más positivos (célula completa, n=4).

7.3.4. Ensayos de fluorescencia por imagenología de calcio en neuronas GRD

En colaboración con el Dr. Soto (BUAP) se llevaron a cabo registros con la técnica de Imagenología de Calcio para determinar el efecto de Tt7 sobre los cambios de fluorescencia de calcio producidos por cambios de pH extracelular en condiciones control (solución de alto potasio 20 mM) y en presencia de Tt7 **Figura 22**.

Los ensayos de fluorimetría con 100 nM de Tt7 muestran un efecto inhibitorio de las corrientes ASIC en neuronas GRD con respecto al control positivo. El porcentaje de bloqueo de corriente observado fue de 76.4 % ± 1.4 %, sugiriendo como posibles blancos de acción los canales ASIC relacionados con la percepción del dolor, tales como ASIC 3, ASIC 2b+3, ASIC 1b+3 ó ASIC 1a+3. Finalmente, el efecto de recuperación de las células después de la

perfusión con solución ácida, pH 6.1, indicaría que el efecto de Tt7 sobre las corrientes generadas en canales sensibles a ácido serían reversibles.

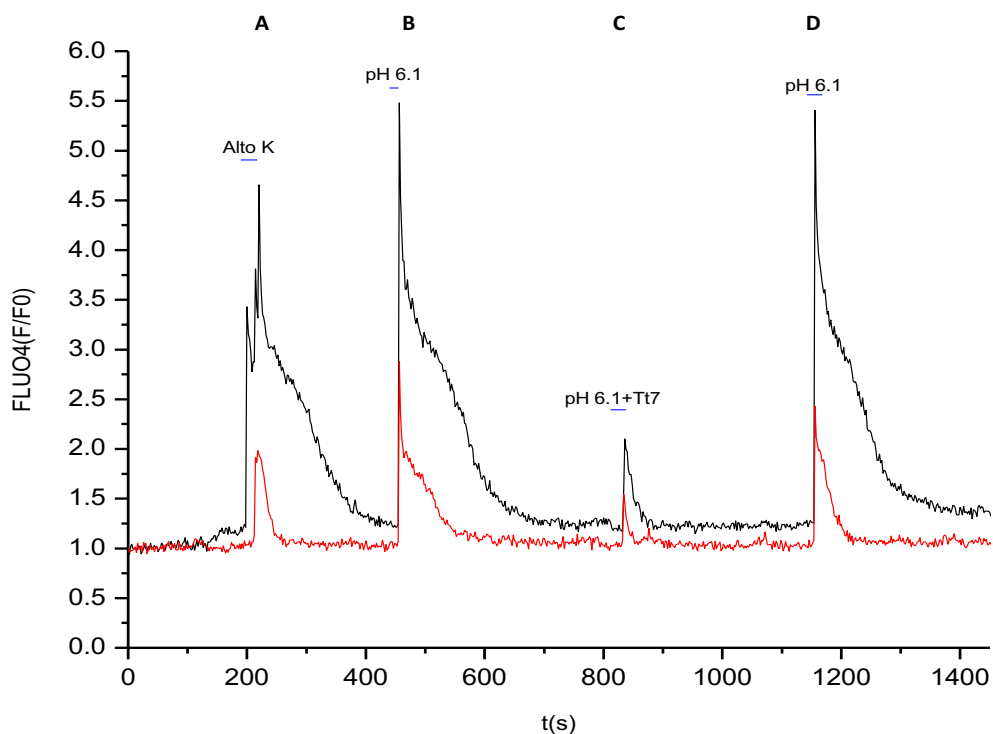


Figura 22. Ensayo fluorimétrico por imagen de calcio de Tt7 sobre neuronas GRD. Los trazos de la gráfica representan los registros de dos células (rojo y negro) ensayadas bajo las mismas condiciones. A) Solución con alto potasio (20 mM), B) solución extracelular, pH 6.1 (control), C) efecto de 100 nM de Tt7 en solución extracelular, pH 6.1, D) efecto de recuperación de las neuronas después de lavar con la solución extracelular, pH 6.1 (neuronas totales ensayadas=6).

7.3.5. Modelo de nociceptores relacionados con Tt7

De acuerdo a los resultados sobre la actividad biológica de Tt7 podemos descartar al canal $Na_v1.7$ como su blanco de acción. Sin embargo, los ensayos por *Hot Plate* nos permitieron señalar a los nociceptores activados por calor extremo (55 °C), como posibles blancos moleculares. Asimismo, podemos proponer la señalización de Tt7 a través de nociceptores activados por protones, como ocurre frente estímulos que generan acidosis tisular. En la siguiente imagen se muestran algunos canales que podrían estar involucrados en el mecanismo de acción de Tt7 **Figura 23**.

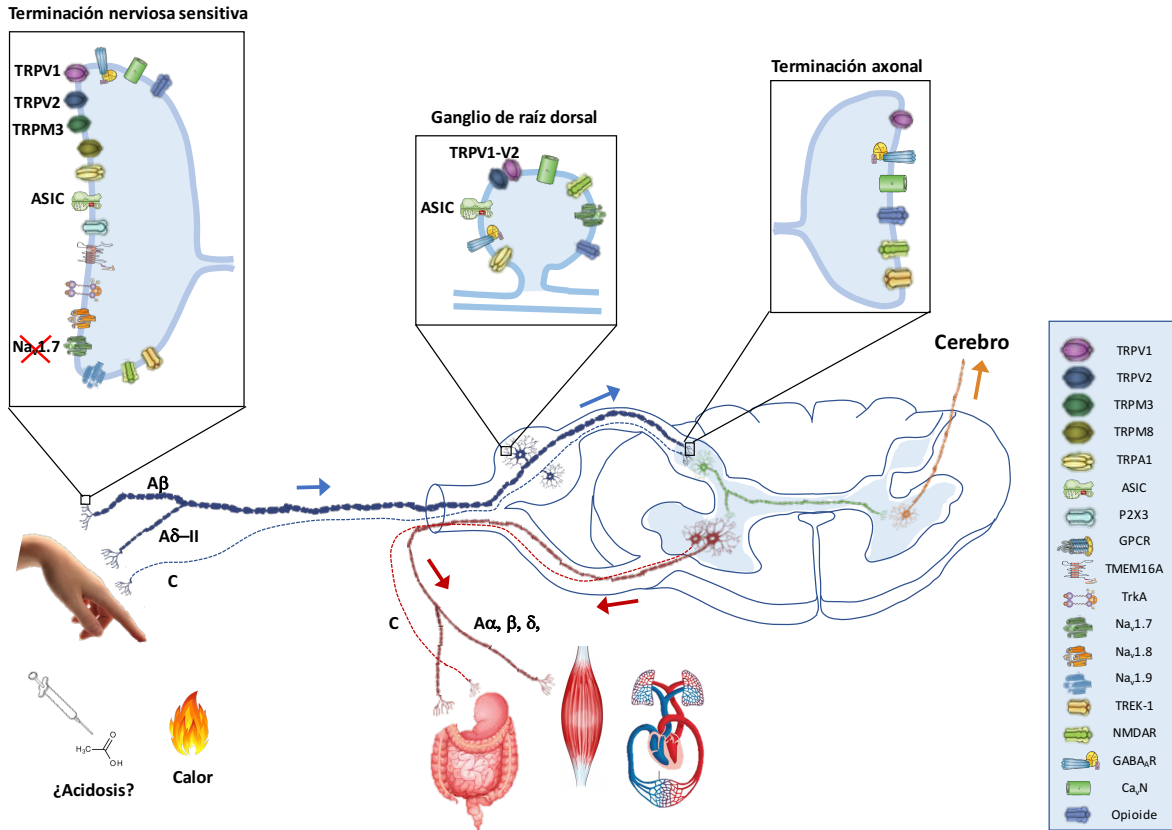


Figura 23. Posibles nociceptores implicados con la actividad analgésica de Tt7. Se ejemplifica la vía de señalización de dolor aplicando un estímulo térmico simulando el modelo de Hot Plate. Inicia con la activación de las neuronas aferentes, fibras Aβ y Aδ-II (azul), activando a su vez a la interneurona (verde), que transmite la señal al cerebro por el haz neoespinalámico (amarillo), o bien, transmitiendo la señal hacia las neuronas eferentes (rojo). Sin embargo, si el estímulo provocara acidosis tisular o inflamación la señalización del dolor sería por el haz paleoespinalámico, activado por las fibras C. A la derecha se hace referencia de algunos nociceptores que se expresan en las terminales nerviosas sensitivas, en el ganglio dorsal o en las terminaciones axonales. En el inset a la izquierda, se indican los receptores activados frente a calor extremo (TRPV1, TRPV2 y TRPM3), así como aquellos activados frente a cambio de pH (ASIC), que en un escenario "in vivo" este efecto ocurriría por acidosis tisular. Asimismo, se indica el canal sobre el cual Tt7 no presentó efecto en los ensayos de electrofisiología (Na_v1.7). En el inset central se muestran los canales que podrían estar relacionados con Tt7, que de acuerdo con los ensayos de fluorimetría con calcio serían los canales ASIC, y concordante con los ensayos de Hot Plate podría ser TRPV1, TRPV2 ó la forma en heterodímero TRPV1-V2.

8. Discusión

Considerando la demanda por identificar nuevos componentes con alta potencia analgésica sobre diferentes tipos de dolor, pero cuyos efectos secundarios sean menores respecto a otros agentes comerciales como Celebrex, Vioxx o Bextra (con riesgos cardiacos asociados)⁹⁹, se realizó la búsqueda de péptidos con esta actividad biológica a partir de la secreción de piel de diferentes anfibios (salamandras, cecillas y ranas). Desafortunadamente, para salamandras obtuvimos cantidades mínimas de secreciones, a diferencia de otros reportes donde obtienen entre 1-13 mg/individuo mediante estimulación eléctrica⁸¹, mientras que nosotros obtuvimos cantidades <0.01 mg/individuo mediante la aplicación de un estímulo químico, lo cual refleja la eficiencia de otros sistemas de estimulación con respecto al que utilizamos.

Para la cecilia la cantidad de secreciones fue mucho mejor (0.4 mg/individuo) en relación a las obtenidas con las salamandras, permitiéndonos realizar la separación de los componentes peptídicos y protéicos mediante rpHPLC, aunque con concentraciones mínimas por cada fracción. Por ello el ensayo de analgesia se realizó con la secreción total de piel, pero con resultados negativos en esta prueba, con la cantidad ensayada.

En el caso particular de la rana *T. typhonius* se sabía de su gran capacidad para producir secreciones de piel con el mínimo contacto con ella, permitiendo obtener cantidad de material suficiente para la búsqueda e identificación de componentes bioactivos. De las dos fracciones obtenidas con actividad analgésica (7 y 25), sólo se realizó la caracterización del componente peptídico (fracción 7), ya que de acuerdo a los resultados preliminares por *Hot plate*, Tt7 actúa sobre SNP y SNC lo que implicaría la presencia de un receptor a nivel periférico y otro a nivel central, o bien un mismo receptor que se exprese en ambas regiones. Por otro lado, el hecho de que la proteína identificada (fracción 25), tuviera un menor rango de acción (solo en SNC), podría estar relacionado por la baja afinidad sobre algún nociceptor, indicando la probabilidad de tener otros blancos moleculares y por quizá otras funciones biológicas primarias.

En este trabajo se logró caracterizar un péptido de 6510 Da, siendo el primer componente con actividad antinociceptiva identificado en un anfibio del Nuevo Mundo, denominado Tt7. El péptido Tt7 mostró similitud con péptidos analgésicos de la familia antoxina, los cuales han sido identificados solamente en ranas asiáticas (*H. annectans* y *H. simplex*), hasta el momento^{45,73}.

Tanto *T. typhonius* como el género *Hyla* pertenecen a la superfamilia Hyloidea, en la cual se incluyen los grupos Dendrobatidae y Phyllomedusinae como ancestros a *Trachycephalus* e *Hyla*¹⁰⁰. En orden cronológico aparecen primero los dendrobatidos, que resaltan por las toxinas que secretan de su piel en forma de alcaloides con blanco sobre canales iónicos activados por voltaje⁷⁵. Posteriormente, surgen las *Phyllomedusas* que son capaces de secretar tanto componentes tóxicos (semejantes a las toxinas de dendrobátidos),



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

como analgésicos peptídicos (con acción sobre receptores de tipo opioide). Subsecuente a estos dos grupos aparece la rana *T. typhonius* que además de presentar un componente tóxico de tipo protéico (de alrededor de 50 kDa, datos no publicados), presentó un componente antinociceptivo similar al que aparece en dos ranas asiáticas *Hyla*, que corresponde al grupo más reciente en la filogenia de hylidos.

De acuerdo a los datos taxonómicos y bioquímicos encontrados en los cuatro grupos (Dentrobatidae, Phyllomedusinae, *Trachycephalus* e *Hyla*), los tres primeros corresponden a ranas exclusivas en América, mientras que *Hyla* resulta un género cosmopolita, pero cuyas especies *H. annectans* y *H. simplex* se ubican únicamente en Asia (sitio web: Amphibiaweb). Resulta interesante la prevalencia de moléculas tóxicas en ranas de diferentes continentes, mientras que para el caso de Tt7 y antoxinas podrían pensarse como resultado de convergencia evolutiva. Aunque Tt7 no presentó efectos de intoxicación con las dosis ensayadas en ratones, sería necesario considerar ensayos dosis-respuesta para evaluar posibles efectos secundarios, como ocurre con antoxina a dosis elevadas o con otros fármacos⁷³. Asimismo, sería interesante la caracterización bioquímica de ranas mexicanas *Hyla*, en busca de componentes bioactivos tipo antoxinas.

Como parte del análisis biológico de Tt7 se requirió una producción mayor del péptido optando por los sistemas de síntesis química y expresión heteróloga, una reproducibilidad excelente en ambos métodos. No obstante, por síntesis química existe una limitante con el rendimiento final, a mayor tamaño de péptido menor pureza. A diferencia del proceso de expresión heteróloga, donde se logró un rendimiento considerablemente superior (1 mg/litro), respecto a las alcanzadas al sintetizar el péptido químicamente (4 µg/mg de producto crudo). Sin duda en este trabajo se demuestra una vez más que el método de expresión heteróloga es más conveniente para péptidos grandes (> 50 residuos).

La expresión del péptido recombinante Tt7 sin histidinas (rTt7), y su efecto en el modelo de dolor agudo por *Hot plate*, confirmó su acción antinociceptiva comparable con la obtenida por el péptido nativo Tt7. Aunque se esperaría un efecto nociceptivo mayor de rTt7 frente a Tt7, por el incremento de la dosis del péptido recombinante (1.5 mg/kg) respecto al nativo (0.5 mg/kg), los tiempos de latencia fueron similares en ambos casos. Esta respuesta podría deberse a un efecto techo de Tt7, donde el aumento de la dosis no representa un mayor efecto analgésico, como ocurre frecuentemente con los AINE³³. Por otro lado, HisrTt7 también mostró un efecto antinociceptivo, pero con un corrimiento en la respuesta de analgesia, más temprano respecto al comportamiento de Tt7 y rTt7. Correlacionando el efecto observado de HisrTt7 en *Hot Plate* con los resultados obtenidos en *Patch clamp* del canal Na_v1.7, podría pensarse que las histidinas presentan un efecto de bloqueo *in vivo* sobre ciertos nociceptores, pero que no necesariamente son los blancos moleculares de Tt7. Aunque las histidinas no modifican sustancialmente la estructura de Tt7, existen reportes donde indican que la presencia de una serie de histidinas (como en HisrTt7), puede interferir de manera importante con la actividad biológica^{101,48}, ya que estos residuos extra podrían actuar

como un inhibidor competitivo del blanco molecular de Tt7, o bien podrían interactuar con otros receptores.

Con objeto de identificar los mecanismos de acción de Tt7 se continuó con su caracterización, encontrando relación estructural con las antoxinas y con un péptido de alacrán llamado LmKTT-1a, la semejanza entre estos péptidos permitió encontrar dos motivos conservados en estas secuencias. El primer motivo corresponde a un sitio de interacción con tripsina, lo que le permitiría actuar como inhibidor de esta enzima. En este sentido, pese a que LmKTT-1a se describe como un componente tóxico, también ha mostrado una función alterna como inhibidor de tripsina (K_i de $0.025 \mu\text{M}$), al igual que la antoxina (K_i de $0.140 \mu\text{M}$)^{73,102}. Por el contrario, aunque Tt7 presentó un sitio de interacción con tripsina (KGKGSXI) no mostró esta actividad biológica, lo que hace pensar que la conformación tridimensional de Tt7 ejerce una modificación importante sobre el sitio de inhibición de tripsina¹⁰³.

El segundo motivo corresponde a tres residuos aromáticos ubicados en la posición 22 a 24 de Tt7, el cual se ha observado en péptidos relacionados a Tt7 y que además presentan un arreglo tipo Kunitz. Si los péptidos con estructura Kunitz representan diferentes moléculas bioactivas, pero no todas estas moléculas tienen función antinociceptiva, entonces podríamos pensar que la ocurrencia del triplete es indispensable para el arreglo estructural más que para definir alguna actividad biológica específica (antinociceptivo, inhibidor de tripsina, toxina, etc.). Además, es importante señalar la posición de este triplete de aromáticos al centro de las moléculas, lo cual impide que estén relacionados directamente con la interacción sobre receptores o enzimas.

El arreglo de Tt7 como tipo Kunitz permitió relacionarlo con antoxinas (péptidos de rana), LmKTT-1a (toxina de alacrán), APETx2 (péptido de anémona) y α -dendrotoxina (toxina de serpiente), entre otras moléculas^{19,73,104}. Por ejemplo, se sabe del efecto de antoxinas sobre canales Na_v TTX-S en neuronas de GRD con IC_{50} de $3.4 \mu\text{M}$ ⁷³, lo que ayudó a proponer ensayos para evaluar el efecto de Tt7 sobre canales Na_v . Sin embargo, debido a que sólo se demostró una actividad biológica mínima sobre $\text{Na}_v1.7$, sería interesante evaluar otros subtipos de Na_v relacionados a dolor ($\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.8$). Por otro lado, LmKTT-1a actúa como bloqueador de K_v 1.3 con IC_{50} de $1.58 \mu\text{M}$, además de tener un efecto mínimo sobre K_v 1.1 y K_v 1.2¹⁰², esto apoyaría la idea de evaluar el efecto de Tt7 sobre estos canales.

Como lo demuestran los ensayos por *Patch clamp* el blanco de Tt7 corresponde a un nociceptor diferente a $\text{Na}_v1.7$. Considerando la relación estructural con APETx2 y α -dendrotoxina se podría sugerir otros blancos de acción para Tt7. En el caso de APETx2 se ha determinado su afinidad sobre canales ASIC3 (IC_{50} de 63 nM), ASIC 2b+3 (IC_{50} de 117 nM), ASIC 1b+3 (IC_{50} de $0.9 \mu\text{M}$) y ASIC 1a+3 (IC_{50} de $2 \mu\text{M}$)¹⁹. Asimismo, para α -dendrotoxina se determinó actividad sobre canales ASIC en cultivos con GRD con una IC_{50} de $0.8 \mu\text{M}$ ¹⁰⁵. De acuerdo a los resultados obtenidos por fluorimetría mediante imagen de calcio, podríamos pensar que Tt7 tiene afinidad sobre un nociceptor de la familia ASIC¹⁰⁵. Sin embargo,

considerando que el estímulo que se utilizó en los experimentos in vivo (calor extremo), sería factible pensar en nociceptores que se activen sólo con calor, o bien en nociceptores polimodales. Por ejemplo, algunos de la familia TRPV y TRPM. De TRPV1 se sabe que se activa frente a acidosis tisular, y en presencia de estímulos térmicos superiores a los 42 °C²¹. Además, se expresa en neuronas aferentes de tipo nociceptivo y en neuronas en el cerebro, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por *Hot Plate* al inyectar Tt7 vía intracraneal. Por ello, sería interesante hacer una evaluación del efecto de Tt7 en canales TRPV.

9. Conclusiones

- Se obtuvo una fracción de la secreción de piel de la rana *T. typhonius* con actividad analgésica evaluada por vía de administración intraperitoneal e intracraneal (0.5 mg/kg y 0.1 mg/kg, respectivamente).
- El componente analgésico de naturaleza peptídica (Tt7) consta de 59 aa y 4 cisteínas formando dos puentes disulfuro.
- Este es el primer reporte de una antoxina en un anfibio americano.
- Se logró la expresión heteróloga del péptido Tt7 (HisrTt7) en pQE-30 en la cepa Origami.
- El péptido recombinante HisrTt7 conservó la misma estructura secundaria del péptido nativo y un arreglo de uniones disulfuro Cys1-Cys4, Cys2-Cys3.
- El péptido Tt7, así como sus similares recombinantes, tuvieron un efecto analgésico en un modelo de dolor térmico agudo.
- Los péptidos recombinantes HisrTt7 y rTt7 tuvieron actividad biológica en la prueba *Hot Plate* administrando 1.5 mg/kg, mientras que con el péptido nativo se demostró actividad analgésica a partir de 0.5 mg/kg.
- La falta de inhibición sobre la actividad de tripsina de Tt7 puede deberse al reemplazo de T20I y al cambio conformacional de la estructura terciaria de Tt7.
- Se identificó que péptido Tt7 puede tener su actividad analgésica por bloqueo de los canales ASIC.



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.

10. Perspectivas

- Con efecto de aumentar la secreción de piel de salamandras, sería conveniente el uso de la estimulación eléctrica, como se ha visto en otros reportes con estos animales.
- Para el caso de las secreciones de la cecilia sería interesante hacer los ensayos en modelos que permitan evaluar otro tipo de dolor (formalina, coletazo, contracciones abdominales, etc.), o bien, realizar ensayos con dosis mayores (p. ej. 0.5 mg/kg por fracción).
- Considerando los ensayos de imagen de calcio sería ideal realizar pruebas electrofisiológicas en canales ASIC3, ASIC 2b+3, ASIC 1b+3 y ASIC 1a+3, los cuales están involucrados en la percepción del dolor de alto umbral. Asimismo, se sabe que los canales ASIC 1a+2a, ASIC 1a+2b, están involucrados en nocicepción cutánea y central, por lo que podrían ser receptores interesantes a evaluar.
- De acuerdo con el tipo de estímulo aplicado en los experimentos *in vivo*, sería importante evaluar el efecto de Tt7 sobre los canales TRPV1 y TRPV2, los cuales se activan frente a calor por arriba de 50 °C.
- Resulta fundamental evaluar Tt7 en otros modelos de analgesia relacionados a dolor inflamatorio y acidosis tisular, como la prueba de formalina o por inducción de contracciones abdominales, ya que se sabe que los canales ASIC se activan frente a este tipo de estímulo.
- Sería interesante evaluar el motivo estructural de triple tirosinas identificado en Tt7, así como el motivo de interacción con tripsina (KGKGSXI), mediante mutación dirigida de residuos específicos (p. ej el cambio de KGKGSXI por KGKGSXT).



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

11. Referencias

1. Hall, J. E. *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. (Elsevier Health Sciences, 2011).
2. Cabrera Valencia, J. Fisiopatología del dolor. *Diagnostico* **46**, 1–14 (2007).
3. Squire, L. R. *et al. Fundamental Neuroscience*. (Academic Press, 2002).
4. Puebla, F. Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico. *Oncol.* **28**, 139–43 (2005).
5. Cáceres Graziani, E. & Castro, O. Manejo del Dolor Moderado a Severo. *Foro de Investigación y Tratamiento del Dolor para la Comunidad Médica* **6**, 15–20 (1990).
6. Zhao, G.-M. *et al.* Profound spinal tolerance after repeated exposure to a highly selective μ -opioid peptide agonist: role of δ -opioid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 188–196 (2002).
7. Neilan, C. L., Nguyen, T. M., Schiller, P. W. & Pasternak, G. W. Pharmacological characterization of the dermorphin analog [Dmt¹]DALDA, a highly potent and selective μ -opioid peptide. *Eur. J. Pharmacol.* **419**, 15–23 (2001).
8. Schiller, P. W. Opioid peptide-derived analgesics. *AAPS J.* **7**, 560–5 (2005).
9. Lopez Forniés, A., Iturralde García de Diego, F., Clerencia Sierra, M. & Galindo Ortiz de Landázuri, J. Dolor. *Tratado Geriátria para Resid.* **capítulo 7**, 721–731 (2013).
10. Timoneda, F. L. *Definición y clasificación del dolor. Clínicas Urológicas de la Complutense.* **4**, 49-55 (1996).
11. Hannon, H. E. & Atchison, W. D. Omega-conotoxins as experimental tools and therapeutics in pain management. *Mar. Drugs* **11**, 680–699 (2013).
12. Catafau Serra, J. M. *Tratado de dolor neuropático*. (Médica Panamericana, 2006).
13. Oaklander, A. L. Dor Crónica. *ACP Med.* 1–19 (2011).
14. Benarroch, E. E. Canales iónicos en nociceptores. *Neurology* **84**, 31–42 (2015).
15. Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S. & Brooks, H. L. *Ganong, Fisiología Médica*. (McGrawHill, 2010).
16. Osteen, J. D. *et al.* Selective spider toxins reveal a role for Na_v1.1 channel in mechanical pain. *Nature* **534**, 494–499 (2016).
17. Lingueglia, E. & Lazdunski, M. Pharmacology of ASIC channels. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **2**, 155–171 (2013).
18. Sherwood, T. W., Lee, K. G., Gormley, M. G. & Askwith, C. C. Heteromeric ASIC channels composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *J. Neurosci.* **31**, 9723–9734 (2011).
19. Diochot, S. *et al.* A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* **23**, 1516–1525 (2004).
20. Baron, A. *et al.* Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon* **75**, 187–204 (2013).
21. Holzer, P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 1145–62 (2008).
22. Pottosin, I. *et al.* Mechanosensitive Ca²⁺-permeable channels in human leukemic cells: Pharmacological and molecular evidence for TRPV2. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 51–59 (2015).
23. Baron, R. *et al.* *Handbook of Experimental Pharmacology. The American Journal of The Medical Sciences* **194**, (2004).



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

24. Krugel, U., Strauba, I., Beckmanna, H. & Schaefer, M. Primidone inhibits TRPM3 and attenuates thermal nociception *in vivo*. *Pain* **158**, 856–867 (2017).
25. Kennard, L. E. *et al.* Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 821–829 (2005).
26. Terada, Y. *et al.* Activation and Inhibition of Thermosensitive TRP Channels by Voacangine, an Alkaloid Present in *Voacanga africana*, an African Tree. *J. Nat. Prod.* **77**, 285–297 (2014).
27. Bagal, S. K. *et al.* Voltage gated sodium channels as drug discovery targets Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. **6950**, 360–366 (2015).
28. Clare, J. J. Targeting voltage-gated sodium channels for pain therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 45–62 (2010).
29. Ford, A. P. In pursuit of P2X3 antagonists: Novel therapeutics for chronic pain and afferent sensitization. *Purinergic Signal.* **8**, 3–26 (2012).
30. Jordan, B. & Devi, L. A. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction Identification of opioid binding sites. *Br. J. Anaesth.* **81**, 12–19 (1998).
31. Nieto, F. R. *et al.* Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain. *Mar. Drugs* **10**, 281–305 (2012).
32. Freeman, R. New and developing drugs for the treatment of neuropathic pain in diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **13**, 500–508 (2013).
33. Organización Mundial de la Salud. Formulario Modelo de la OMS. 507 (2004).
34. Hernández-Delgadillo, G. P. & Cruz, S. L. Mecanismos de tolerancia analgésica a los opioides. *Salud Ment.* **28**, 22–31 (2005).
35. Kane, B. E., Svensson, B. & Ferguson, D. M. Molecular recognition of opioid receptor ligands. *AAPS J.* **8**, E126-37 (2006).
36. Mansour, a *et al.* Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* **350**, 412–438 (1994).
37. Gago Calderón, B. Interacción de los receptores dopaminérgicos D4 y opioides tipo μ en el estriado: implicación en la fase inicial del consumo de morfina. *Tesis Doctoral* (Universidad de Málaga, 2007).
38. Dhawan, B. N. *et al.* International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.* **48**, 567 LP-592 (1996).
39. Selley, D. E., Sim, L. J., Xiao, R., Liu, Q. & Childers, S. R. μ -Opioid Receptor-Stimulated Guanosine-5'-O-(γ -thio)-triphosphate Binding in Rat Thalamus and Cultured Cell Lines: Signal Transduction Mechanisms Underlying Agonist Efficacy. *Mol. Pharmacol.* **51**, 87 LP-96 (1997).
40. Flórez, J. Fármacos analgésicos opioides. *Farmacol. humana* 523–542 (2008).
41. Vanegas, H. & Schaible, H. G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog. Neurobiol.* **64**, 327–363 (2001).
42. Barraza Garza, G. *Búsqueda y caracterización de fracciones peptídicas con propiedades analgésicas en venenos de arañas. Tesis de Maestría.* (UNAM, 2010).
43. Klint, J. K. *et al.* Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: Pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon* **60**, 478–491 (2012).
44. Essack, M., Bajic, V. B. & Archer, J. A. C. Conotoxins that Confer Therapeutic Possibilities. *Mar. Drugs* **10**, 1244–1265 (2012).
45. Wei, L. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory effects of the amphibian neurotoxin, anntoxin. *Biochimie* **93**, 995–1000 (2011).

46. Wu, J. *et al.* Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. *J. Proteome Res.* **10**, 4230–4240 (2011).
47. Yang, S. *et al.* Discovery of a selective Na_v1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17534–9 (2013).
48. Israeli, E. Capsule: Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Isr. Med. Assoc. J.* **14**, 762 (2012).
49. Diochot, S. Pain Modulating Peptides in Spider Venoms: Good and Evil. in *Spider Venoms-Toxinology* (ed. Springer) 121–157 (2015).
50. Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I. & Christie, M. J. Conus venom peptide pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **64**, 259–98 (2012).
51. McIntosh, M., Cruz, L. J., Hunkapiller, M. W., Gray, W. R. & Olivera, B. M. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **218**, 329–334 (1982).
52. Stevens, M., Peigneur, S. & Tytgat, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front. Pharmacol.* **2**, 1–13 (2011).
53. McGivern, J. G. Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **3**, 69–85 (2007).
54. Hayek, S. M., Hanes, M. C., Wang, C. & Veizi, I. E. Ziconotide combination intrathecal therapy for noncancer pain is limited secondary to delayed adverse effects: A case series with a 24-month follow-up. *Neuromodulation* **18**, 397–403 (2015).
55. Vitt, L. J. & Caldwell, J. P. *Herpetology. An introductory biology of amphibians and reptiles. Journal of Chemical Information and Modeling* **53**, (Elsevier Inc., 2009).
56. Toledo, R. C. & Jared, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* **111**, 1–29 (1995).
57. Brodie, E. D. Toxins and venoms. *Curr. Biol.* **19**, R931–R935 (2009).
58. Godoy, L., Ortiz, L., Teibler, P. & Acosta, O. *Toxicidad de la secreción de glándulas parotidas en sapo.* (2005).
59. Daly, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9–13 (1995).
60. Daly, J. W. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. *J. Nat. Prod.* **61**, 162–172 (1998).
61. Clarke, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **72**, 365–79 (1997).
62. Daly, J. & Witkop, B. Batrachotoxin, an Extremely Active Cardio- and Neurotoxin from the Colombian Arrow Poison Frog *Phyllobates Aurotaenia*. *Clin. Toxicol.* **4**, 331–342 (1971).
63. Bailey, P. S. & Bailey, C. A. *Química orgánica. Conceptos y aplicaciones.* (Prentice Hall, 1998).
64. Bevins, C. L. & Zasloff, M. Peptides from frog skin. *Annu. Rev.* **59**, 395–414 (1990).
65. Negri, L., Lattanzi, R. & Melchiorri, P. Production of antinociception by peripheral administration of [Lys7]dermorphin, a naturally occurring peptide with high affinity for μ -opioid receptors. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 57–66 (1995).
66. Meneses, E. P. *et al.* Peptidomic analysis of the skin secretions of the frog *Pachymedusa dacnicolor*. *Amino Acids* **40**, 113–122 (2011).
67. Erspamer, V., Erspamer, G. F. & Cei, J. M. Active peptides in the skins of two hundred

- and thirty American amphibian species. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* **85**, 125–137 (1986).
68. Kronenberg, H. M., Melmed, S., Polonsky, K. & Larsen, R. *Williams Tratado de Endocrinología*. (Elsevier Saunders, 2009).
 69. Anastasi, A. *et al.* Structure and pharmacological actions of phyllocaerulein, a caerulein-like nonapeptide: its occurrence in extracts of the skin of *Phyllomedusa sauvagei* and related *Phyllomedusa* species. *Br. J. Pharmacol.* **37**, 198–206 (1969).
 70. Kastin, A. *Handbook of Biologically Active Peptides*. (2006).
 71. Sheafor, B., Davidson, E. W., Parr, L. & Rollins-Smith, L. Antimicrobial Peptide Defenses in the Salamander, *Ambystoma Tigrinum*, Against Emerging Amphibian Pathogens. *J. Wildl. Dis.* **44**, 226–236 (2008).
 72. Jilek, A., Mollay, C., Lohner, K. & Kreil, G. Substrate specificity of a peptidyl-aminoacyl-L/D-isomerase from frog skin. *Amino Acids* **42**, 1757–1764 (2012).
 73. You, D. *et al.* The first gene-encoded amphibian neurotoxin. *J. Biol. Chem.* **284**, 22079–22086 (2009).
 74. Mebs, D. & Pogoda, W. Variability of alkaloids in the skin secretion of the European fire salamander (*Salamandra salamandra terrestris*). *Toxicon* **45**, 603–606 (2005).
 75. Daly, J. W., Spande, T. F. & Garraffo, H. M. Alkaloids from amphibian skin: A tabulation of over eight-hundred compounds. *J. Nat. Prod.* **68**, 1556–1575 (2005).
 76. Schwartz, E. N., Schwartz, C. a, Sebben, a, Largura, S. W. & Mendes, E. G. Indirect cardiotoxic activity of the caecilian *Siphonops paulensis* (Gymnophiona, Amphibia) skin secretion. *Toxicon* **37**, 47–54 (1999).
 77. Schwartz, E. F., Stucchi-Zucchi, A., Schwartz, C. A. & Salomão, L. C. Skin secretion of *Siphonops paulensis* (Gymnophiona, Amphibia) forms voltage-dependent ionic channels in lipid membranes. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **36**, 1279–1282 (2003).
 78. Conceição, K. *et al.* Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Toxicon* **49**, 1054–1062 (2007).
 79. Chen, T. *et al.* Granular gland transcriptomes in stimulated amphibian skin secretions. *Biochem. J.* **371**, 125–130 (2003).
 80. Wang, L. *et al.* Novel dermaseptin, adenoregulin and caerin homologs from the Central American red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*, revealed by functional peptidomics of defensive skin secretion. *Biochimie* **90**, 1435–1441 (2008).
 81. Cardall, B. L., Brodie, E. D., Brodie, E. D. & Hanifin, C. T. Secretion and regeneration of tetrodotoxin in the rough-skin newt (*Taricha granulosa*). *Toxicon* **44**, 933–938 (2004).
 82. Villa-Hernández, O. *et al.* Novel antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the Mexican frog *Hyla eximia*. *Protein & Peptide Letters* **16**, 1371–1378 (2009).
 83. Erspamer, V. *et al.* Pharmacological studies of ‘sapo’ from the frog *Phyllomedusa bicolor* skin: A drug used by the Peruvian Matses Indians in shamanic hunting practices. *Toxicon* **31**, 1099–1111 (1993).
 84. Broccardo, M. *et al.* Pharmacological Data on Dermorphins, a New Class of Potent Opioid Peptides From Amphibian Skin. *Br. J. Pharmacol.* **73**, 625–631 (1981).
 85. Richter, K. *et al.* cDNAs encoding [D-Ala₂]deltorphin precursors from skin of *Phyllomedusa bicolor* also contain genetic information for three dermorphin-related opioid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4836–4839 (1990).
 86. Barra, D. *et al.* [d-Leu₂]Deltorphin, a 17 amino acid opioid peptide from the skin of the Brazilian hyliid frog, *Phyllomedusa burmeisteri*. *Peptides* **15**, 199–202 (1994).

87. Kisara, K. *et al.* Dermorphin analogues containing D-kyotorphin: structure-antinociceptive relationships in mice. *Br. J. Pharmacol.* **87**, 183–189 (1986).
88. Wechselberger, C., Severini, C., Kreil, G. & Negri, L. A new opioid peptide predicted from cloned cDNAs from skin of *Pachymedusa dactylosa* and *Agalychnis annae*. *FEBS Lett.* **429**, 41–43 (1998).
89. Tanacs, L. & Littlefair, E. Symptoms and Treatment of Acute Conjunctivitis Caused by Skin Secretions of Veined Tree Frog (*Trachycephalus venulosus*). *Wilderness Environ. Med.* **25**, 486–487 (2014).
90. Loebmann, D. A record of *Trachycephalus typhonius* (Linnaeus, 1758) preying upon *Dendropsophus soaresi* (Caramaschi & Jim, 1983) (Anura, Hylidae). *Herpetol. Notes* **6**, 275–276 (2013).
91. Faivovich, J. *et al.* Systematic Review of the Frog Family Hylidae, With Special Reference To Hyliinae: Phylogenetic Analysis and Taxonomic Revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **294**, (2005).
92. Conlon, J. M. *et al.* Purification of peptides with differential cytolytic activities from the skin secretions of the Central American frog, *Lithobates vaillanti* (Ranidae). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **150**, 150–154 (2009).
93. Langsdorf, M., Ghassempour, A., Römpf, A. & Spengler, B. Isolation and sequence analysis of peptides from the skin secretion of the Middle East tree frog *Hyla savignyi*. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 2853–2865 (2010).
94. Alva, V., Nam, S., Söding, J. & Lupas, A. The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. *Nucleic Acids Research* **44**(W1):W410-5 (2016).
95. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40 (2008).
96. Bannon, A. W. & Malmberg, A. B. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* **Chapter 8**, Unit 8.9 (2007).
97. Menéndez, L., Lastra, A., Hidalgo, A. & Baamonde, A. Unilateral hot plate test: A simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J. Neurosci. Methods* **113**, 91–97 (2002).
98. Domer, F. Characterization of the analgesic activity of ketorolac in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **177**, 127–135 (1990).
99. Administration, F. U. S. F. & D. COX-2 Selective (includes Bextra, Celebrex, and Vioxx) and Non-Selective Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). (2015). Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientandProviders/ucm429364.htm>. (Accessed: 1st December 2017).
100. Pyron, A. R. & Wiens, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol. Phylogenet. Evol.* **61**, 543–583 (2011).
101. Majorek, K. A., Kuhn, M. L., Chruszcz, M., Anderson, W. F. & Minor, W. Double trouble - Buffer selection and his-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. *Protein Sci.* **23**, 1359–1368 (2014).
102. Chen, Z. *et al.* Genomic and Structural Characterization of Kunitz-Type Peptide LmKTT-1a Highlights Diversity and Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
103. Mourão, C. B. F. & Schwartz, E. F. Protease inhibitors from marine venomous animals

- and their counterparts in terrestrial venomous animals. *Mar. Drugs* **11**, 2069–2112 (2013).
104. Blanchard, M. G., Rash, L. D. & Kellenberger, S. Inhibition of voltage-gated Na⁺ currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2167–2177 (2012).
 105. Báez, A. *et al.* α -Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat. *Neurosci. Lett.* **606**, 42–47 (2015).

12. Anexos. Protocolos, Figuras complementarias y Producción científica.

12.1. Soluciones y buffers generales

- NaCl 5 M. Disolver 146.1 de NaCl en agua destilada y aforar a 500 mL.
- MgCl₂ 100 mM. Disolver 0.203 g de MgCl₂ en agua destilada y aforar a 10 mL.
- HCl 1N. Disolver 0.8 62 mL de HCl concentrado (11.6 N) y llevar a 10 mL de H₂O.
- NaOH 10 M. Disolver 4 g de NaOH en agua destilada y llevar a un volumen final de 10 mL.
- TFE 60 % v/v. Diluir 60 mL TFE en 40 mL de agua destilada.
- Tris-HCl 1 M, pH 8.0. Disolver 121.1 g en 1 L de H₂O y ajustar pH con HCl.

12.2. Soluciones para estimular y coleccionar las secreciones de piel

- Acetato de sodio (NaCl 50 mM, CH₃COONa 25 mM). Disolver 1 mL de NaCl 5 M y 205 mg de acetato de sodio, aforar a 100 mL con agua destilada.
- Acetato de sodio con norepinefrina (NaCl 50 mM, CH₃COONa 25 mM, norepinefrina 200 mM). Disolver 1 mL de NaCl 5 M, 205 mg de acetato de sodio y 4.1 g de norepinefrina, aforar a 100 mL con agua destilada.

12.3. Reactivos para cuantificación por BCA

Se calcula la cantidad de reactivo de BCA a utilizar de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$BCA = [\# MS \text{ (duplicado)} + \# ST + \# \text{Blanco (duplicado)}] [200 \mu L]$$

Donde MS, es la muestra problema

ST, son las diluciones estándares de BSA preparadas en serie desde 10 a 320 μ L para calcular la curva de concentración

Blanco, solución de disolución de muestra

El reactivo BCA se prepara en el momento de la cuantificación mezclando las siguientes soluciones (incluidas en el kit comercial) en la proporción indicada (51 partes A por y 1 parte de B)

12.4. Buffers para cromatografía rpHPLC

- Disolvente A (TFA 0.1% v/v). Diluir 1 mL de TFA en 999 mL de agua tetradestilada. Filtrar a través de una membrana de 0.22 micras.
- Disolvente B (Acetonitrilo, TFA 0.1% v/v). Diluir 1 mL de TFA en 999 mL de acetonitrilo. Filtrar a través de una membrana de 0.22 micras.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

12.5. Soluciones para reducción y alquilación

- Dithiothreitol (DTT). Disolver 5 mg de DTT en 25 μ L Tris-HCl 200 mM, pH 8.6.
- Ácido yodoacético. Disolver 10 mg de ácido yodoacético en 50 μ L Tris-HCl 200 mM y ajustar el pH a 8.6.

12.6. Reactivos para plegamiento

- Glutación reducido (GSH) 10 mM. Disolver 15.3 mg de GSH en la solución de plegamiento. Se debe preparar en el momento.
- Glutación oxidado (GSSH) 1 mM. Disolver 3 mg de GSSH en la solución de plegamiento. Se debe preparar en el momento.

12.7. Ensamble del gen sintético

Oligonucleótidos para el ensamble del gen sintético, se purificaron de acuerdo al protocolo de la Unidad de Síntesis del IBt, UNAM.

Oligo 1_Fw	5'GATCCATCGAGGGACGCGAACAAGATCCGAAATGCTCTGTACCTCGTAATCTTGTAAGGGCAAAGG-3'
Oligo 2_Rw	5'TAGAACCATTCCCCTTCCTTCGTGGTAAGCGATAATGATACTGTTTTACGTCCATGTACGTTTCAGTAAA-3'
Oligo 3_Fw	5'CAGGTACATGCAAGTCATTTAAATATAAAGGCACGCAGGGGAACGGTAATCGGTTCAAGTCT-3'
Oligo 4_Rw	5'GCCATTAGCCAAGTTCAGATTTCTCCTAACACTTCGGCGCACGCAATGACGAATTATCGACGTC-3'

La amplificación del gen puede ser directa (PCR 3), o bien por ensamble del *megaprimer* 1 (PCR 1) con el *megaprimer* 2 (PCR 2).

	PCR 1 (oligo 1 + 2)	PCR 2 (oligo 3 + 4)	PCR 3 (oligo 1 a 4)
10X Buff. Enzima + MgCl ₂	5 μ L	5 μ L	5 μ L
dNTPs (5 mM)	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Oligo 1_Fw (10 μ M)	2 μ L	--	2 μ L
Oligo 2_Rw (10 μ M)	2 μ L	--	0.2 μ L
Oligo 3_Fw (10 μ M)	--	2 μ L	0.2 μ L
Oligo 4_Rw (10 μ M)	--	2 μ L	2 μ L
Vent polimesasa	0.5 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L
H ₂ O	38.5 μ L	38.5 μ L	38.1 μ L

La reacción de PCR para amplificación del gen lleva dos pasos de alineamiento, el primero para que todos los oligonucleótidos se logren ensamblar y el segundo paso es para enriquecer el empalme. Asimismo, en este segundo paso se puede adicionar una cantidad extra de Oligo

1_Fw y Oligo 4_Rw para mejorar la amplificación del gen. La temperatura para el alineamiento se considera en función del segmento de empalme.

Desnaturalización
 94 °C 5 min (adición enzima, *hot start*)
 Alineamiento I (8 ciclos)
 94 °C 30 s
 48 °C 1 min
 72 °C 30 s
 Alineamiento II (25 ciclos)
 94 °C 30 s
 60 °C 30 s
 72 °C 30 s
 Elongación
 72°C 5 min

12.8. Defosforilación de vector

Fosfatasa alcalina 2 µL
 Buffer 2 µL
 Vector 20 µL

La reacción se incuba por una hora a 37 °C y se inactiva 15 min a 65 °C

12.9. Reacciones para ligación

Vector de clonación pKS Bluescript II (+)		Vector de expresión pQE-30	
Inserto (Producto PCR 3)	1.5 µL	Inserto	12.0 µL
pKS/EcoRV	1.0 µL	Vector pQE30	3.0 µL
Buffer 10 X T4 DNA	2.0 µL	Buffer 10 X T4 DNA	2.0 µL
T4 DNA ligase	1.0 µL	T4 DNA ligase	1.0 µL
H ₂ O	14.5 µL	H ₂ O	2.0 µL

Después de cada proceso de ligación se mezcla por inversión y se incuba a 16 °C por 16 horas.

12.10. Medios de cultivo y soluciones para medios

- Medio SOB. Disolver 20 g de triptona o peptona, 5 g de extracto de levadura, 0.58 g de NaCl, 0.19 g de KCl y disolver en 800 mL de H₂O. Aforar a 1 L y esterilizar por autoclave 121 °C 15 lb/inc² durante 20 min. Agregar 10 mL de MgCl₂ 1M estéril y 10 mL MgSO₄ 1M estéril
- Medio SOC. Agregar 1.8 mL de glucosa 20% filtrada a un medio SOB estéril de 100 mL. La concentración final será de 20 mM.

- Medio Luria (Lb). Disolver 5 g de extracto de levadura, 10 g de bacto triptona y 10 g de cloruro de sodio. Aforar a 1 L con H₂O. Para cajas de Petri agregar 4.5 g de agar en 300 mL de medio Lb (previamente fundido) y adicionar 300 µL de ampicilina (verificando que el medio este tibio).
- X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). Preparar 20 mg/mL en dimetilformamida, cubrir con aluminio y almacenar a -20 °C.
- IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 1M. Disolver 2.38 g de IPTG en 8 mL de H₂O, ajustar el volumen a 10 mL y esterilizar por filtración (22 µm). Hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a -20 °C.
- Ampicilina 100 mg/mL (1000X). Disolver 1 g de ampicilina en 10 mL de agua destilada y esterilizar utilizando un filtro de 22 µm. Almacenar a -20 °C.
- Kanamicina 5 mg/mL. Disolver 10 mg en 2 mL de agua destilada y esterilizar utilizando un filtro de 22 µm. Almacenar a -20 °C.

12.11. PCR de colonia

Mezcla de reacción para PCR de colonia (10 reacciones)

Buffer 10X + MgCl ₂	10 µL
dNTPs (5 mM)	4 µL
Oligo T7 (10 µM)	4 µL
Oligo T3 (10 µM)	4 µL
Taq polimerasa	2 µL
ddH ₂ O	26 µL

Desnaturalización

95 °C 1 min

Alineamiento (30 ciclos)

95 °C 15 s

55 °C 15 s

72 °C 30 s

Elongación

72 °C 7 min

12.12. Proceso para digestión

Se prepara una mezcla como se describe a continuación.

H ₂ O	5 µL
Buffer enzima	2 µL
BamH1	2 µL
Plásmido	10 µL

Después se mezcla por centrifugación e incuba a 37 °C por 60 min, para inactivar se incuba 15 min a 65 °C. Una vez en hielo se adicionan los siguientes reactivos para precipitación de ADN:

1/10 acetato de sodio	2 µL
Glicógeno	3 µL
2.5 vol. de etanol frío	62.5 µL

Para la segunda digestión centrifugar 5 min a 14,000 y lavar la pastilla con etanol frío al 70 % v/v dos veces, centrifugando 2 min entre cada lavado. Evaporar el etanol y adicionar 20 µL de agua.

H ₂ O	1 µL
Buffer enzima	2 µL
PstI	2 µL
Producto de digestión	20 µL

Finalmente se repite el proceso de incubación, inactivación y precipitación con etanol.

12.13. Soluciones y preparación de geles SDS-PAGE al 15 %

- Acrilamida 30% w/v, Bis-acrilamida 0.8% w/v. Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 de bis-acrilamida en un volumen final de 165 mL de agua destilada.
- Buffer separador (Tris-base 1.5 M, SDS 0.4 % w/v). Disolver 18.17 g de Tris-base en 50 mL de agua destilada y adicionar 2 mL de SDS al 20 %. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL con agua destilada.
- Buffer concentrador (Tris-base 0.5 M, SDS 0.4 % w/v). Disolver 6 g de Tris-base en 50 mL de agua destilada y adicionar 2 mL de SDS al 20 % v/v. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.
- Buffer de corrida 10X (Tris-base 0.025 M, glicina 0.19 M, SDS 0.1 % w/v, pH 8.6). Disolver 15.2 g de Tris-base y 72 g de glicina en 300 mL agua destilada y adicionar 25 mL de SDS 20 % v/v. Ajustar el pH a 8.6 con NaOH 10 N. Aforar a 500 mL.
- Buffer desnaturizante 5X (glicerol 25 % v/v, SDS 6.25 % w/v, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, 2-β mercaptoetanol 12.5 % w/v, azul de bromofenol 0.005% w/v). Disolver 2.5 mL de glicerol, 3.12 mL de SDS 20 % v/v, 12.5 mL de Tris-HCl 1M, pH 6.8, 1.25 mL de 2-β mercaptoetanol y 0.5 mL de azul de bromofenol al 1 % v/v. Aforar a 10 mL con agua destilada.
- Persulfato de amonio 10% w/v (PSA). Disolver 0.1 g de PSA en 1 mL de agua destilada.
- Solución de tinción (isopropanol 50 % v/v, ácido acético 10% v/v, azul de Coomassie G250 0.2 % w/v). Disolver 1 g de azul de Coomassie en 250 mL de isopropanol, agregar 50 mL de ácido acético glacial y aforar a 500 mL con agua destilada.

- Solución de desteñido (isopropanol 10% v/v, ácido acético 10 % v/v). Diluir 400 mL de agua destilada, 50 mL de isopropanol y 50 mL de ácido acético.

Gel separador. Mezclar 1.5 mL de buffer separador, 3 mL de acrilamida, 1.5 mL de agua destilada, 5 μ L de TEMED y 20 μ L de PSA 10 % w/v. Se vierte la mezcla entre dos placas de vidrio del sistema de electroforesis vertical (Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad) y se agrega un poco de agua destilada para evitar la formación de un menisco en el gel. Se deja polimerizar a temperatura ambiente.

Gel concentrador. Mezclar 0.63 mL de buffer concentrador, 0.33 mL de solución de acrilamida, 1.54 mL de agua destilada, 12.5 μ L de PSA 10% y 2.5 μ L de TEMED. Se retira el agua depositada sobre el gel concentrador. Se coloca el peine adecuado al número de pozos y se deja polimerizar.

Desnaturalización de muestras. Mezclar 20 μ L de la muestra más 5 μ L de buffer desnaturalizante 5X. Desnaturalizar por calentamiento a 100 °C por 10 minutos y centrifugar 1 min a 14,000 rpm.

Las *condiciones de migración* son a voltaje constante, se agrega 16 μ L de la muestra desnaturalizada por pozo y se migra con el buffer de corrida a 50 V hasta que el colorante de referencia atraviese el gel concentrador. Posteriormente, se aumenta el voltaje a 150 V y se continúa la corrida hasta 0.5 cm del extremo inferior del gel. Una vez concluida la electroforesis se tiñe por 2 horas con agitación y después se destiñe durante toda la noche en agitación.

12.14. Soluciones para la purificación por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA)

- Mezcla de lisis celular. Disolver 4 mL de solución BugBuster[®] Protein Extraction Reagent (Novagen), 0.2 μ L de rLysozyme[™]Solution (30 KU/ μ L; Novagen) y 4 μ L de Benzonase[®] Nuclease (25 U/ μ L; Novagen).
- Etanol 30 % (v/v). Diluir 30 mL de etanol en 70 mL de agua destilada.

Soluciones para purificar fracción soluble (FS)

- Imidazol 10 M. Disolver 13.6 g de Imidazol en 20 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0.
- Solución de equilibrio FS (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Disolver 6.1 g de Tris en 900 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 con HCl. Aforar a un litro.

- Solución de lavado FS (Imidazol 35 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Diluir 175 μ L de imidazol 10 M en 50 mL de solución de equilibrio.
- Solución de elución FS (Imidazol 300 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Diluir 1.5 mL de imidazol 10 M en 50 mL de solución de equilibrio.

Soluciones para purificar fracción insoluble (FI)

- Imidazol 10 M, GnCl 6M. Disolver 13.6 g de Imidazol en 20 mL de GnCl-Tris.
- Solución de equilibrio FI (GnCl 6M, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Disolver 286.6 g de GnCl y 3 g de Tris en 400 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.0 con HCl. Aforar a 500 mL.
- Solución de lavado FI (GnCl 6M, Imidazol 35 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Diluir 175 μ L de Imidazol 10 M, GnCl 6M en 50 mL de solución de equilibrio FI.
- Solución de elución FI (GnCl 6M, Imidazol 300 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Diluir 1.5 mL de Imidazol 10 M, GnCl 6M en 50 mL de solución de equilibrio FI.

12.15. Preparación de soluciones y procedimiento para *Western blot*

- Buffer de transferencia 1X. Disolver 0.725 g de Glicina y 1.45 g de Tris-Base en 200 mL de agua destilada, adicionar 50 mL de metanol y agregar 465 μ L de SDS 20 % v/v. Adicionar 150 mL de agua destilada.
- Buffer TBST 10X. Disolver 100 mL de Tris-HCl 1M, pH 7.5, 87.66 g de NaCl 5M y 5 mL de Tween 20. Aforar a 1 litro con agua destilada.
- Azida de sodio 10% w/v. Disolver 10g de Azida de sodio aforarlo a 100 mL de H₂O.
- Los anticuerpos se diluyen con TBST 1X adicionando 0.1 % w/v de leche en polvo sin grasa (*Svelty*).

Después de migrar un gel SDS-PAGE se hace la *electrotransferencia* en condiciones semi-húmedas. Remojar 3 papeles filtro (8 x 8 cm aprox.) en el buffer de transferencia y colocarlos en la cámara de transferencia uno sobre otro sin hacer burbujas. Utilizar guantes y pinzas. Colocar el gel, previamente sumergido en el buffer, sobre el papel filtro. Marcar la membrana de nitrocelulosa en una esquina y sumergirla en buffer. Colocarla sobre el gel en imagen especular hacia abajo. Colocar 3 papeles filtro sobre la membrana sin burbujas y remojados en buffer. Cerrar la cámara y hacer la transferencia a 400 mV a corriente constante por una hora.

El *bloqueo* se realiza incubando la membrana de nitrocelulosa en agitación por una hora, en una solución de 5 % w/v de leche en polvo (*Svelty*) más NaN₃ al 0.02% v/v aforado en TBST (se puede dejar bloqueando 24 horas con agitación). Para el *revelado* se desecha la

solución de bloqueo y después se lava la membrana con TBST por 10 min en agitación (3X). Incubar con el anticuerpo anti-histidinas. Lavar la membrana con TBST- NaN_3 por 10 min en agitación (3X). Revelar la membrana con 5 mL de buffer NBT/BCIP, 0.5 mL de cada solución más 4 mL de agua (reacción cromogénica), mantener en agitación hasta observar bandas y detener con agua o EDTA 0.5 mM.

12.16. Soluciones para ensayo de inhibición de tripsina

- Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 20 mM, pH 8.2. Disolver 0.606 g de Tris-HCl y 0.221 g de CaCl_2 , llevar a 80 mL con agua destilada y ajustar el pH a 8.2. Aforar a 100 mL.
- Enzima. Tripsina 2.8 μM . Disolver 133 mg en 2 mL de HCl 1 mM (considerando la ecuación Lambert-Bear la solución quedará 0.0653 mg/mL). Se debe preparar en el momento.
- Stock BAPNA 86 mg/mL (stock). Disolver 8.6 mg en 100 μL de DMSO aplicando un poco de calor. Preparar en el momento.
- Sustrato BAPNA 0.487 mg/mL. (BAPNA 1.12 mM, Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 20 mM, pH 8.2). Disolver 34 μL de BAPNA en 6 mL Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 20 mM, pH 8.2.
- Inhibidor o péptido. El inhibidor se preparó considerando una solución stock de 2 mg en 1 mL de Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 20 mM, pH 8.2 para hacer las diluciones seriadas 7.5 a 0.0146 μg por pozo. Las diluciones de péptido Tt7 se calcularon en el mismo rango del inhibidor comercial, mientras que para HisrTt7 se consideraron a partir de 120 μg por pozo.

12.17. Soluciones para determinación de actividad analgésica por *Hot Plate*

- PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, Na_2HPO_4 10 mM y KH_2PO_4 1.76 mM). Disolver 80 g de NaCl , 2 g de KCl , 14.4 g de Na_2HPO_4 anhidro y 2.4 g de KH_2PO_4 anhidro en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 10 N y aforar a un litro.
- Dermorfina 1 mg/mL. Disolver 1 mg de dermorfina en 1 mL de PBS. Preparar en el momento.
- Ketorolaco 0.5 mg/mL. Disolver 0.5 mg de ketorolaco en 1 mL de PBS. Preparar en el momento.

12.18. Medios para registros por *Patch clamp*

- HEPES 100 mM. Disolver 2.3 g de HEPES y ajustar pH a 7.0 con NaOH . Aforar a 100 mL y esterilizar.

- Medio extracelular EK-80, pH 7.3. Solución 10X (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM y glucosa 5 mM). Disolver 19 g de NaCl, 0.9 g de KCl, 0.75 g de CaCl₂, 1 g de MgCl₂, 5.95 g de HEPES y 2.25 g de glucosa. Ajustar pH con NaOH a 7.3 y aforar a 250 mL.
- Medio intracelular de cloruro de cesio. Esta solución sirve para sustituir los iones K⁺ por iones Cs⁺, los cuales sirven como bloqueadores de los canales de potasio, evitando las corrientes de estos canales durante los registros (CsF 105 mM, CsCl 27 mM, NaCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 10 mM y HEPES 10 mM). Disolver 1.6 g de CsF, 0.45 g de CsCl, 0.029 g de NaCl, 0.04 g de MgCl₂, 0.38 g de EGTA y 0.24 g de HEPES. Ajustar pH a 7.3 con CsOH y aforar la solución a 100 mL.

12.19. Medios y soluciones para cultivo primario de neuronas GRD

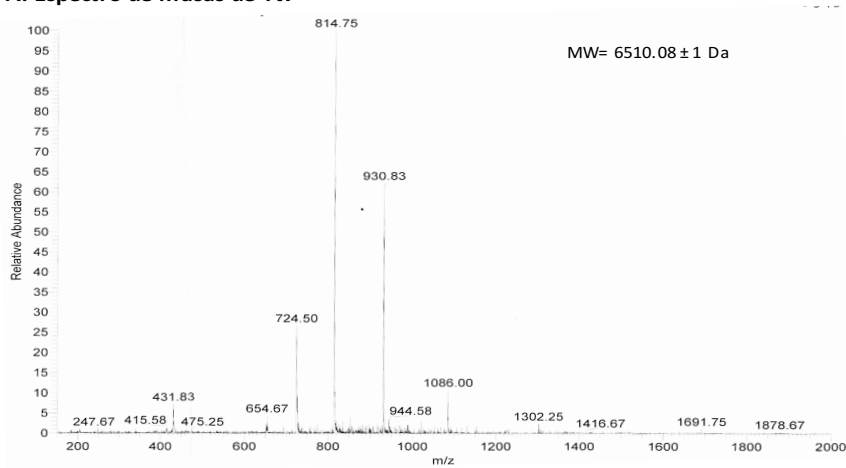
- Medio Leibovitz L-15. Obtenido de la casa comercial Invitrogen, Waltham, MA, USA.
- Medio L-15 modificado. El medio Leibovitz L-15 fue suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 500 UI de penicilina, 15,7 mM de NaHCO₃ y 15,8 mM de HEPES ajustando el pH a 7.4.
- Solución de disociación. Disolver 0.125 mg/ml de tripsina y 0.125 mg/ml de colagenasa en medio de cultivo L-15.

12.20. Medios y soluciones para imagenología de calcio

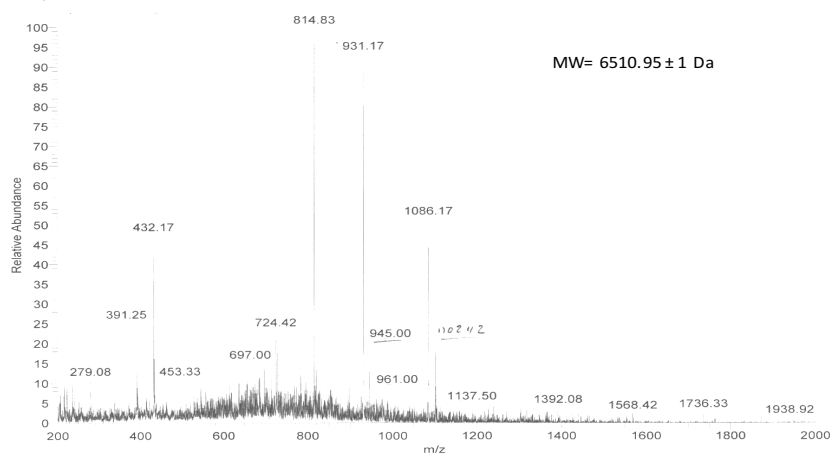
- Fluo-4 AM. Cada alícuota de 50 µg se disuelve en DMSO y se utiliza en una semana como máximo, manteniendo a -20 °C en oscuridad.
- Medio intracelular pH 7.2, KOH (KCl 125 mM, NaCl 10 mM, CaCl₂ 0.134 mM, HEPES 5 mM, GTPNa 1 mM, ATPMg 2 mM). Disolver 0.93 g de KCl, 0.06 g de NaCl, 0.165 g de CaCl₂, 0.12 g de HEPES, 0.052 g de GTPNa, 0.1 g de ATPMg y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Medio extracelular pH 7.4, NaOH (KCl 5.4 mM, NaCl 140 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 10 mM, Glutamato 10 mM). Disolver 0.04 g de KCl, 0.81 g de NaCl, 0.011 g de MgCl₂, 2 g de CaCl₂, 0.24 de HEPES, 0.147 g de glutamato y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Medio extracelular pH 6.1 (KCl 5.4 mM, NaCl 140 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MES 10 mM, Glutamato 10 mM). Disolver 0.04 g de KCl, 0.81 g de NaCl, 0.011 g de MgCl₂, 2 g de CaCl₂, 0.195 g de MES, 0.147 g de glutamato y aforar a 100 mL con agua destilada.

12.21. Espectros de masas moleculares de Tt7, sTt7 y HisrTt7

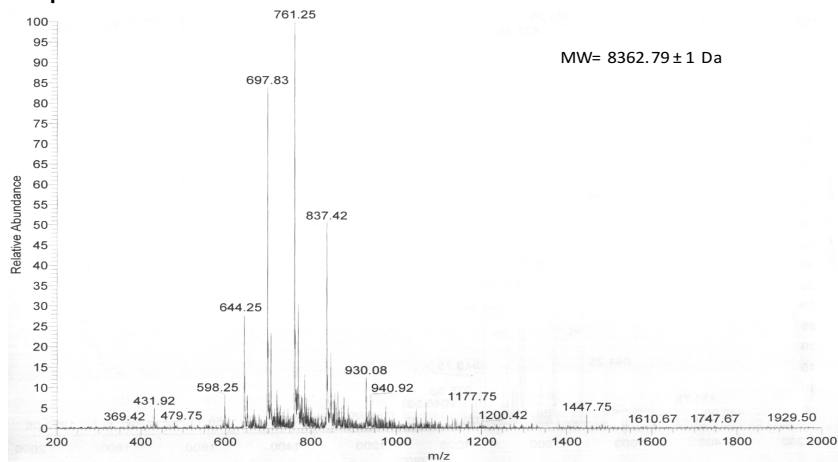
A. Espectro de masas de Tt7



B. Espectro de masas de sTt7



C. Espectro de masas de HisrTt7



12.22. Publicación en revista indexada

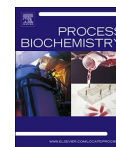
Process Biochemistry 62 (2017) 205–214



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio



Identification, chemical synthesis and heterologous expression of an antinociceptive peptide from the veined tree frog *Trachycephalus typhonius*



Francia Garcia-Garcia^a, Ligia L. Corrales-Garcia^b, Timoteo Olamendi-Portugal^a, Rita Restano-Cassulini^a, Rosario Vega^c, Mayra Vega^c, Ernesto Ortiz^a, Gabriel Sandoval-Lopez^d, Enrique Soto^c, Gerardo Corzo^{a,*}

^a Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 61500, Mexico

^b Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín 050010, Colombia

^c Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur 6301, CU, Puebla, Pue 72570, Mexico

^d Laboratorios Silanes S.A. de C.V., Amores 1304, Col. del Valle, Cd. de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Peptides
Frog
Recombinant protein
Chemical synthesis
Heterologous protein expression
ASIC
Pain

ABSTRACT

A proteinic fraction from the skin secretion of *Trachycephalus typhonius* showed antinociceptive activity in mice when tested by the Hot Plate method. This fraction was purified, and a peptide named Tt7 with a molecular mass of 6,509.7 Da was identified. The primary structure of Tt7 was elucidated. Comparing Tt7 with the structure of other analgesic peptides, it exhibits a strong relationship with the family of anantoxins, which are peptides isolated from the skin secretions of Asian frogs of the genus *Hyla*, whereas *T. typhonius* is located only in the Americas. Tt7 contains a disulfide pattern Cys1-Cys4/Cys2-Cys3, a secondary structure defined by a β -hairpin, and a N-terminal α -helix, which are characteristic motifs of Kunitz-type structures. The peptide Tt7 was both chemically and biologically synthesized. The recombinant peptides (rTt7 and HisrTt7) showed analgesic effects. Electrophysiological analyses of Tt7 on the voltage-gated sodium channel (Na_v) subtype 1.7 reduced the Na^+ current by ca 10%. Further studies showed that Tt7 inhibits the pH gated Ca-fluorescence increase in dorsal root ganglion neurons of the rat, indicating an inhibitory action of Tt7 in the acid gated currents which may account for the observed analgesic action of Tt7, suggesting that this peptide might affect various pain-related receptors.

1. Introduction

Mexican frog diversity is widely recognized although the beneficial or detrimental effects of their skin secretions have been scarcely studied [1]. In the same way, as the proteins from others poisonous animals, the skin secretion components from Mexican frogs represent a valuable source of natural products as leads for the treatment of public health problems such as acute and chronic pain. It has been mentioned that 2–32% of the worldwide population suffers severe chronic pain, mainly caused by osteoarthritis, various types of cancer, heart disease or diabetes [2–4]. Typical pain treatment includes peripheral and non-opioid analgesics in early stages but, if pain persist, it is necessary to use analgesic opioids, which sadly induce tolerance and even dependence in the patients [5,6].

Currently, there is a search to discover novel drugs for pain control with specific targets from natural sources. A successful example is the cone snail venom-derived peptide PRIALT, which is a selective blocker

of N-type voltage-gated calcium channels (Ca_v) [7–10]. Recent studies have shown that antagonists of the Na_v 1.7 managed to reduce the pain caused by various types of neuralgia and erythromelalgia, becoming potential molecules to contend mainly with chronic pain [11–14]. Transient receptor potential channel subfamily V member 1 (TRPV1) and subfamily A member 1 (TRPA1) are also associated to neuropathic pain caused by diabetes (associated to TRPV1) or inflammatory pain (associated to TRPA1), and antagonists of these receptors are under development [13,15,16]. Other peptides with potential antinociceptive effects are blockers of the acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) that decrease inflammatory and postoperative pain, and blockers of the ASIC1a, which reduce cutaneous pain [17–19]. It is also known that antagonists of purinergic channels ($\text{P}_2 \times 2$ and $\text{P}_2 \times 3$), are involved in chronic pain inhibition [4]. Therefore, the biochemical characterization of new analgesic peptides has raised great interest in recent years, especially those isolated from venoms or secretions of poisonous animals such as Urg 9-1 from the *Urticina grebelnyi* anemone, μ -SLPTX-

* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico.
E-mail address: corzo@ibt.unam.mx (G. Corzo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.029>

Received 11 February 2017; Received in revised form 24 July 2017; Accepted 28 July 2017

Available online 31 July 2017

1359-5113/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Ssm6a from the *Scolopendra subspinipes mutilans* centipede, Mambalgin-2 from the *Dendroaspis polylepis polylepis* snake and the anntoxins from the *Hyla annectans* and *H. simplex* frogs [14,18,20–22]. Although some of these peptides have not been associated to a specific target, there are some evidences that they are antagonist of some Na-channel subtypes. For example, anntoxins might target some tetrodotoxin-sensitive (TTX-s) Na_v subtypes [21,22].

Considering the wide distribution of frogs from the Hylidae family in Mexico, and the attractive amount of biomolecules that they could secrete from their skins [23–26], the search for antinociceptive peptides in Mexican frogs was proposed. Here we report for the first time the biological activity, primary and secondary structure as well as the heterologous expression of Tt7, an anntoxin-like peptide from the American frog *T. typhonius*.

2. Materials and methods

2.1. Animals and secretion harvesting

Trachycephalus typhonius frogs were collected in the Mexican States of Campeche and Quintana Roo. They were kept in a terrarium with 60% relative humidity at room temperature (20–26 °C), the soil substrate used was peat moss, and feeding was performed every week with crickets purchased from Petmml S.A. de C.V. The skin secretion was collected monthly by manual stimulation of the animals. The frogs were first washed with distilled water and dried with an absorbent towel, after that it was gently manipulated by hand and a soft pressure was applied around the body. A white viscous secretion was observed after few minutes of manipulation and such secretion were recovered in distilled water and immediately centrifuged to remove any debris or dead cells. The supernatant was lyophilized and frozen at –20 °C until use.

2.2. Separation and purification of the components from the skin extract

The lyophilized extract of *T. typhonius* (4 mg) was resuspended in water containing 0.1% TFA and centrifuged at 14,000g for 5 min. The soluble material was separated by reversed phase HPLC (RP-HPLC). An analytical C₈ column (Agilent XDB-C8, 5 μm Eclipse, 4.6 × 250 mm, USA) was equilibrated with the same aqueous solution of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (solvent A) and the components eluted using a linear gradient of acetonitrile (ACN) with 0.1% TFA (solvent B) from 0 to 60% in 60 min, with flow rate of 1 mL/min. The fractions were tested using the Hot Plate method, and the positive fractions were further separated using a C₁₈ analytical column (C₁₈ GRACE, Vydac 5 μm, 4.6 × 250 mm) with a linear gradient from 10 to 60% of solution B in 50 min. The eluates were monitored at 230 nm.

2.3. Analgesic assays

CD-1 male mice weighing 18–22 g were used for the analgesic assays. The animals were handled in accordance with the guidelines for the care of laboratory animals [27]. Mice were maintained in strain boxes, with 12/12 h light/dark cycles prior to the experiments. The Hot Plate test was used to induce an acute thermal stimulus. It was conducted with standard protocols [28], using the Panlab LE7406 equipment (Harvard Apparatus, Holliston). The intraperitoneal (ip) administration in mice was performed in a final volume of 300 μL using different doses of the native or recombinant Tt7. Equal volumes of PBS pH 7.2 and 5 mg/kg ketorolac (Tris salt, Sigma-Aldrich) were administered as negative and positive controls, respectively. Assays were recorded at 15, 30, 45 and 60 min post-injection. The maximum latency was considered after 30 s. Approvals to conduct such experimental protocols to study analgesia in mice were approved by the Bioethics Committee of the Biotechnology Institute.

The statistical analysis of the data was performed by means of the

GraphPad Prism v5.0a software, using the multiple t-test comparing the control (PBS) with each treatment and period of time post-treatment (15, 30, 45 and 60 min) and considering $p < 0.05$ as significant values.

2.4. Molecular mass determination

The molecular mass of peptides, as well as the peptidic fragments from enzymatic cleavages was determined by dissolving 2 μg of each peptide in aqueous 50% ACN with 1% acetic acid, and then analyzed by ESI-MS, using a Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA) fitted with a nano-electrospray.

2.5. Primary structure characterization

Prior to sequencing, 50 μg of peptide Tt7 were reduced with DTT and simultaneously alkylated with iodoacetamide. The reduced-alkylated Tt7 was then desalted by RP-HPLC with a linear gradient (0–60% solvent B in 60 min). The molecular mass of the reduced and alkylated peptide Tt7 was obtained and the N-terminal was determined by Edman degradation using a LF3000 Protein Sequencer (Beckman, CA, USA). Then, an enzymatic hydrolysis of the alkylated Tt7 was performed using endoproteinase Asp-N at 37 °C for 12 h. Later, the peptide fragments were purified by RP-HPLC using the conditions described previously. The molecular masses and N-terminal sequences of each fragment were determined.

2.6. Homology modeling and structure analysis

A BLAST analysis was used to obtain peptide sequences related to Tt7, and then a global sequence alignment was generated using the ClustalW software. This alignment was used as input to produce a structural model of Tt7 by homology, using the Modeller software (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/modeller>). Analyses to identify conserved functional or structural patterns were performed with three different algorithms: pdb70_nr (<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/clusterStatistics.do>), SCOPE (<http://scop.berkeley.edu/>) and Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). The results were analyzed using the HHpred server (Bioinformatics Toolkit Max-Planck Institute). To validate indirectly the structure of Tt7 structure, it was analyzed using circular dichroism and its disulfide bond pattern was elucidated using a combination of enzymatic digestions followed by proteomic analyses. The circular dichroism spectra (CD) of native Tt7 and recombinant HisTt7 were recorded in a Jasco J-710 spectropolarimeter (Jasco, Japan), from 190 to 260 nm, in 60% trifluoroethanol (TFE), at room temperature, with a 1 mm-path quartz cell. Data were collected every 0.5 nm at a 20 nm/min speed. The concentration of Tt7 and HisTt7 was 0.5 mg/mL. Percentages of secondary structure content were calculated from the spectra using the K2D3 web server [29]. To elucidate the disulfide pattern of Tt7, elastase enzymatic hydrolyses of HisTt7 oxidized and reduced were performed. The peptide fragments from each enzymatic hydrolysis were recovered using RP-HPLC separation, and their molecular masses were obtained.

2.7. Peptide chemical synthesis and folding conditions

Crude synthetic peptide sTt7 was obtained from two commercial agencies, ChinaPeptides Co. Ltd. (Shanghai, China) and GenScript USA Inc. (NJ, USA). One hundred milligrams of crude synthetic peptide Tt7 were purified using a C₁₈ analytical column (C₁₈ GRACE, Vydac 5 μm, 4.6 × 250 mm) with a linear gradient from 10 to 60% of solution B in 50 min at 1 mL/min. The peptide fraction with the correct reduced molecular mass was vacuum-dried and later resuspended in a folding solution containing 0.1 mM Tris pH 8.0, 1 mM reduced glutathione and 0.1 mM oxidized glutathione. The folding reaction was performed at 37 °C for 20 h and the products were then purified by RP-HPLC with the conditions described above. The identity of the synthetic peptide was

confirmed by determining its molecular mass and by RP-HPLC co-elution assays with the native Tt7.

2.8. Heterologous expression of Tt7

The primary sequence of Tt7 was used to design its coding gene by reverse translation. The codons were balanced to reflect the *E. coli* codon usage (<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>) in order to optimize the heterologous expression. The Tt7 gene was flanked upstream by a *Bam*HI site for cloning, followed by the sequence coding for the Factor Xa endopeptidase recognition site. Downstream of the gene, two stop codons were added, followed by a *Pst*I cloning site. Four overlapping oligonucleotides covering the whole construction were designed and synthesized, with 19–20 nucleotide-long overlaps with similar 53–54 °C estimated Tm's (the Oligo 7 software was used for this task). The purified oligonucleotides were used to amplify the full construction by recursive PCR using Vent-Polymerase (Fermentas). The blunt-end PCR product was purified and cloned into *Eco*RV-linearized pBluescriptKS(+) (*Eco*RV and all subsequently used restriction enzymes were purchased from New England Biolabs) using electrocompetent DH5 α *E. coli* cells. The fragment of interest was subcloned through the *Bam*HI and *Pst*I sites into the pQE30 expression vector and electroporated into *E. coli* Origami cells. The pQE30 vector introduces a His₆-tag at the N-terminal region of the expressed proteins. The recombinant Tt7 is hereafter named HisrTt7 for this reason. This tag is useful for purification purposes, but it can in principle affect the activity of the recombinant protein, so the Factor Xa endoprotease site is introduced in the construction, in order to cleave the His₆-tag from the product if deemed necessary.

The production of the recombinant HisrTt7 was performed in 1 L cultures of LB medium at 37 °C. After reaching an optical density (OD) at 600 nm of 0.8–1.0 the transformed *E. coli* Origami cells were induced with 1 mM IPTG and incubated at 37 °C for 6 h with constant stirring at 230 rpm. The cells were harvested by centrifugation at 7000 g for 10 min at 4 °C (Beckman JA-14 rotor), and lysed with a mixture of 10 mL of BugBuster® Protein extraction Reagent (Novagen), 20 μ L Lysozyme (50 KU/mg; Roche) and 3 μ L Benzonase® Nuclease (2.5 KU; Novagen) shaking for 20 min at room temperature to facilitate degradation of bacterial DNA and cell wall. The homogenate was centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C (Beckman JA-20 rotor). The soluble recombinant peptide was purified by ion metal affinity chromatography (IMAC), it was passed through a column (1 cm diameter \times 20 cm height) with 3 mL of NiNTA agarose (Qiagen), previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. After washing with 20 mL of 35 mM imidazole in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, the recombinant protein was recovered in 10 mL of 300 mM imidazole in 50 mM Tris-HCl, pH 8. Further purification of HisrTt7 was done by RP-HPLC using a C₁₈ analytical column under the conditions described previously. The identity of HisrTt7 was confirmed by Western blot using an anti-histidine antibody and mass spectrometric analyses.

At each purification step (Ni-NTA and RP-HPLC), SDS-PAGE was performed to have a qualitative analysis of the protein concentration. However, for the quantitative determination the Lambert-Bear equation was applied considering the absorbance at 280 nm, as well as its molar extinction coefficient ($\epsilon = 6210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ to HisrTt7 and Tt7).

2.9. Patch clamp assays

Sodium currents from human Nav 1.7 channels expressed in CHO cell line (CHO-hNav 1.7) were recorded using the patch clamp technique in whole-cell mode. Currents were elicited with a 140 ms depolarization from -120 to 20 mV, in 10 mV steps. The holding potential was set at -90 mV. As a positive control tetrodotoxin (TTX) was used at concentration of 300 nM. The records were acquired by using the amplifier MultiClamp 700 B and Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

2.10. Fluorometric assays

A calcium imaging technique was used to determine the effect of Tt7 on variations in calcium fluorescence produced by depolarization induced by extracellular pH changes, under control conditions and in the presence of Tt7. For this, Long-Evans rats (P7–P10) without distinction of sex were obtained from animal house "Claude Bernard" of the Benemérita Autonomous University of Puebla (BUAP). The animals were handled in accordance with the guidelines for the care of laboratory animals [27], and experimental protocol was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of BUAP.

Briefly, the cells from the dorsal root ganglia (DRG) were incubated (37 °C for 60 min) with 4 μ M Fluo-4-acetoxymethyl ester and 0.2% Pluronic (Invitrogen). Fluorescence measurements were performed on a Nikon Eclipse Ti (Nikon Kogaku, Japan) inverted microscope equipped with CCD IC-200 (USA). Fluo-4 was excited at 480 nm with a monochromator DeltaRAM XTM (Photon Technology International – PTI, Birmingham, NJ, USA Inc., USA). Emitted fluorescence was filtered with a 510 nm longpass filter. Background subtracted, mean fluorescence intensity were displayed online with ImageMaster™ 1.4 software (Photon Technology International). Intensity of fluorescence change was directly proportional to the concentration of intracellular calcium.

Glass slides with loaded DRG neuron cells were placed in a continuously bath chamber with extracellular solution of the following composition (in mM): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2, HEPES 10 (Extracellular pH 7.4 or 6.1 was adjusted with NaOH, MES instead of HEPES was used for solution with pH 6.1), and maintained at about room temperature (22–25 °C). Capsazepine (10 μ M) was added to the extracellular solution (pH 6.1) to avoid the activation of the TRPV1 receptor present in DRG neurons. To test cell viability a high potassium (20 mM) solution was used considering as viable those cells that showed an increase of calcium induced by high potassium. Between each K⁺ stimulus *circa* of 5 min rest time was allowed to be perfused with a pH 7.4 solution. For the experiments, cells were perfused in control with an acid pH 6.1 solution to activate acid sensing ionic channels (ASIC) (pH 6.1 is the EC₅₀ of ASIC in DRG neurons [30]) and in problem experiments with Tt7 for 30 s before and during pH 6.1 perfusion, and then washed and tested again with pH 6.1 solution without Tt7.

3. Results

3.1. Identification of antinociceptive component in the skin secretion

The soluble portion obtained from the aqueous extraction from the skin secretion of *T. typhonius* was separated by RP-HPLC. The proteinaceous fractions were collected and vacuum-dried, then resuspended and assessed by the Hot Plate test to determine their potential antinociceptive activity (Fig. 1). The isolated fraction, number seven, hereafter named Tt7, showed analgesic activity when administered intraperitoneally to mice at 0.5 mg/kg. The mass spectrometry analysis of the peptidic component Tt7 revealed a molecular mass of 6,509.7 Da. Direct N-terminal analysis using Edman degradation showed a partial amino acid sequence similar to the anatoxins, analgesic peptides identified in skin secretions of a *Hyla* frog from Asia. Taxonomic analysis revealed that *Hyla annectans* and the *Trachycephalus* frogs belong to the Hylidae family.

3.2. Primary structure characterization

To determine the full amino acid composition of this peptide, Tt7 was chemically reduced to remove any probable disulfide bridges as well as carboxymethylated and then subjected to enzymatic hydrolysis with endoproteinase Asp-N. Several peptide fragments were recovered

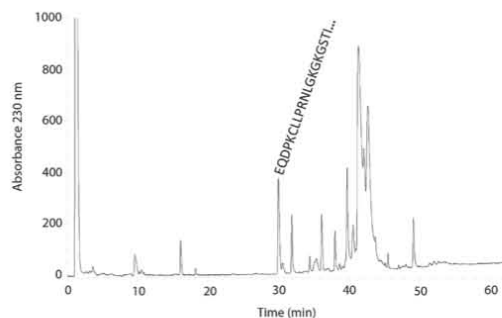


Fig. 1. Separation of the components from the skin secretion of *Trachycephalus typhonius* by RP-HPLC. The N-terminal sequence of Tt7 is shown. The absorbance signal was recorded at 230 nm.

from the enzymatic digestion after RP-HPLC separation. The molecular masses of the carboxymethylated peptidic fragments 3, 7 and 10 (according to their elution time) complemented the full Tt7 primary structure according to its experimental molecular mass; therefore, such fragments were N-terminal sequenced using Edman degradation (Table 1). The experimental molecular masses, of the peptidic fragments 3, 7 and 10, agreed with the theoretical mass of the resulting primary structure composed of 59 residues, with four cysteines.

A similarity sequence analysis of Tt7 using BLAST showed 64% identity with anttoxins from *H. annectans* (Table 2), where the position of the cysteines is conserved among all peptides, most likely indicating a similar disulfide arrangement (C6-C56 and C31-C52). The three-dimensional structure homology modeling of Tt7, despite the similarity of this peptide with anttoxins, was interestingly best fitted using the scorpion neurotoxin LmKTT-1a from *Lychas mucronatus*, while the structure of anttoxin had the second best score (Fig. 2). Both LmKTT-1a and Tt7 consist of a twisted β -hairpin, and a short α -helix in the N-terminal, which are characteristic motifs of Kunitz-type structures [31]. The difference between the three molecules, LmKTT-1a, Tt7 and anttoxin, lies in the twisted β -hairpin, where the torsion angle of the hairpins in LmKTT-1a and Tt7 (Fig. 2A and B) are more similar to each other than to the anttoxin (Fig. 2C). Also, the length of the α -helix motif is larger in LmKTT-1a and Tt7 with respect to anttoxin.

Additionally, a motive of three aromatic residues, conserved in several peptides with similar structure and function to Tt7 was found. In the case of Tt7, a tyrosine triplet located in the core of the structure at positions 22–24 has the same arrangement and orientation in LmKTT-1a and anttoxin (Fig. 2).

3.3. Chemical synthesis of peptide Tt7

The peptide sTt7 was chemically synthesized. The peptide yield obtained after purification was 16% (with the reduced cysteines, MW of 6,513.9 Da) and after the folding reaction was 0.38% (with the oxidized cysteines MW of 6,509.7 Da). To determine whether the three-

dimensional structure of the sTt7 was correct, a trial of RP-HPLC retention times and co-elution experiments were performed. Equivalent amounts of native Tt7 (Fig. 3A) and synthetic sTt7 (Fig. 3B) were mixed and subjected to RP-HPLC separation. The RP-HPLC chromatogram obtained indicated the presence of a single eluate with a retention time of 21 min corresponding to that obtained for the native and the synthetic peptide (linear gradient, 10–60% B). This results suggested similar cysteine and secondary structure arrangement for both Tt7 and sTt7 (Fig. 3C).

The poor synthetic yield of sTt7, and also the low yield from natural extraction, resulted in the consideration of the heterologous expression of Tt7 as an alternative source of the peptide.

3.4. Heterologous expression

Attempts to amplify the Tt7-coding cDNA from total RNA extracted from the skin glands of *T. typhonius* failed. A synthetic gene was therefore designed based on the primary structure of Tt7. The gene encoding Tt7 was assembled and cloned into the expression vector pQE30. This vector is used to produce N-terminal His₆-tagged proteins, which facilitates the rapid purification of the recombinant products by IMAC. We added a cleavage site for Factor Xa between the His₆-tag and the sequence of the Tt7 during design, in anticipation for a possible deleterious effect of the His₆-tag on the biological activity of Tt7, which would then be untagged to the native form by the protease. Heterologous expression of the peptide Tt7 (HisrTt7) was achieved using the *E. coli* Origami strain (Fig. 4A, inset). This particular strain was used in order to maximize the yield of correctly folded HisrTt7, through disulfide bond formation in the cytoplasm. HisrTt7 was obtained in both inclusion bodies and the soluble fraction (Fig. 4A inset, lanes 3 and 4, respectively). Interestingly, despite the higher apparent concentration of HisrTt7 in the inclusion bodies' fraction, the yield after IMAC purification was higher for the soluble fraction.

A second step of purification by RP-HPLC removed the protein impurities present after IMAC, achieving a main eluate with a retention time of 32 min (linear gradient, 0–60% of B in 60 min) and showing an experimental molecular mass of 8,363.1 Da, which corresponds to the expected molecular mass for the His₆-tagged rTt7 (Fig. 4A). A simultaneous analysis by 15% SDS-PAGE and Western blot (Fig. 4B and C, respectively) corroborated that the main component from affinity chromatography and RP-HPLC corresponded to the HisrTt7 peptide. The protein yield was 1.2 mg/L. The recombinant HisrTt7 was cleaved by FXa using a mass ratio of 50:1, respectively, in 10 mM Tris-base buffer, pH 8.0, at room temperature for 14 h. The Tt7 without the His₆-tag at the N-terminal was obtained after RP-HPLC separation (data not shown).

3.5. Secondary structure of Tt7

The secondary structure of the native Tt7 was compared to that of the recombinant peptide using circular dichroism (Fig. 5). The secondary structure of Tt7 consisted of 57.7% α -helix and 16.7% β -strand and that of the HisrTt7 consisted of 62.6% α -helix and 13.8% β -strand according to the K2D3 web server [29]. The secondary structure agrees

Table 1
N-terminal sequences of the Tt7 Asp-N-digestion products.

Fragment	Sequence	MWexp ^a	MWtheo
N-Edman	EQDPKCLLP RNLGKGGKGS TIRYY YDKSAG TCKSFYKGT QGNGNRFKSK E DCEAACVTA	6,509.7	6,509.3
Asp-N #10	EQDPKCLLP RNLGKGGKGS TIRYY YDKSAG TCK	2,600.6	2,542.9
Asp-N #7	—DPKCLLP RNLGKGGKGS TIRYY	2,925.0	2,866.8
Asp-N #3	—————DKSAG TCKSFYKGT QGNGNRFKSK E—————DCEAACVTA	996.5	881.9

^a Experimental molecular masses, fractions Asp-N #10, #7 and #3 are carboxymethylated (+57.9 Da).

Table 2
Multiple sequence alignment of Tt7 and anntoxins.

Name	Sequence	Ident	ACCN
Tt7	—EQDPKCLLPNLLGKGGSTIRYYDKSAGTCKSFYKGTQNGNRFKSKEDCEAACVTA—		
Anntoxin	MKTSVFLVVLAAAGLFLLEAGADYRCQLSRNYGKGGSGFTNYYDKATNSCKTFRYRGSGNGNRFKLEECETTCVTAE	64%	ACU21613.1
AnntoxinS5	MKTSVFLVVLTAAGLFLLEAAADHRCGLIRNLGKGGSGFTNYYDKATNSCKTFRYRGSGNGNRFKLEECETTCVTG-	61%	AEJ35098.1
AnntoxinS2	MKTSVFLVVLTAAGLFLLEAAADHRCGLIRNLGKGGSGFTNYYDKATNSCKTFRYRGSGNGNRFKLEECETTCVTG-	61%	AEJ35097.1
AnntoxinS3	MKTSVFLVLAAGLFLLEAS-DYRCNLSRSYKGGSGFTNYYDKATNSCKTFRYRGSGNGNRFKLEECETTCVTG-	60%	AEJ35095.1
AnntoxinS1	MKTSVFLVLAAGLFLLEAS-DYRCNLSRSYKGGSGFTNYYDKATNSCKTFRYRGSGNGNRFKLEECETTCVTG-	58%	AEJ35094.1
AnntoxinS4	MKTSVFLVLAAGLFLLEAS-DYRCNLSRSYKGGSGFTNYYDKATNSCKTFRYRGSGNGNRFKLEECETTCVTG-	56%	AEJ35096.1

The signal peptide/propeptide (first 21 amino acids) of anntoxins are included. The conserved cysteines are shown in gray. The bottom line shows the amino acid identities (*), semi-conservative substitutions (.) and conservative substitutions (:). The term "Ident" represents the percentage of sequence identity between the putative mature sequences, i.e. excluding the first 21 amino acids of anntoxins. ACCN represents the GenBank accession number.

with the proposed model (Fig. 2B). Additionally, the disulfide pattern of the HisrTt7 was obtained following the proteomic analysis of enzymatic digestions of reduced and oxidized forms of HisrTt7. Fig. 6 shows overlapping HPLC chromatograms of elastase digest fragments of both the reduced and oxidized forms of HisrTt7. The HPLC fractions of the enzymatically digested oxidized HisrTt7, that did not match to the HPLC fractions of the enzymatically digested reduced HisrTt7, had molecular masses of two Cys-Cys covalently-linked peptide fragments of 1,999.52 and 1,564.01 Da, respectively, that correspond to the theoretical molecular masses of 1,999.18 and 1,564.75 Da, respectively, according to their amino acid sequences (Fig. 6, arrows). Therefore, the disulfide pattern obtained was Cys1–Cys4/Cys2–Cys3, which agrees to that of the proposed model, and also to the disulfide pattern of anntoxins.

3.6. Biological Activity of Tt7, rTt7 and HisrTt7

The analgesic activities of recombinant rTt7 and HisrTt7 were tested on CD-1 mice and compared to that of the native Tt7, PBS (negative control) and the analgesic ketorolac (positive control) using the Hot Plate test (Fig. 7). The most striking HisrTt7 effect was observed at 15 min, 25 and 33% better respect to ketorolac and PBS, respectively. In contrast to the commercial analgesic ketorolac, whose better effect was observed after 60 min ($p < 0.05$), 18 and 23% above HisrTt7 and PBS, respectively. Also, the analgesic properties of HisrTt7 last for a short period of time compared to that of native Tt7, and rTt7, which maintained their effects over a period of time from 30 to 60 min. Tt7 shows an increase in latency of 23–25% respect to PBS and 3–20% respect to ketorolac, whereas for rTt7 the latency effect was increased from 8 to 35% compared to PBS and 13–21% on ketorolac. The recombinant rTt7 had analgesic effects similar to that of the native Tt7, but at 45 min. The short analgesic effect of HisrTt7 may be related to the extra His₆-tag at its N-terminal. Treated mice were kept and observed for 72 h after

treatment. The mice did not show adverse signs in their conduct; so that, we ruled out false positive analgesic effects.

3.7. Patch clamp assays

The native Tt7 fraction was tested on TTX-sensitive sodium channels of the family hNav 1.7. These types of sodium channels are highly expressed in nociceptive neurons making them a potential target of the Tt7 toxin. At 5 μ M concentration, Tt7 reduces Nav 1.7 current by about 10% (Fig. 8A). As positive control, 300 nM TTX was applied resulting in almost complete current block (Fig. 8B). Tt7 doesn't change the activation and inactivation voltage dependence of the channels as showed in Fig. 8C and D.

3.8. Fluorometric assays

The Tt7 fraction was tested on rat DGR neurons by measuring the intracellular calcium concentration changes in such cells. It is known that ASICs are highly expressed in nociceptive neurons, and respond to pH changes at the extracellular environment making them also potential targets of Tt7. As positive control, 20 mM high potassium was applied resulting in an increase of the fluorescence in DRG neurons secondary to depolarization and calcium channels activation (Fig. 9A). Under control condition the perfusion of the cells with a pH 6.1 solution increased 3.6 fold in peak fluorescence (Fig. 9B). Application of 100 nM Tt7 produced significant 37% reduction of the peak fluorescence change induced by pH 6.1 ($n = 6$, $*p < 0.05$, Student's *t*-test, Fig. 9C). Inhibition of peak fluorescence change recovered to 97% of control value after 5 min washout of Tt7 (Fig. 9D). The mean of six DRG cells analyzed showed that 100 nM of recombinant Tt7 indirectly inhibited the rise in intracellular calcium in DGR neurons (Table 3).

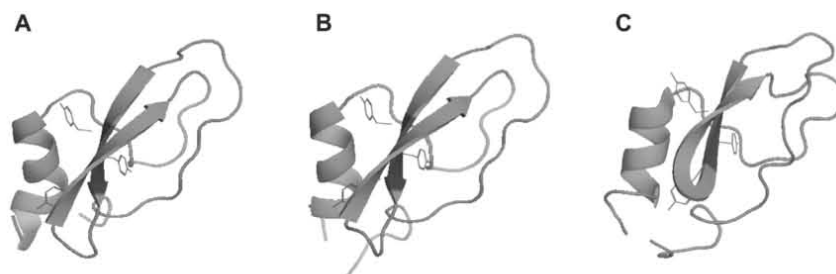


Fig. 2. Three-dimensional structure model of Tt7 compared with structural homologs. (A) LmKTT-1a, (B) Tt7 and (C) Anntoxin. The α -helix and the antiparallel β -sheets are shown. The position and orientation of the triplet of tyrosines in the core of the three structures is observed. The structures of (A) and (C) were determined by NMR. The structure (B) was obtained by homology modeling.

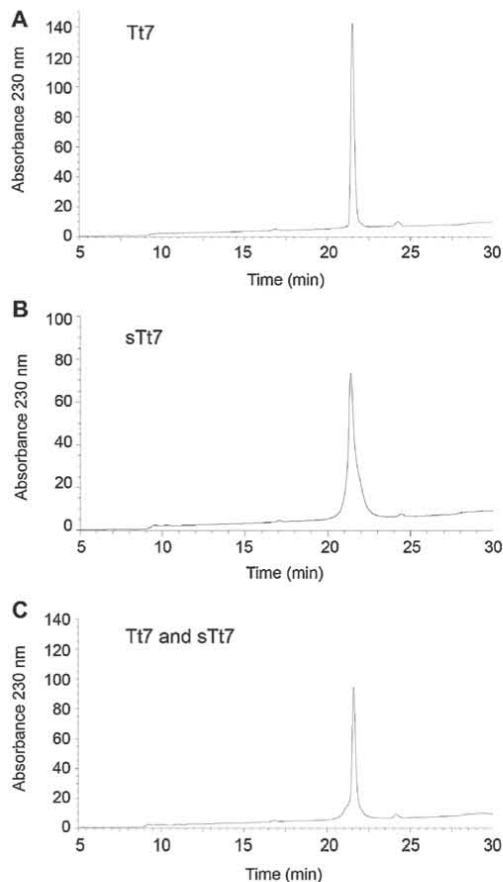


Fig. 3. Co-elution assay of Tt7 and sTt7. (A) native Tt7 (6 µg), (B) synthetic sTt7 (6 µg) and (C) Tt7 and sTt7 (3 µg each). The elution gradient was from 10 to 60% of B in 50 min.

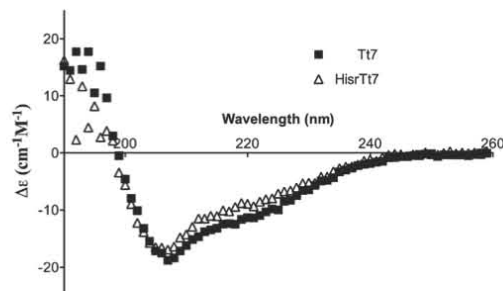


Fig. 5. Circular dichroism of native Tt7 and recombinant HisTt7. The secondary structure analysis revealed 57.7% α -helix and 16.7% β -strand for Tt7 and 62.6% α -helix and 13.8% β -strand for HisTt7.

4. Discussion

Although frogs from the Hylidae family are widely spread, antoxins had been identified thus far only in Asian frogs (*H. annectans* and *H. simplex*). We have identified Tt7 an analog of antoxins, also with analgesic activity, from a species belonging to the *Trachycephalus* genus, which is unique to the Americas. Tt7 is the first component with antinociceptive activity identified in an amphibian from the New World [23].

One of the most interesting structural features of Tt7 is the triplet of tyrosines from the 22 to the 24 N-terminal position, which could be involved in both the overall conformation of this peptide and the analgesic activity, as shown for similar Kunitz peptides [22,32]. Also, the conformational similarity between Tt7 and APETx2, a sea anemone Kunitz-type toxin, which has antinociceptive activities suggest other residues involved in this kind of biological activity [17]; so, the conserved tyrosine triplet of Tt7 and the antoxins could play an important role in the analgesic function.

Until now it has not been possible to identify the cell receptor of Tt7; the electrophysiology tests on Nav 1.7 showed a weak effect at 5 µM of Tt7. Concerning the targets of similar peptide structures to Tt7 such as LmKTT-1a and antoxins, LmKTT-1a was tested on Kv 1.1, 1.2 and 1.3 and it was able to block the Kv 1.3 with an IC_{50} of $1.58 \pm 0.73 \mu M$ [33], whereas in the case of antoxins, they were only active on tetrodotoxin-sensitive Nav with an IC_{50} of 3.4 µM [22]. Furthermore, both peptides antoxin and LmKTT-1a inhibited trypsin with a K_i of 0.025 and 0.140 µM, respectively [22,31,32]. So, it will be

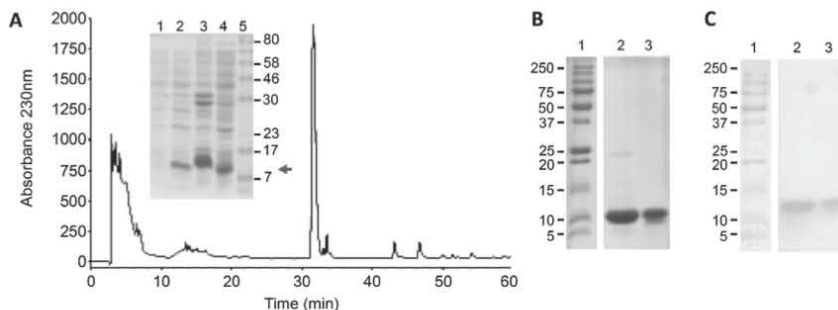


Fig. 4. Heterologous expression of HisTt7. (A, inset) SDS-PAGE of HisTt7 before (lane 1) and after (lane 2) induction with IPTG. The peptide expression is shown in inclusion bodies (lane 3) and in the soluble fraction (lane 4). A molecular protein marker is included (lane 5), and the expressed peptide is indicated with an arrow. (A) RP-HPLC after purification by NiNTA, linear gradient 0–60% B in 60 min. (B) 15% SDS-PAGE and (C) Western blot after the elution with 300 mM imidazole in Tris-HCl, pH 8.0. The HisTt7 peptide is shown (B and C, lane 2) and also after re-purification by RP-HPLC (B and C, lane 3). A molecular protein marker is also included in lane 1 of (B) and (C).

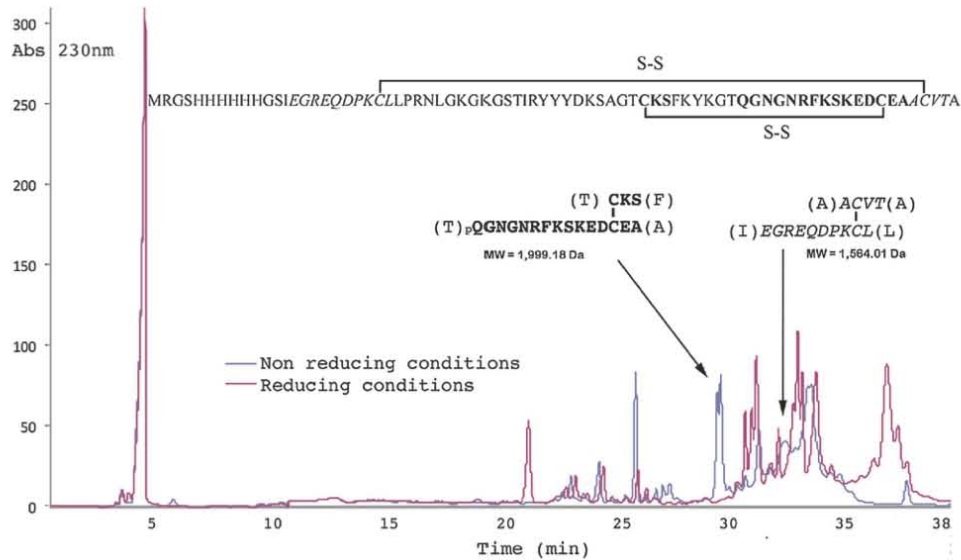


Fig. 6. Overlapping HPLC profiles of the enzymatically digested HisrTt7. Both forms of HisrTt7, oxidized and reduced, were enzymatically digested with elastase. The HPLC fractions were analyzed using mass spectrometry in order to find the covalently Cys-Cys peptide fragments.

interesting to determine biological alternatives for Tt7, because prediction models for Tt7 identified a trypsin interaction site (KGKGSXI), which would result in a peptide with protease inhibitor effect [34,35]. The dual activity as analgesic and protease of Tt7 would be concordant with that observed in Kunitz-type peptides from *Heteractis crisp* anemone [36], and from *Echinococcus granul*osus from which Kunitz-type peptides with ASIC blocking capability has been recently described [38].

On the other hand, considering that Tt7 has a small activity on Nav1.7 channels, alternative receptors such as Nav1.1, which recently had been reported to have a role in pain signaling, could be a probable candidate to test in presence of Tt7 [37]. Also, the structural relationship of Tt7 with α -dendrotoxin that shows inhibition on ASIC currents

in DGR neurons, and APETx2 that show inhibition on homomeric ASIC3 channels and ASIC1a + 3, ASIC1b + 3 and ASIC2b + 3 heteromers also suggest ASIC channels as another molecular targets for Tt7 [17,39–41].

The expression of the recombinant HisrTt7 and rTt7 confirmed the analgesia of the native Tt7 with a statistically significant group of animals. For potential therapeutic purposes, the heterologous expression of HisrTt7 might be advantageous over the chemical synthesis, since the protein is obtained in soluble form with relative high yields with respect to the synthetic or natural sources. However, the effect of histidines of HisrTt7 could be caused by the increase in the net charge of the molecule, favoring the opening of voltage-activated ion channels or in ASIC channels, so the rTt7 is an interesting skin frog peptide to study.

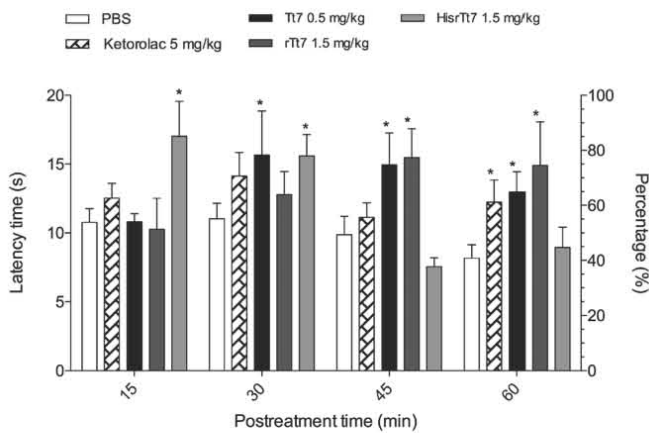


Fig. 7. Hot Plate test of native Tt7 and recombinant HisrTt7. Negative (PBS) and positive (ketorolac) controls were injected intraperitoneally. Data was analyzed statistically by multiple t-tests of PBS vs ketorolac, Tt7, rTt7 and HisrTt7. Statistical significance was considered as *p < 0.05. PBS (n = 16), Ketorolac (n = 16), Tt7 (n = 6), rTt7 (n = 4), HisrTt7 (n = 10).

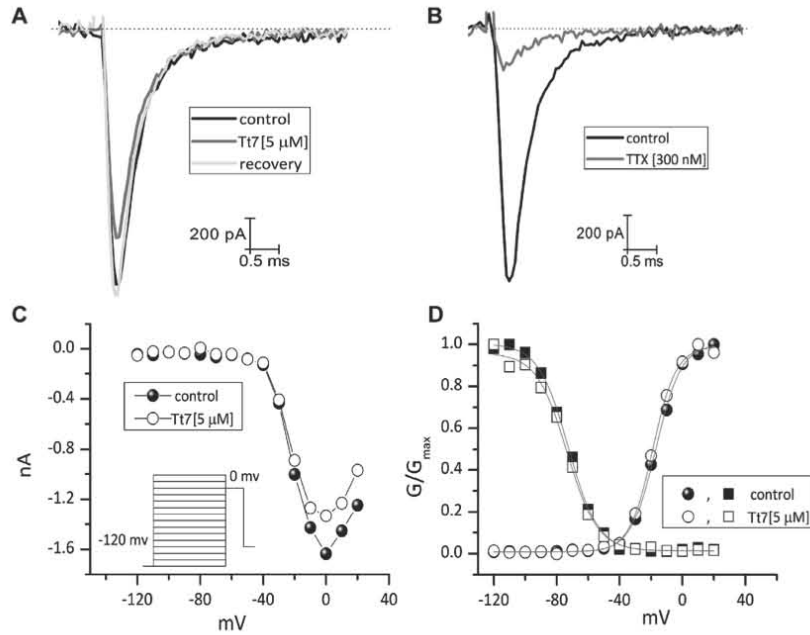


Fig. 8. Patch clamp assay of Tl7 on CHO-hNav1.7. (A) Peak current elicited at 0 mV in control (black), after application of Tl7 5 μM (dark gray), and after washing (light gray). (B) Effect of 300 nM TTX on hNav 1.7 current (experimental condition as in A). (C) Current-voltage relation in control (black sphere) and after application of Tl7 5 μM (open circle). (D) Activation and inactivation curves in control and after toxin application.

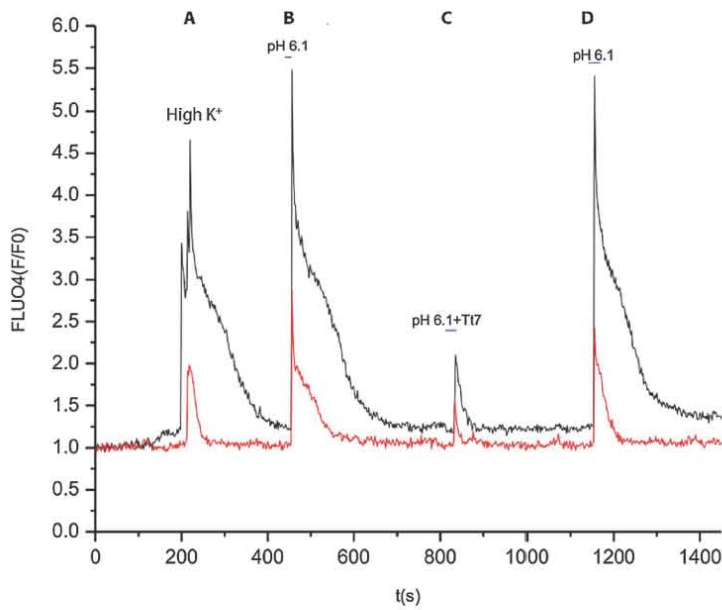


Fig. 9. Acid sensing assays of Tl7 on DRG neurons. The graph shows the fluorescence change (F/F₀) of two cells (red and black traces). (A) Application of 20 mM high potassium (B) Negative control solution at pH 6.1 (C) Presence of 100 nM Tl7 in a solution at pH 6.1 (D) Recovery/Wash of DRG neurons at pH 6.1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3
Effect of Tt7 100 nM on DRGs.

Registers	Amplitude			Parameters	
	Control	Application	Wash	AMP _{Tt7} / AMP _{CONTROL}	AMP _{WASH} / AMP _{CONTROL}
Average (n = 6)	3.6 ± 0.6	1.9 ± 0.3 [*]	3.5 ± 0.6	0.63 ± 0.1	0.96 ± 0.05

AMP means Amplitude. Data mean ± ES.

^{*} p = 0.038, control versus Tt7 application.

5. Conclusion

An analgesic peptide with a Kunitz-type structure, Tt7, was isolated for the first time from the skin secretion of a veined tree frog from the Americas. Tt7 represents an interesting molecule in the immense diversity of peptidic structures found in poisonous animal secretions with potential therapeutic applications. Tt7 showed mild blocking activity on Nav 1.7, a Nav subtype linked to nociception; moreover, Tt7 inhibited around 37% of intracellular calcium fluorescence in rat DRG neurons indicating that Tt7 could produce anti-nociceptive effects by inhibiting ASICs or membrane calcium channels. Also, we do not rule out that Tt7 could act in a concerted combination in the inhibition on several nociceptive receptors. HisTt7 was successfully expressed in a heterologous bacterial system with relative high yields, and it was shown to be active, with significant antinociceptive *in vivo* activity when assayed intraperitoneally at a 1.5 mg/kg concentration in mice. The activity displayed by Tt7 and its recombinant form, points out to the potential of Tt7 as a candidate for evaluation as a possible analgesic drug.

Conflict of interest statement

All authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: FGG GC. Performed the experiments: FGG LLCG TOP RRC EO. Performed the fluoroscopic experiments ES RV MV. Analyzed the data: FGG RRC GC. Contributed reagents/materials/analysis tools: GSL GC. Wrote the paper: FGG RRC EO GC.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Fernando Zamudio and M. en C. Emmanuel Rios for the mass spectrometry determinations. Also we acknowledge to the personnel of the Oligonucleotide Synthesis Unit in our institution for their technical support. This work received funding from the Programa de Estímulos a la Innovación-CONACYT grant number 221111 awarded to Laboratorios Silanes/UNAM, from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) grant number IN204415, and from SEP-CONACYT grant number 240616 awarded to GC. FGG is a recipient of a PhD scholarship, 324871 from CONACYT.

References

- L. Tanacs, E. Littlefair, Symptoms and treatment of acute conjunctivitis caused by skin secretions of veined tree frog (*Trachycephalus venulosus*), *Wilderness Environ. Med.* 25 (2014) 486–487, <http://dx.doi.org/10.1016/j.wem.2014.04.012>.
- A.M. Velly, S. Mohit, Epidemiology of pain and relation to psychiatric disorders, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpb.2017.05.012> (In Press).
- N.J. Saez, S. Senff, J.E. Jensen, S.Y. Er, V. Herzog, L.D. Rash, G.F. King, Spider-

- venom peptides as therapeutics, *Toxins (Basel)* 2 (2010) 2851–2871, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins2122851>.
- H.G. Schaible, A. Ebersberger, G. Natura, Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines, *Arthritis Res. Ther.* 13 (2011) 210, <http://dx.doi.org/10.1186/ar3305>.
- D. Dowell, T.M. Haegerich, R. Chou, CDC guideline for prescribing opioids for chronic pain—United States, *JAMA* 315 (2016) 1624–1645, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.1464>.
- C. Stein, M. Schäfer, H. Machelska, Attacking pain at its source: new perspectives on opioids, *Nat. Med.* 9 (2003) 1003–1008, <http://dx.doi.org/10.1038/nm908>.
- L. Codipietro, P. Maino, Aseptic arachnoiditis in a patient treated with intrathecal morphine infusion: symptom resolution on switch to ziconotide, *Neuromodulation* 18 (2015) 217–220, <http://dx.doi.org/10.1111/ner.12201>.
- S.M. Hayek, M.C. Hanes, C. Wang, I.E. Veizi, Ziconotide combination intrathecal therapy for noncancer pain is limited secondary to delayed adverse effects: a case series with a 24-month follow-up, *Neuromodul. Technol. Neural Interface* 18 (2015) 397–403, <http://dx.doi.org/10.1111/ner.12270>.
- J.G. McGivern, Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3 (2007) 69–85, <http://dx.doi.org/10.2147/ndt.2007.3.1.69>.
- M. Wang, S. Okada, Y. Murakami, K. Yokotani, Nicotine-induced noradrenaline Release from the Isolated rat stomach by activation of L- and N-type calcium channels, *Jpn. J. Pharmacol.* 83 (2000) 102–106.
- J.R. Deuis, Z. Dekan, J.S. Wingerd, J.J. Smith, N.R. Munasinghe, R.F. Bhola, W.L. Imlach, V. Herzog, D.A. Armstrong, K.J. Rosengren, F. Bosmans, S.G. Waxman, S.D. Dib-Hajj, P. Escoubas, M.S. Minett, M.J. Christie, G.F. King, P.F. Alewood, R.J. Lewis, J.N. Wood, I. Vetter, Pharmacological characterisation of the highly Nav1.7 selective spider venom peptide Pn3a, *Sci. Rep.* 7 (2017) 40883, <http://dx.doi.org/10.1038/srep40883>.
- J.K. Klint, J.J. Smith, I. Vetter, D.B. Rupasinghe, S.Y. Er, S. Senff, V. Herzog, M. Mobli, R.J. Lewis, F. Bosmans, G.F. King, Seven novel modulators of the analgesic target Nav1.7 uncovered using a high-throughput venom-based discovery approach, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 2445–2458, <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13081>.
- R. Freeman, New and developing drugs for the treatment of neuropathic pain in diabetes, *Curr. Diab. Rep.* 13 (2013) 500–508, <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-013-0396-6>.
- S. Yang, Y. Xiao, D. Kang, J. Liu, Y. Li, E. a B. Undheim, J.K. Klint, M. Rong, R. Lai, G.F. King, Discovery of a selective Nav1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 17534–17539, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1306285110>.
- N.J. Satheesh, Y. Uehara, J. Fedotova, M. Pohanka, D. Busselberg, P. Kruzliak, TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity, *Neuropeptides* 57 (2016) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2016.01.003>.
- A. Mathie, Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain, *J. Pharm. Pharmacol.* 62 (2010) 1089–1095, <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01131.x>.
- S. Diochot, A. Baron, L.D. Rash, E. Deval, P. Escoubas, S. Scarzello, M. Salinas, M. Lazdunski, A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons, *EMBO J.* 23 (2004) 1516–1525, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600177>.
- D.I. Osmakov, S.A. Kozlov, Y.A. Andreev, S.G. Koshelev, N.P. Sanamyan, K.E. Sanamyan, I.A. Dyachenko, D.A. Bondarenko, A.N. Murashev, K.S. Mineev, A.S. Arseniev, E.V. Grishin, Sea anemone peptide with uncommon β-hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 23116–23127, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.485516>.
- M. Mazzuca, C. Heurteaux, A. Alloui, S. Diochot, A. Baron, N. Volley, N. Blondeau, P. Escoubas, A. Gelot, A. Cupo, A. Zimmer, A.M. Zimmer, A. Eschalier, M. Lazdunski, A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms, *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 943–945, <http://dx.doi.org/10.1038/nn1940> [pii]v10.1038/nn1940.
- M. Salinas, T. Besson, Q. Delettre, S. Diochot, S. Boulakirba, D. Douguet, E. Lingueglia, Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgins-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 13363–13373, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.561076>.
- L. Wei, L. Dong, T. Zhao, D. You, R. Liu, H. Liu, H. Yang, R. Lai, Analgesic and anti-inflammatory effects of the amphibian neurotoxin, antioxin, *Biochimie* 93 (2011) 995–1000, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.02.010>.
- D. You, J. Hong, M. Rong, H. Yu, S. Liang, Y. Ma, H. Yang, J. Wu, D. Lin, R. Lai, The first gene-encoded amphibian neurotoxin, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 22079–22086, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.013276>.
- J. Faivovich, C.F.B. Haddad, P.C.A. Garcia, D.R. Frost, J.A. Campbell, W.C. Wheeler, Systematic Review of the Frog Family Hylidae, With Special Reference To Hylinae: Phylogenetic Analysis and Taxonomic Revision, USA, (2005), [http://dx.doi.org/10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:SR0TFJ\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:SR0TFJ]2.0.CO;2).
- O. Villa-Hernández, L. Hernández-Orihuela, M.C. del Rodríguez, F. Zamudio-Zúñiga, R. Castro-Franco, V. Pando, C.V.F. Batista, Novel antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the Mexican frog *Hyla eximia*.pdf, *Protein Pept. Lett.* 16 (2009) 1371–1378.
- E.P. Meneses, O. Villa-Hernández, L. Hernández-Orihuela, R. Castro-Franco, V. Pando, M.B. Aguilar, C.V.F. Batista, Peptidomic analysis of the skin secretions of the frog *Pachymedusa dacnicolor*, *Amino Acids* 40 (2011) 113–122, <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-010-0564-9>.
- J. Wu, H. Liu, H. Yang, H. Yu, D. You, Y. Ma, H. Ye, R. Lai, Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 4230–4240, <http://dx.doi.org/10.1021/pr200393t>.

- [27] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed., National Academies Press (US), Washington (DC), 2011, http://dx.doi.org/10.1163/1573-3912.islam.DUM_3825.
- [28] A.W. Bannon, A.B. Malmberg, Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents, *Curr. Protoc. Neurosci.* (2007), <http://dx.doi.org/10.1002/0471142301.ns0809s41> Chapter, 8 Unit 8.9.
- [29] C. Louis-Jeune, M.A. Andrade-Navarro, C. Perez-Iratxeta, Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma* 80 (2012) 374–381, <http://dx.doi.org/10.1002/prot.23188>.
- [30] A. Garza, O. López-Ramírez, R. Vega, E. Soto, The aminoglycosides modulate the acid-sensing ionic-channel (ASIC) currents in dorsal-root ganglion neurons from the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332 (2010) 489–499, <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.109.152884>.
- [31] A. Heibges, H. Glaczinski, A. Ballvora, F. Salamini, C. Gebhardt, Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.), *Mol. Genet. Genomics* 269 (2003) 526–534.
- [32] Z. Chen, F. Luo, J. Feng, W. Yang, D. Zeng, R. Zhao, Z. Cao, M. Liu, W. Li, L. Jiang, Y. Wu, Genomic and structural characterization of kunitz-type peptide ImKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins, *PLoS One* 8 (2013) 1–10, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060201>.
- [33] L. Ding, X. Wang, H. Liu, M. San, Y. Xu, J. Li, S. Li, Z. Cao, W. Li, Y. Wu, Z. Chen, A new Kunitz-type plasmin inhibitor from scorpion venom, *Toxicon* 106 (2015) 7–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.004>.
- [34] C.B.F. Mourão, E.F. Schwartz, Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals, *Mar. Drugs* 11 (2013) 2069–2112, <http://dx.doi.org/10.3390/md11062069>.
- [35] X. Chen, H. Wang, Y. Shen, L. Wang, M. Zhou, T. Chen, C. Shaw, Kunitzins: prototypes of a new class of protease inhibitor from the skin secretions of European and Asian frogs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477 (2016) 302–309, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.062>.
- [36] V.M. Tabakmakher, O.V. Sintsova, O.N. Krivoschapko, E.A. Zelepuga, M.M. Monastymaya, E.P. Kozlovskaya, Analgesic effect of novel Kunitz-type polypeptides of the sea anemone *Heteractis crispata*, *Dokl. Biochem. Biophys.* 461 (2015) 80–83, <http://dx.doi.org/10.1134/S1607672915020052>.
- [37] M. Fló, M. Margenat, L. Pellizza, M. Graña, R. Durán, A. Báez, E. Salceda, E. Soto, B. Alvarez, C. Fernández, Functional diversity of secreted cestode kunitz proteins: inhibition of serine peptidases and blockade of cation channels, *PLoS Pathog.* 13 (2) (2017) e1006169, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006169>.
- [38] J.D. Osteen, V. Herzig, J. Gilchrist, J.J. Emrick, C. Zhang, X. Wang, J. Castro, S. Garcia-Caraballo, L. Grundy, G.Y. Rychkov, A.D. Weyer, Z. Dekan, E.A.B. Undheim, P. Alewood, C.L. Stucky, S.M. Brierley, A.I. Basbaum, F. Bosmans, G.F. King, D. Julius, Selective spider toxins reveal a role for Na(v)1.1 channel in mechanical pain, *Nature* 534 (2016) 494–499, <http://dx.doi.org/10.1038/nature17976>.
- [39] A. Báez, E. Salceda, M. Fló, M. Graña, C. Fernández, R. Vega, E. Soto, alpha-Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat, *Neurosci. Lett.* 606 (2015) 42–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.034>.
- [40] A. Baron, S. Diochot, M. Salinas, E. Deval, J. Noël, E. Lingueglia, Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels, *Toxicon* 75 (2013) 187–204, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.008>.
- [41] S. Diochot, A. Baron, M. Salinas, D. Douguet, S. Scarzello, A.S. Dabert-Gay, D. Debayle, V. Friend, A. Alloui, M. Lazdunski, E. Lingueglia, Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain, *Nature* 490 (2012) 552–555, <http://dx.doi.org/10.1038/nature11494>.

12.23. Tesis de licenciatura dirigida



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Identificación de actividades biológicas en las secreciones de piel de los anfibios mexicanos *Trachycephalus typhonius*, *Smilisca baudinii* y *Dermophis mexicanus*

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

SELMA MARGARITA JURADO REYES

DIRECTORA:

FRANCIA GARCÍA GARCÍA

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2013

12.24. Solicitud de patente de Tt7



SOLICITUD PCT CAPÍTULO I

Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI.

Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
 Dirección Divisinal de Patentes

Solicitud Expediente: **MX/a/2015/016560**
 Fecha: 2/DIC/2015 Hora: 13:35:11
 Folio: **MX/E/2015/098180** 650008



Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): **LABORATORIOS SILANES, S.A. DE C.V. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

2) Nacionalidad (es): **MEXICANA (AMBAS)**

3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: **AMORES 1304, COLONIA DEL VALLE, C.P. 03100**

Población, Estado y País: **DEL. BENITO JUÁREZ, MÉXICO, D.F., MÉXICO**

4) Teléfono (clave): **(55) 54883700** 5) Fax (clave):

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre(s): **GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE, FRANCIA GARCÍA GARCÍA, TIMOTEO CELSO OLAMENDI PORTUGAL, GABRIEL SANDOVAL LÓPEZ**

7) Nacionalidad (es): **MEXICANA (TODOS)**

8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: **BABILONIA 17, COLONIA ANALCO, C.P. 62166**

Población, Estado y País: **CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO**

9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)

11) Nombre(s): **ALFONSO DE ROBINA LÓPEZ DE SILANES** 12) R G P:

13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: **MONTECITO No. 38, PISO 42, OFICINA 2, COL. NÁPOLES, C.P. 03810**

Población, Estado y País: **DEL. BENITO JUÁREZ, MEXICO D.F., MÉXICO** 14) Teléfono (clave): **(55) 9007012** 15) Fax (clave): **(55) 90007015**

16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:
LUISA IVONNE OCHOA REYES, ARIEL FUENTES CARRASCO, ANA HAYDEE FONTES MARROQUÍN, MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ ORTIZ, MARIA GUADALUPE RÍOS SÁNCHEZ, DIANA MARICELA AGONIZANTE ROJAS, LUIS EZEQUIEL ZAMBRANO ISLAS, JUAN CARLOS CHÁVEZ FUENTES, JORGE ARIEL GALVAN PASTRANA, ALEXANDRA LIZETH ORTIZ GUZMAN

17) Denominación o Título de la Invención:
PROTEINA ANALGÉSICA AISLADA DE LA SECRECIÓN DE LA RANA TRACHYCEPHALOUS VENULOSUS

18) Fecha de divulgación previa
 Día Mes Año

19) Clasificación Internacional **uso exclusivo del IMPI**

20) Divisinal de la solicitud
 Número Figura jurídica

21) Fecha de presentación
 Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada:
 País Día Mes Año No. de serie

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
X 1	Comprobante de pago de la tarifa		Documento de cesión de derechos
X 35	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
X 9	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
X 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
X	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
		46	TOTAL DE HOJAS

Observaciones:
SE ANEXA LISTADO DE SECUENCIAS

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

ALFONSO DE ROBINA LÓPEZ DE SILANES **MEXICO, D.F. A 27 DE NOVIEMBRE DE 2015**
 Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

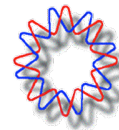
12.25. Carteles presentados en congresos

XV Congreso de Biotecnología y Bioingeniería de la SMBB Cancún, México, del 23 a 28 de junio de 2013



BIOACTIVE COMPOUNDS COLLECTED FROM SKIN FROG SECRETIONS: FINDING NEW ANALGESIC PEPTIDES

Francia García, Herlinda Clement and Gerardo Corzo
Instituto de Biotecnología, UNAM, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Apartado Postal 510-3,
Cuernavaca Morelos, 61500, México; franciag@ibt.unam.mx



SUMMARY

Amphibian skin secretions are a rich source of bioactive components such as antimicrobials, peptides, toxins, alkaloids and enzymes. Recently, there were discovered new types of analgesic peptides from the species *Hyla annectans* and *Hyla simplex*, which were named anntoxins and analgesins, respectively⁽¹⁾. Therefore, it is in our interest to find similar compounds using the skin secretions from unexplored amphibians in Mexico. In this work, we look into three orders of amphibians: caudata as salamanders, sirens and newts (Figure 1a); gymniphonia as caecilians (Figure 1b), and anura that include frogs and toads (Figure 1c). In particular, the last two orders represent species, which had not been investigated yet in México⁽²⁾. Our goal was to find novel bioactive molecules, particularly, analgesic peptides, and create a genomic libraries to understand the diversity of protein secretions in animals representing these three groups of amphibians.

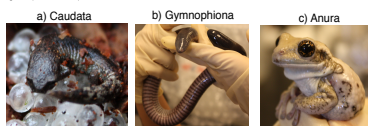
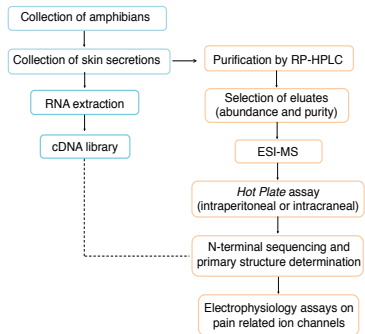


Figure 1. Amphibians used in this work. a) *Pseudoeurycea cephalica* a salamander, b) *Dermophis mexicanus* a caecilian, c) *Trachycephalus venulosus* a frog.

METHODOLOGY



DISCUSSION

The skin secretion of each amphibian group was fractionated using RP-HPLC. Although several fractions were obtained, only one protein from *T. venulosus* was positive in the analgesia test.

The protein fraction (F7) had a molecular mass of 6,508.4 Da suggesting a primary structure of 59-61 aa. The N-terminal amino acid composition of the first 20 aa was EQDPPKLLPRNLGKGGSTI..., which is quite similar to the reported analgesic peptides from the anntoxin family secreted by *H. annectans*.

Based on the first aa of the N-terminal sequence of F7 degenerate oligonucleotides were designed in order to obtain the complete F7 RNA transcript and to find out the full protein sequence.

CONCLUSION

We found out an analgesic peptide from the skin secretion of *Trachycephalus venulosus*. This is the first report of an analgesic peptide from the anntoxin family found in a frog from Mexico.

The protein amounts in the secretions of salamanders and caecilians were limited; so we think it would be better to use molecular approaches to look for bioactive compounds.

RESULTS

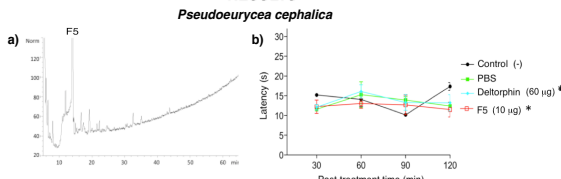


Figure 2. *Pseudoeurycea cephalica* skin secretion. a) RP-HPLC, column C_{18} , gradient 10-80% acetonitrile + 0.1% TFA, 1 mL/min flow (230 nm). b) Hot Plate assay, intraperitoneal injection, CD1 strain 18-20 g, 3 mice per group, (*ANOVA one-way; $p > 0.05$).

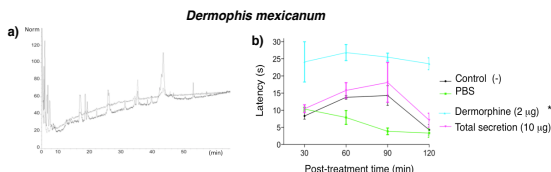


Figure 3. *Dermophis mexicanus* skin secretion. a) RP-HPLC, column C_{18} , gradient 0-60% acetonitrile + 0.1% TFA, 1 mL/min flow (230 y 280 nm). b) Hot Plate assay, intracranial injection; CD1 strain 18-20 g, 3 mice per group (ANOVA one-way; $p < 0.05$).

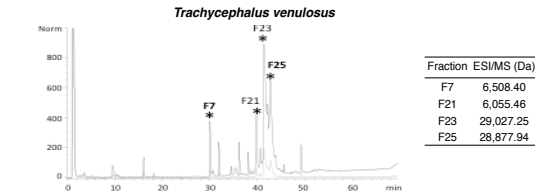


Figure 4. *Trachycephalus venulosus* skin secretion RP-HPLC, column C_{18} , gradient 0-60% acetonitrile + 0.1% TFA, 1 mL/min flow, 230 y 280 nm. (*) eluates tested to Hot plate. The table shows molecular mass of these fractions.

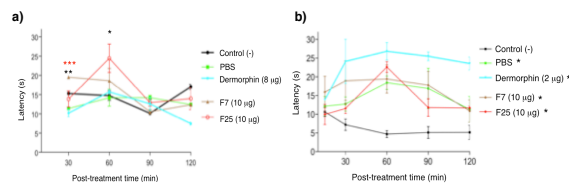


Figure 5. Hot Plate assay. a) Intraperitoneal injection; ANOVA two-way (*) $p < 0.05$ to F25, (**) $0.01 < p < 0.2$ to F7 comparing with negative control, (***) $0.05 < p < 0.1$ to F7 comparing with PBS. b) Intracranial injection; (*) ANOVA one-way; $p < 0.05$. Both experiments: CD1 strain 18-20 g, 3 mice per group.

F7 (*T. venulosus*) -----EQDPPKLLPRNLGKGGSTI
 CTAR58 (CTAR58)_SHEOB-Anntoxin 1 MDTVFFLVLAAGLLFLLSEAGDQDRLNRYGGSSFTNYTKATSSKTFPRVGGGNGRFFKLEEEATLVTAE
 H636L5 (H636L5)_SHEOB-Anntoxin55 MDTVFFLVLAAGLLFLLSEAGDQDRLNRYGGSSFTNYTKATSSKTFPRVGGGNGRFFKLEEEATLVTAE
 H636L2 (H636L2)_SHEOB-Anntoxin53 MDTVFFLVLAAGLLFLLSEAS-DYRDLNRYGGSSFTNYTKATSSKTFPRVGGGNGRFFKLEEEATLVTAE
 H636L4 (H636L4)_SHEOB-Anntoxin52 MDTVFFLVLAAGLLFLLSEAAADRDLNRYGGSSFTNYTKATSSKTFPRVGGGNGRFFKLEEEATLVTAE
 H636L1 (H636L1)_SHEOB-Anntoxin51 MDTVFFLVLAAGLLFLLSEAS-DYRDLNRYGGSSFTNYTKATSSKTFPRVGGGNGRFFKLEEEATLVTAE
 H636L3 (H636L3)_SHEOB-Anntoxin54 MDTVFFLVLAAGLLFLLSEAS-DYRDLNRYGGSSFTNYTKATSSKTFPRVGGGNGRFFKLEEEATLVTAE

Figure 6. Alignment of sequences with six analgesic peptides identified in *H. annectans* skin secretions, a Japanese frog.

References

- Dewen Y., Jing H., Mingqiang R., Haining Y., Songping L., Yufang M., Hallong Y., Jing W., Donghai L. y Ren L. (2009) *J. Biol. Chem.* 284 (33): 22079-22086.
- Ferron Schwartz E. N., Schwartz C. A., Sabben A., Larga S. W. R. y Garcia Mendes E. (1999) *Toxicol.* 37 (1): 47-54.
- Jing, W., Han L., Hallong Y., Haining Y., Dewen Y., Yufang M., Huahu Y. y Ren L. (2011) *J Proteome Res.* 10 (9): 4230-4240.

Acknowledgements. This work was supported by a grant from CONACYT 153606 to GC and MSc. F. Garcia receives a doctoral scholarship 324871 from CONACYT.

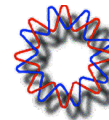
10th IST Asia Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins Changsha, China, del 14 al 18 de junio de 2014



BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SKIN SECRETIONS FROM MEXICAN FROGS

Francia Garcia¹, Herlinda Clement¹, Selma Jurado¹ and Gerardo Corzo¹

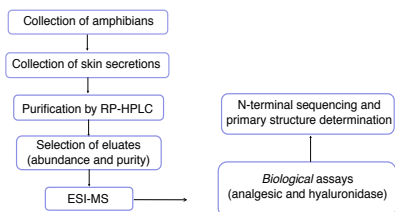
¹Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico. E-mail francia@ibt.unam.mx



SUMMARY

The skin secretions of amphibians play an important role in their external defense system. The components of such secretions contain four main chemical groups: 1) proteins and peptides, 2) biogenic amines, 3) alkaloids and 4) steroids. The first group is of interest because of their biotechnological applications. The biological activities of this group include peptide toxins, phospholipases, antimicrobial peptides, and analgesic compounds, among others. In this work, we obtained the skin secretions of two species of frog, three species of salamander and a caecilian. We separate the skin secretions by RP-HPLC and we tested the biological activities (analgesia, hyaluronidase, protease, phospholipase, antimicrobial) of the most abundant fractions. The salamander and caecilians fractions did not show significant biological activities. However, the skin secretion of one of the frogs yielded a protein with hyaluronidase activity. Also, a peptidic molecule, which showed analgesic activity via intraperitoneal administration was found. The total RNA extraction from the amphibian skins was performed to create genomic libraries to find isoforms of the hyaluronidases and analgesic compounds. These proteins could be used directly as pain control or as spread factors molecules or they could be used to design fresh pharmaceutical drugs.

METHODOLOGY



RESULTS

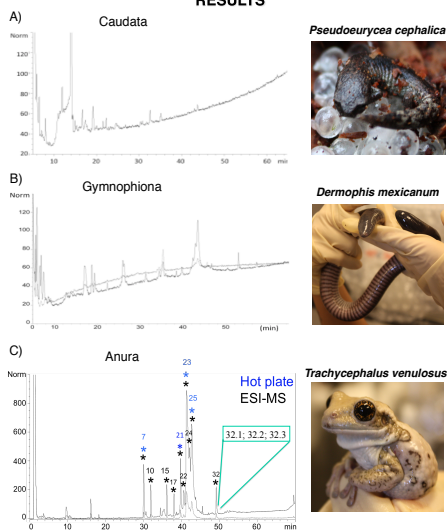


FIGURE 1. RP-HPLC of skin secretions. A) *Pseudoerycea cephalica*, column C₁₈, gradient 10-80% acetonitrile + 0.1% TFA, 1mL/min flow (230 nm). B) *Dermophis mexicanus*, column C₁₈, gradient 0-60% acetonitrile + 0.1% TFA, 1mL/min flow (230 y 280 nm). C) *Trachycephalus venulosus*, column C₁₈, gradient 0-60% acetonitrile + 0.1% TFA, 1mL/min flow, 230 y 280 nm; (*) Molecular Weight determined to these fractions; (†) eluates tested to Hot plate; box green, sub-fractions from eluate 32.

TABLA 1. Molecular Weight and N-Terminal from *T. venulosus* fractions

FRACTION	MOLECULAR WEIGHT	N-TERMINAL
7	6,509.77; 6,923.34	EQDPKLLPRLNLRKKGSTL
10	10,145.47	SQNPKY / SQTKYNPNYKNNITGVPKVYVQVVEV
15	1,845.05*; 2,260.28; 3,691.09	----
17	14,448.84*; 14,430.84	----
21	6,055.46*; 6,469.66; 6,883.87	----
22	8,565.62; 14,991.45*	AFPTVTGFKPSYKFEAANT
23	29027.25	DEIKTVPTSDPEVWAXIQG
24	22,116.45*; 22,288.65	----
25	28,877.94*; 28,925.94	----
32	ND	----

FT (*T. venulosus*) -----EQDPKLLPRLNLRKKGSTL
 CTAKS8 (CTAKS8_3NEOB-Anttoxin1) MTSVVFVLAAGLLFLSEASDQR-QLSRVYGGSSFTNYTIDKATNS:KTFYRGTGNGNRFTLIE:CEATVYAE
 H6SW13 (H6SW13_3NEOB-Anttoxin5) MTSVVFVLAAGLLFLSEASDQR-QLSRVYGGSSFTNYTIDKATNS:KTFYRGTGNGNRFTLIE:CEATVYAE
 H6SW12 (H6SW12_3NEOB-Anttoxin3) MTSVVFVLAAGLLFLSEAS-DYR-NLSRSGSSSFTNYTIDKATNS:KTFYRGTGNGNRFTLIE:CEATVYAE
 H6SW14 (H6SW14_3NEOB-Anttoxin2) MTSVVFVLAAGLLFLSEASDQR-QLSRVYGGSSFTNYTIDKATNS:KTFYRGTGNGNRFTLIE:CEATVYAE
 H6SW11 (H6SW11_3NEOB-Anttoxin1) MTSVVFVLAAGLLFLSEAS-DYR-NLSRSGSSSFTNYTIDKATNS:KTFYRGTGNGNRFTLIE:CEATVYAE
 H6SW13 (H6SW13_3NEOB-Anttoxin4) MTSVVFVLAAGLLFLSEAS-DYR-NLSRSGSSSFTNYTIDKATNS:KTFYRGTGNGNRFTLIE:CEATVYAE
 : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

FIGURE 2. Alignment of sequences with six analgesic peptides identified in *H. annectans* skin secretions, a Japanese frog and fraction 7 (F7) from *T. venulosus*.

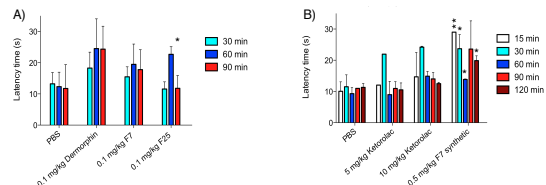


FIGURE 3. Hot plate assays. A) Fracción 7 (F7) and 25 (F25) from *T. venulosus*, via intracranial; an analgesic synthetic peptide from frog (dermorphin) as positive control. ANOVA, *p<0.05; 3 mice CD1, 18-20 g. B) F7 synthetic tested via intraperitoneal; ketorolac as positive control. ANOVA, *p<0.05; **p<0.001; n=1. 2 mice CD1, 28-30 g.

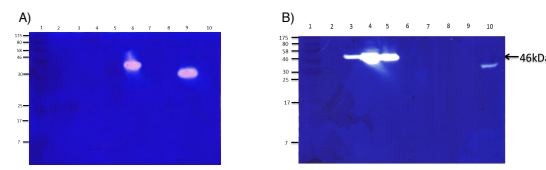


FIGURE 4. SDS-PAGE 12.5% with Hyaluronic Acid. A) MW (lane 1); Total secretion from *T. venulosus*, 10µg (lane 6); total venom from *B. vagans* as positive control, 3.5 µg (lane 9). Other amphibian skin secretions was tested, but not showed activity with 10 µg (lane 4 and 5). B) MW (lane 1); sub-fractions 32.1, 32.2 (lane 4) and 32.3 (lane 5) from *T. venulosus* tested with 5 µg; total venom from *B. vagans* as positive control, 0.7 µg (lane 9). Arrow show MW of these sub-fractions.

CONCLUSIONS

We found out an analgesic peptide from the skin secretion of *Trachycephalus venulosus*. This is the first report of an analgesic peptide from the anttoxin family found in a frog from Mexico Also, we identify a protein of 46 kDa with hyaluronidase activity. The protein amounts in the secretions of salamanders and caecilians were limited; so we think it would be better to use molecular approaches to look for bioactive compounds.

References

- Dewen Y., Jing H., Mingqiang R., Haining Y., Songping L., Yufang M., Hailong Y., Jing W., Donghai L. y Ren L. (2009) *J Biol. Chem.* 284 (33): 22079-22086.
- Feroni Schwartz E. N., Schwartz C. A., Sebben A., Largura S. W. R. y Garcia Mendes E. (1999) *Toxicol.* 37 (1): 47-54.
- Jing, W., Han L., Hailong Y., Haining Y., Dewen Y., Yufang M., Huahu Y. y Ren L. (2011) *J Proteome Res.* 10 (9): 4230-4240.

Acknowledgements. This work was supported by a grant from CONACYT INFR-2014 No. 224494 to GC and MS. F. Garcia receives a doctoral scholarship 324871 from CONACYT

18th World Congress of the International Society on Toxinology Oxford, Inglaterra del 25 al 30 de septiembre de 2015



IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PEPTIDE WITH ANTI-NOCEPTIVE EFFECT ISOLATED FROM THE SKIN SECRETION OF AN AMERICAN VEINED TREE FROG

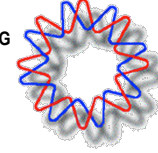
Francía García¹, Ligia Corrales-García², Timoteo Olamendi-Portugal¹, Ernesto Ortiz¹, Gabriel Sandoval³, Gerardo Corzo¹

¹Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, C.P. 61500, Cuernavaca, Morelos.

²Departamento de Alimentos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, AA 1226 Medellín, Colombia.

³Laboratorios Silanes S.A. de C.V., Amores 1304, Col. Del Valle, Distrito Federal, México.

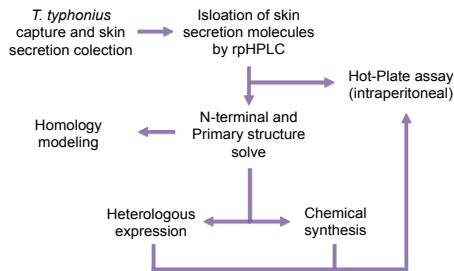
Email addresses: francia@bt.unam.mx, ligialu@gmail.com, timoteo@bt.unam.mx, erne@bt.unam.mx, gsandoval@silanes.com.mx, corzo@bt.unam.mx



ABSTRACT

The components of the skin secretion of the Mexican frog *Trachycephalus typhonius* exhibited an antinociceptive effect on CD1 mice. The components were isolated with a C_{18} reverse-phase HPLC column by a linear gradient that employs aqueous solutions of 0.1% TFA from 0 to 60% acetonitrile. After protein fractionation the molecular mass of each component was determined by ESI-MS, and they were tested using the Hot-Plate method. The mice were injected intraperitoneally. A relevant proteinaceous molecule with antinociceptive action was found and named F7. The primary structure of F7 was elucidated by direct N-terminal Edman degradation, which yielded the first 16 residues. Later, F7 was enzymatically digested by Asp-N endoprotease. The peptide fractions from the enzymatic digestion of F7 were separated, the molecular masses determined and N-terminal sequenced. The results showed that F7 comprises 59 residues and two disulphide bridges. F7 belongs to the antioxin family and represents the first antioxin example obtained in the American continent. F7 was chemically synthesized and also expressed heterologously; yet, the best yield was obtained by recombinant expression. The recombinant peptide His-F7 presented the same biochemical properties as the native peptide. The best effect of His-F7 was observed at 2.5 mg/kg on mice after 15 min post administration. The analgesic effect was higher than that of the AINS ketorolac; however, it presented a lower effect at 60 minutes.

METHODOLOGY



RESULTS

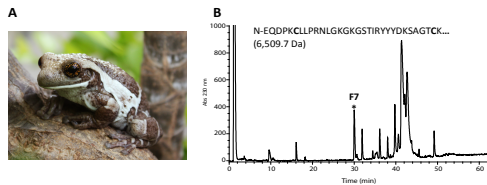


FIGURE 1. Separation of skin frog secretions by rpHPLC. (A) *T. typhonius* frog. (B) rpHPLC of *T. typhonius* skin secretions. Linear gradient from 0 to 60% of acetonitrile in 60 min. 0.5 mg of F7 was injected. The N-terminal and MW of F7 is indicated.

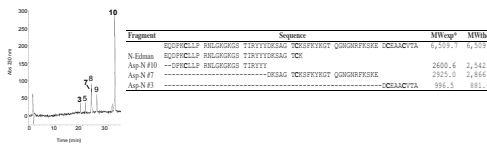


FIGURE 2. Elucidation of primary structure of F7. Fragments of F7 purified by rpHPLC after a proteolytic digestion with Asp-N endoprotease (pH). The table shows molecular weight of each fragment, experimental (reduced and carboxymethylated) and theoretical (oxidized), as well as N-end of each one (right). Linear gradient from 0 to 60% of acetonitrile in 60 min.

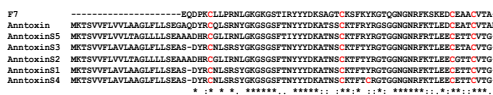


FIGURE 3. Multiple sequence alignment with CLUSTAL W. Identify of sequence of F7 and antioxin's family (mature peptide). This alignment includes the signal peptide of antioxins (first 21 residues). Identical residues (T), semi-conservative substitutions (I) and conservative substitutions (L).

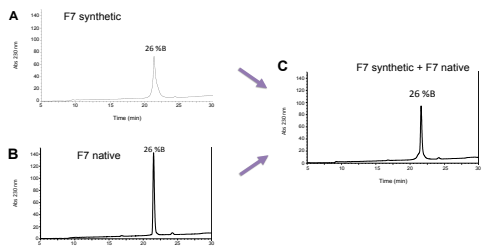


FIGURE 4. Co-elution assay of F7 synthetic and native. (A) F7 synthetic and oxidized (6 µg). (B) F7 native (6 µg) and (C) F7 synthetic and native (3 µg each). Linear gradient from 10 to 60% of acetonitrile in 50 min.

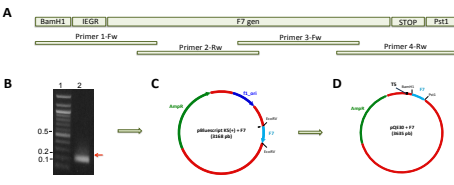


FIGURE 5. Design and construction of synthetic F7 gene. (A) Megaprimers strategy was used to construct the F7 gene, considering BamHI and PstI as restriction sites, and adding the recognition sequence to Factor Xa. (B) gen assembly (lane 2) and molecular marker (lane 1). (C) pBluescript KS+ cloning vector and (D) pQE30 expression vector.

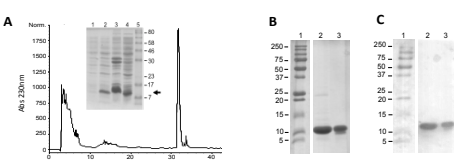


FIGURE 6. Heterologous expression of His-F7. (A) insert SDS-PAGE of His-F7 before (lane 1) and after (lane 2) induction with IPTG. The peptide expression is shown in inclusion bodies (lane 3) and in the soluble fraction (lane 4). A molecular protein marker is included (lane 5), the expressed peptide is indicated with an arrow. (A) rpHPLC after purification by NNTA, linear gradient 0-60% B in 60 min. (B) 15% SDS-PAGE and (C) Western blot after the elution with 300 mM imidazole in Tris-HCl, pH 8.0. The His-F7 peptide is shown (B and C, lane 2) and also after re-purification by rpHPLC (B and C, lane 3). A molecular protein marker is also included in lane 1 of (B) and (C).

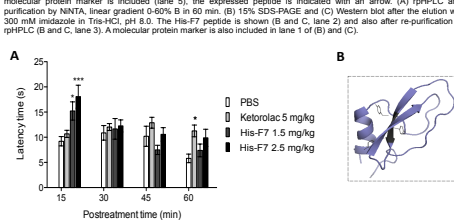


FIGURE 7. Hot Plate test for His-F7 and modeling of F7. (A) Negative (PBS) and positive (ketorolac) controls were also injected intraperitoneally. Data was analyzed statistically by a two-way ANOVA and the Bonferroni test; statistical significance was considered as *p < 0.05 and ***p < 0.001. (B) Homology modeling of F7 using Modeller software.

CONCLUSION

A novel analgesic peptide with Kunitz-type structure was isolated from the skin secretion of *T. typhonius* frog from the Americas. The F7 peptide was successfully expressed in a heterologous bacterial system with high yields, and was shown to be active, with significant antinociceptive activity in mice. The activity displayed by F7 and its recombinant form, points out to the potential of F7 as a candidate for evaluation as a possible analgesic drug.

Acknowledgements: This work was also financed by grants from DGAPA-UNAM No. IN204415, SEP-CONACYT No. 240616 and Silanes-CONACYT FID-No. 221111. MSc. F. García receives a doctoral scholarship 324871 from CONACYT.

REFERENCES

- Yeo, Q. et al. The first gene-encoded amphibian neuropeptide. *J. Biol. Chem.* 284, 22079–22086 (2009).
- Wu, J. et al. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. *J. Proteome Res.* 10, 4230–4240 (2011).