

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS COMPONENTES TOXICOS DEL VENENO DEL ALACRAN SUDAMERICANO TITYUS SERRULATUS

1987

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;  
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA)  
P R E S E N T A

GUSTAVO RICARDO RODE SANCHEZ

MEXICO, D. F.

1984



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.

Presidente: DRA. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ  
Vocal: DR. LOURIVAL D. POSSANI POSTAY  
Secretario: DR. ALEJANDRO BAYON CASO  
Suplente: DR. JORGE VAZQUEZ  
Suplente: DR. ADOLFO GARCIA SAINZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

Sustentante:

Q.F.B. GUSTAVO RICARDO RODE SANCHEZ



Asesor del tema:

DR. LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY



## R E S U M E N

El estudio comparativo de lotes de veneno del alacrán sudamericano Tityus serrulatus (donación del I. Butantan, Brasil) provenientes de regiones restringidas distantes entre sí, permitió comprobar la representatividad de las muestras del veneno utilizado hasta ahora por nuestro grupo en el aislamiento y caracterización de los componentes tóxicos del mismo.

La homogeneidad del veneno se demostró mediante las siguientes técnicas: estudio de  $DL_{50}$  (dosis letal media), electroforesis en geles de poliacrilamida, inmunoelectroforesis y cromatografía en columna.

Mediante técnicas de cromatografía de exclusión y de intercambio iónico, se aislaron en forma pura cuatro componentes tóxicos del veneno, las toxinas II-11, III-8, III-10 y IV-5, de las cuales la primera y la tercera parecen corresponder a una sola toxina por análisis de aminoácidos.

En esta tesis se completó la secuencia de la toxina III-10 (Possani et al., 1981c, 1983) en su extremo C-terminal para el cual se propuso la siguiente secuencia: Tre-Asn-Lis-Cis-OH.

Finalmente se realizó la síntesis en fase sólida del pentadecapéptido N-terminal de la misma toxina, el cual aunque parece estar involucrado en el sitio activo de ésta, no denota toxicidad en ratones inyectado en forma soluble; sin embar

go, por otra parte, parece conformar un determinante antigénico importante, con propiedades inmunogénicas cuando se aplica en ratones después de haberlo polimerizado con glutaraldehído.

## NOMENCLATURA DE LOS AMINOACIDOS COMUNES

A	Alanina	Ala
C	Cisteína	Cis
D	Acido aspártico	Asp
E	Acido glutámico	Glu
F	Fenilalanina	Fen
G	Glicina	Gli
H	Histidina	His
I	Isoleucina	Ileu
K	Lisina	Lis
L	Leucina	Leu
M	Metionina	Met
N	Asparagina	Asn
P	Prolina	Pro
Q	Glutamina	Gln
R	Arginina	Arg
S	Serina	Ser
T	Treonina	Tre
V	Valina	Val
W	Triptofano	Trp
Y	Tirosina	Tir

# I N D I C E

	Pág.
I.- INTRODUCCION	1
1. Generalidades .....	1
2. Los alacranes y su veneno .....	2
3. Toxinas polipeptídicas de los venenos de alacrán	3
3.a Aislamiento y caracterización .....	3
3.b Propiedades estructurales .....	7
3.c Actividad biológica .....	8
4. Las toxinas de alacrán y la Neurobiología .....	10
4.a Canales de sodio .....	11
4.b Canales de potasio .....	13
5. El veneno del alacrán sudamericano <u>T. serrulatus</u> (Lutz y Mello). .....	13
6. Propósito de esta tesis	16
II.-MATERIALES Y METODOS	17
1. Materiales .....	17
2. Pruebas de toxicidad .....	18
3. Purificación de las toxinas .....	19
4. Análisis de aminoácidos .....	20
5. Reducción y carboximetilación	20
6. Electroforesis .....	21
7. Digestión enzimática .....	22
8. Secuencia de aminoácidos .....	23
9. Síntesis de péptidos en fase sólida .....	26
10. Inmunolectroforesis .....	28
11. Ensayos inmunológicos con el péptido sintético ...	29

III.- RESULTADOS .....	31
1. Estudio comparativo del veneno de <u>I. serrulatus</u> . proveniente de diferentes localidades geográfi- cas. ....	31
2. Purificación de varias toxinas del veneno de <u>I.</u> <u>serrulatus</u> . ....	37
3. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la toxina III-10. ....	48
4. Síntesis de la región N-terminal correspondien- te a la toxina III-10. ....	55
5. Inmunización de ratones con el pentadecapéptido N-terminal sintético .....	60
IV.-DISCUSION .....	63
a. Homogeneidad del veneno de alacrán <u>I. serrulatus</u> .	63
b. Purificación y caracterización parcial de algu- nas toxinas de <u>I. Serrulatus</u> .....	64
c. Secuencia de aminoácidos de una toxina del vene no de <u>I. serrulatus</u> . ....	66
d. Síntesis del péptido N-terminal. ....	72
e. Propiedades inmunológicas del péptido sintético.	73
V.- PERSPECTIVAS FUTURAS .....	75
VI.-CONCLUSIONES .....	77
VII.- AGRADECIMIENTOS .....	78
VIII.BIBLIOGRAFIA .....	78

## I.- INTRODUCCION

### 1. Generalidades

Los venenos de serpientes y alacranes son mezclas de diversos tipos de sustancias, principalmente proteínas, que actúan sinérgicamente.

El surgimiento y la utilización biológica de los venenos animales como mecanismo de defensa y de obtención de alimentos han sido el producto de un largo proceso de convergencia evolutiva que se ha llevado al cabo en la Naturaleza como una respuesta adaptativa de variadas especies biológicas a los retos del medio ambiente.

Si bien el aspecto médico en el estudio de los venenos animales fue en el inicio la motivación principal del mismo, dado el peligro que involucran para la vida humana, el descubrimiento paulatino de su constitución aumentó el interés de la comunidad científica hacia ellos, haciendo posible el que bioquímicos, fisiólogos, inmunólogos y farmacólogos enriquecieran el conocimiento a nivel molecular de los venenos, incluyendo su modo de acción (Zlotkin, 1973).

En efecto, estos venenos:

- a) poseen componentes polipeptídicos tóxicos de naturaleza muy variada que son capaces de interferir y alterar diversos procesos biológicos dentro del organismo;
- b) constituyen una de las fuentes más ricas de enzimas que existen en la Naturaleza (fosfolipasas, proteasas, esterases, etc.);

- c) la estabilidad de la mayoría de los diversos componentes del veneno suele ser muy elevada, lo cual facilita enormemente su estudio.

De manera general puede afirmarse que la principal acción de los venenos de alacrán y de las serpientes de las familias Elapidae (cobras, mambas, coralillos) e Hydrophiidae (serpientes marinas) se debe a toxinas polipeptídicas, no enzimáticas de naturaleza básica. Por su parte, los venenos de las familias Crotalidae (serpientes de cascabel) y Viperidae, tienen una acción principalmente debida a enzimas, muchas de las cuales participan activamente en la coagulación sanguínea, en fenómenos de anticoagulación, en procesos hemorrágicos y hemolíticos, acciones farmacológicas y fenómenos líticos de membranas celulares y mitocondriales (Tu, 1977).

## 2. Los alacranes y su veneno.

Los alacranes, que han llegado a ser considerados como "fósiles vivientes", se hallan ampliamente distribuidos en ambos hemisferios, en zonas templadas correspondientes a los climas tropical y subtropical.

Estos arácnidos, pertenecientes al orden Scorpionida han sido divididos taxonómicamente en 6 familias principales Chactidae, Scorpionidae, Diplocentridae, Bothriuridae, Vejovidae y Buthidae (Goyffon y Kavoov, 1978).

La familia Buthidae, que es la más grande familia de alacranes con más de 500 especies esparcidas en todo el mundo; comprende la totalidad de las especies peligrosas para el hombre (Shulov y Levy, 1978), fundamentalmente las pertenecientes a los géneros Androctonus, Leiurus, Buthus, Bothotus y Heaterometrus, distribuidos en el norte de Africa, Medio Oriente

e India; al género Centruroides localizado en América del Norte, especialmente en México (Mazzotti y Bravo-Becherelli, - - 1963) y el sur de E. U., y finalmente las correspondientes al género Tityus, existente en Trinidad-Tobago, Venezuela y Brasil (Bucherl, 1971).

De esto se desprende que el veneno de los alacranes pertenecientes a la familia Buthidae es el que, casi con exclusividad, ha sido caracterizado bioquímica y farmacológicamente.

El veneno de alacrán tal como se obtiene por estimulación manual o eléctrica del telson del animal (Babin et al, - 1974; Zlotkin et al., 1978; Rochat et al., 1979; Possanni et al., 1980, 1981a; Hagag et al 1983) es una sustancia opalescente y de apariencia lechosa e incluso algunos datos parecen indicar que se libera en estructuras vesiculares.

Una vez disuelto en agua, puede el veneno dividirse por centrifugación en una fracción insoluble no tóxica, constituida por un material mucoso que precipita, constituido por mucoproteínas y desechos aparentemente membranales. En la parte soluble quedan los componentes tóxicos del veneno, de naturaleza polipeptídica y peso molecular variado, y en menor proporción otros compuestos tales como aminoácidos libres, sales inorgánicas, lípidos y nucleótidos. Con excepción de la presencia de la enzima hialuronidasa, posible factor de difusión y penetración de los componentes tóxicos, y que se encuentra en proporción significativa, la actividad enzimática del veneno de alacrán es más bien pobre. En algunos casos sin embargo ha sido posible detectar la presencia de enzimas como la fosfolipasa  $A_2$ , fosfomonoesterasas, 5'nucleotidasas y fosfodiesterasas, todas ellas hidrolíticas (Tu, 1977; Mohamed et al., 1969 a, b; Silvarajin et al., 1975; Master et al 1963).

Son propiamente las toxinas polipeptídicas, de bajo peso molecular y de carácter básico, el principio activo del veneno de alacrán, y en base al descubrimiento de su enorme potencialidad como herramientas bioquímicas en la Neurobiología, - dada su actividad manifiestamente "neurotóxica" y más en general por su acción sobre la función de membranas excitables, - se han constituido en un importante foco de atracción para la investigación científica (Cecarelli y Clementi, 1979).

Aunque existen amplias variaciones en la toxicidad del veneno de las diferentes especies de alacranes, suele observarse una sintomatología muy parecida en las víctimas que han sido inoculadas. Esta sintomatología involucra manifiestamente una acción sobre el sistema nervioso autónomo, tanto el simpático como el parasimpático, ocasionando típicamente en animales experimentales (y en humanos), hiperexcitabilidad, salivación, disnea, convulsiones, parálisis y finalmente la muerte (Flores, 1963; Balozet, 1971; Zlotkin et al., 1978; Possani et al., 1977).

Claramente el efecto tóxico del veneno es función de factores tales como la especie de alacrán, la capacidad y el estado fisiológico de las glándulas de veneno, la dosis inoculada, el peso, la edad y el estado de salud de la víctima, la sensibilidad específica de éste y el lugar de la picadura (Hoffman, 1938).

Una medida cuantitativa de la toxicidad o letalidad de los diferentes venenos de alacrán está constituida por la llamada dosis letal media ( $DL_{50}$ ) respectiva. En ratones usados como animales de experimentación la  $DL_{50}$  está en un rango que va de 5  $\mu$ g a 85  $\mu$ g/20 g de peso (Zlotkin et al., 1978), aunque para cada determinación individual hay cierta variación -

intrínseca debida a la cepa de ratón usada, la vía de inyección y el método estadístico empleado en el análisis de los datos.

### 3. Toxinas polipeptídicas de los venenos de alacrán.

#### 3.a. Aislamiento y caracterización.

Los polipéptidos tóxicos del veneno de alacrán, parte fundamental del mismo, han sido conocidos de manera amplia con el término de neurotoxinas, sin embargo han surgido reservas en relación al uso de este término, con la pretensión de satisfacer criterios más estrictos en su denominación.

El aislamiento y la caracterización de las diversas toxinas que constituyen el veneno de alacrán se volvió un problema abordable gracias al desarrollo y aplicación de las técnicas cromatográficas de filtración en gel y de intercambio iónico así como del análisis de aminoácidos. Otro tipo de técnicas han sido también fundamentales para definir criterios de pureza. Entre ellas la electroforesis en geles de poliacrilamida (Reisfeld et al., 1962), la secuenciación automática de aminoácidos, el análisis de la actividad específica de las fracciones cromatográficas, la ultracentrifugación analítica, la técnica de electroenfoque y el mismo análisis de aminoácidos.

La solubilización en agua o en buffer del veneno, seguida de una centrifugación y del análisis cromatográfico en columna del sobrenadante correspondiente, se ha convertido en el procedimiento común para la purificación de los componentes tóxicos. Esta metodología fue utilizada originalmente por el grupo de Miranda en Francia en relación al estudio del veneno de alacranes norteafricanos (Lissitzky et al., 1956; -

Miranda et al., 1960, 1961; rev. de Zlotkin et al., 1978). De esta manera este grupo pudo encontrar que las toxinas del veneno son protefmas solubles en agua, precipitables por acetona y de comportamiento básico en la electroforesis y en cromatografía de intercambio iónico a pH ácido.

A partir de entonces se ha empleado una gama amplia de métodos cromatográficos que incluyen, como se ha mencionado, resinas de filtración en gel y de intercambio iónico (aniónico y catiónico) (Miranda et al., 1966; Rochat et al., 1967; -- rev. de Rochat et al., 1979; Possani et al., 1981, a,c; Hagag et al., 1983; Babin et al., 1974; Watt et al., 1978b).

Aunque la purificación de las toxinas de alacrán no es una tarea fácil, dada la semejanza en pesos moleculares y propiedades físicoquímicas que ellas presentan, se ha logrado -- hasta la fecha el aislamiento en forma pura de un poco más de 100 toxinas, de las cuales se conoce además su composición de aminoácidos. La secuencia total de aminoácidos ha sido determinada para 23 de ellas, (ver tabla VI), mientras que se conoce la secuencia parcial N-terminal de 25 más (Possani, L.D., 1984).

Han sido múltiples los grupos de investigación que han contribuido al análisis bioquímico de las toxinas de alacrán.

Entre las especies cuyo veneno está mejor caracterizado tenemos las especies norteafricanas como Androctonus australis, A. mauretanicus, Buthus occitanus paris, B. occitanus tunetanus y Leiurus quinquestriatus quinquestriatus entre -- otros (Rochat et al., 1967, 1970a, 1972, 1979; Miranda et al., 1970; Kopeyan et al., 1978, 1979, 1982; Zlotkin et al., 1971, 1975, 1978; Darbon et al., 1982, Rosso y Rochat, 1982). Entre las especies norteamericanas, incluyendo a México tenemos

Centruroides sculpuratus (Babin, et al., 1974, 1975; Watt et al., 1978b), C. suffusus suffusus (García, 1976); Habersetzer-Rochat y Sampieri, 1976; Rochat et al., 1979); Centruroides limpidus limpidus, C. limpidus tecomanus, C. noxius, C. elegans (Possani et al., 1978, 1980, 1981 a,c,d; Ramírez et al., 1981). En América del Sur la especie Tityus serralatus Lutz y Mello es la más conocida y de ella se hablará más tarde.

Otras especies interesantes recientemente estudiadas (de Oriente Medio y la India) son Buthus eupeus (Grishin et al., 1978, 1979, 1980, 1981, 1982; Zhdanova et al., 1978), Scorpio maurus palmatus (Lazarovici et al., 1982a, b; Lazarovici y Zlotkin 1982 a,b) perteneciente esta última a la familia Scorpionidae de menor toxicidad para mamíferos.

### 3b. Propiedades estructurales

En base al conocimiento científico que sobre las toxinas de alacrán ha ido surgiendo, fundamentado en el trabajo de numerosos investigadores como los hasta aquí mencionados, pueden establecerse ciertos criterios para describir las características bioquímicas generales de estas moléculas polipeptídicas.

En cuanto a su estructura primaria están constituidas -- por cadenas polipeptídicas simples, relativamente pequeñas. -- La mayor parte cae en un rango que va de 60 a 74 aminoácidos, aunque recientemente han sido detectados péptidos más cortos -- de 36 a 39 aminoácidos (Possani et al., 1982; Zhdanova et al., 1978; Grishin et al., 1982; Lazarovici y Zlotkin, 1982).

Si las secuencias se comparan entre sí buscando la mayor homología lineal, pueden clasificarse en distintos grupos de toxinas con semejanza estructural, tomando por ejemplo la po-

sición de las cistefinas como referencia. De este modo se han propuesto clasificaciones de 5 hasta 9 grupos de homología -- (Rochat et al., 1970, 1978; Possani et al 1977, 1983) habiéndose podido establecer incluso una correlación inmunológica - más o menos clara (Delori et al., 1981).

La mayor parte de las toxinas, por otra parte son moléculas particularmente compactas y estables, dado su tamaño reducido aunado a la presencia de 3-4 puentes disulfuro en su estructura (Kopeyan et al., 1974; Fontecilla-Camps et al., 1980; Possani et al., 1981, 1982; Chicheportiche y Lazdunski, 1970; Watt, et al., 1964). Los datos que se tienen acerca de su estructura secundaria y terciaria no son muy abundantes (Watters et al., 1981; Possani et al., 1981). Ha sido determinada la estructura tridimensional de una de las toxinas (variante 3)-del alacrán C. sculpturatus mediante cristalografía de rayos-X (Fontecilla-Camps et al 1980, 1982) habiéndose descubierto importantes características estructurales. La molécula semeja tridimensionalmente un "puño de la mano derecha" con los nudillos representados por rizos de la estructura primaria. Sin embargo todavía no pueden hacerse generalizaciones amplias.

### 3c. Actividad biológica.

Pasando ahora a los aspectos bioactivos de las toxinas, que se pueden suponer en relación con su estructura, encontramos que estas moléculas muestran especificidad con respecto a los sistemas de bioensayo empleados para su caracterización.

El primer grupo y además el más numeroso lo constituyen las toxinas activas en mamíferos. Corresponden a este grupo la mayor parte de las toxinas caracterizadas hasta ahora, en especial las de cadena larga que en su mayoría se sabe que actúan sobre los canales de sodio de las membranas excitables -

en múltiples sistemas, tales como placa neuromuscular, rebanadas de cerebro de rata, sinaptosomas de rata, células cardíacas de embriones de pollo y otros (Del Pozo, 1947; Koppenhofer y Schmidt 1968 a, b; Gómez et al., 1973, Freire-Maia et al., -- 1974; Moss et al., 1974; Romey et al., 1975, 1976; Couraud et al., 1980; Okamoto, 1980; Gillespie y Meves 1980 ;Carabez y - Possani, 1982).

El segundo grupo está formado por las toxinas que son activas en insectos (grillo, músculo de cucaracha, etc.) (Babin, 1974; rev. de Zlotkin et al., 1978; Grishin et al., 1980; - - Zlotkin, 1982; Darbon et al., 1982).

El tercer grupo lo forman las toxinas con efectos en - - crustáceos, no muy bien caracterizadas (Zlotkin et al., 1978).

Si bien esta clasificación es útil, debe tenerse en cuenta que depende en cierto grado de la elección previa del sistema de prueba y por tanto que puede ser artificial en cierta medida.

Además de las toxinas con acción conocida sobre los canales de sodio se han aislado recientemente toxinas específicas para canales de potasio y que corresponden a péptidos cortos de 36-39 aminoácidos y sin homología en secuencia con las primeras (Possani, 1982; Carbone et al., 1982, 1983). Estas toxinas se detectaron en varias especies del género Centruroi--des e incluso en Tityus, siendo la llamada "noxiustoxina" la primera caracterizada (Possani et al 1982) sobre el axón gigante de calamar.

Resultaría prolijo mencionar aquí la diversidad de efectos farmacológicos y fisiológicos de las toxinas actuando sobre los distintos tipos de membranas excitables presentes en-

mamíferos, insectos y crustáceos. Existen revisiones muy completas al respecto en las que se describen efectos en músculo, sistema cardiovascular y membranas axonales (Dent, M.A.R., -- 1982).

Finalmente se podría agregar que todo este juego de convergencias y divergencias estructurales y funcionales de las toxinas, ha llevado a algunos autores a postular, desde un -- punto de vista evolutivo, un polipéptido ancestral común y -- corto a partir del cual se derivarían por duplicación génica -- no sólo las toxinas de alacrán sino también las de abejas y -- serpientes (Erickson et al., 1978). Algunos otros han pro- -- puesto una posible secuencia evolutiva a partir de una enzima digestiva (proteasa de serina) a proinsulina a proteínas tóxi- -- cas, que permite definir una hipersuperfamilia de polipépti- -- dos (Ivanov, O. Ch. (1981).

#### 4.- Las toxinas de alacrán y la Neurobiología.

En la actualidad el interés fundamental que se tiene en relación a los polipéptidos tóxicos ("neurotoxinas") de los -- venenos de alacrán está en su uso como herramientas para el -- conocimiento de los mecanismos fisiológicos moleculares que -- tienen lugar en las membranas excitables y más específicamen- -- te para el estudio y posible aislamiento de los llamados canales iónicos, involucrados de manera esencial en tales proce- -- sos neurobiológicos. Obviamente el análisis de la estructura de las toxinas y la aplicación médico-terapéutica de todo es- -- te conocimiento, son también parte del mismo interés científico.

El origen de esta línea de investigación puede remontarse a principios de los años 60, cuando Narahashi y col. descu- -- brieron la acción bloqueadora específica sobre el canal de so

dio de la tetrodotoxina. Esta toxina obtenida del pez globo-japonés, bloquea los canales de sodio de las membranas nerviosas sin afectar a los canales de potasio (Narahashi et al., - 1960, 1964, 1974).

#### 4a. Canales de sodio

Desde entonces varios tipos de toxinas de distinto origen biológico han demostrado su acción sobre los canales de sodio. Las principales incluyen derivados heterocíclicos de la guanidina como la tetrodotoxina y la saxitoxina (Narahashi et al., 1964; Hille, B., 1968), alcaloides liposolubles como la batracotoxina, aconitina, veratridina y grayanotoxina (Albuquerque et al., 1971; Straub, R., 1956 Ulbricht, W., 1969; -- Herzog, et al., 1964), toxinas de anémona de mar, que son polipéptidos básicos de peso molecular de 5000 ó 10 000 y toxinas de alacrán (Koppenhofer y Schmidt, 1968; Narahashi et al., -- 1969, 1972; Romey et al 1975, 1976; Bergman et al., 1976; Conti et al., 1976; Okamoto et al., 1977). Recientemente han sido preparados sintéticamente derivados de las piretrinas (toxinas naturales de las flores de crisantemo), llamados piretroides (Narahashi, 1974; Vijverberg et al., 1982).

De la aplicación de estas toxinas, capaces de ocasionar diversos efectos fisiológicos en el canal de sodio, han podido definirse varios sitios receptores a neurotoxinas. En la tabla siguiente se muestra un resumen de las propiedades de dichos sitios receptores en el canal de sodio.

Sitio Receptor	Ligando	Efecto fisiológico
1	Tetrodotoxina Saxitoxina	Inhibición del transporte iónico (Narahashi, T., 1974; Ritchie, J. M. y Rogart, R. B., 1977).

Sitio Receptor	Ligando	Efecto fisiológico
2	Veratridina Batracotoxina Aconitina Grayanotoxina	Modificación de la dependencia de voltajes de activación e inactivación resultando esto en una activación persistente - - (Catterall, W.A., 1977).
3	Toxina alacránica Toxina de anémona de mar	Inhibición de la inactivación Potenciación de la activación persistente de toxinas del sitio 2. (Lazdunski, M., et al, 1980; Catterall, W.A., 1977).
4	Piretroides	Transforman canales de sodio rápidos en lentos (Narahashi, T., 1974 Vijverberg, - H. P.M. et al 1982)

Las toxinas de alacrán pertenecen al grupo funcional en mamíferos (en su mayoría), de cadena larga comprendiendo entre 60-70 aminoácidos. Su acción sobre el canal, dependiendo de la toxina, puede ser reversible o irreversible, dependiente o independiente del potencial membranal de la preparación biológica. (Cahalan, 1975; Jover et al., 1980; Couraud et al., 1980 a, b; Carbone et al., 1982; Barhanin et al., 1982).

En un principio la mayoría de las toxinas de alacrán probadas, en especial las de especies norteafricanas se consideraban específicas en su acción sobre el sitio receptor 3 del canal. Esta acción consiste en un bloqueo irreversible de la -- inactivación del canal, en estado de apertura con prolongación del potencial de acción (Zlotkin et al., 1978; Rochat et al., - 1979; Catterall et al., 1982, 1976; Kopeyan et al., 1982). Sin embargo se han aislado nuevas toxinas, en general de alacranes americanos de los géneros Centruroides y Tityus cuya acción parece ser la inhibición de la permeabilidad del canal y de efecto reversible e independiente del potencial membranal de la -- preparación biológica. Este tipo de toxinas se han adscrito a un 5o. sitio receptor y se les ha llamado toxinas del tipo "be

ta". (Jover et al., 1980 a.b; Cahalan 1975; Couraud et al., - 1980 a.b; Carbone et al 1983; Barhanin et al 1982).

La potencialidad de diversos derivados de toxinas de alacrán marcadas radiactivamente es muy grande en relación al proceso de aislamiento y caracterización química del canal de sodio (Catterall 1982; Barhanin et al., 1982).

#### 4b. Canales de potasio

El descubrimiento de toxinas de alacrán de acción específica sobre el canal de potasio de membranas nerviosas es un hecho reciente (Carbone et al 1982, 1983) como se mencionó antes.

Proviene de las especies C. noxius y T. serrulatus (Possaani, et al, 1982) y corresponden a moléculas cortas de cerca de 40 aminoácidos con 3 puentes disulfuro. Su acción fisiológica consiste en reducir la permeabilidad del canal de  $K^+$ , de manera específica, reversible e independiente del voltaje.

La diferencia estructural que presentan en relación a las toxinas mencionadas en la sección anterior, se ve claramente - reflejada en su función.

#### 5. El veneno del alacrán sudamericano T. serrulatus (T.s.) (Lutz y Mello).

El alacrán T. serrulatus Lutz y Mello pertenece a la familia Buthidae (Bucherl, 1971), subfamilia Titynae y, es originario del sudeste brasileño. Es en realidad la única especie del género cuyo veneno ha sido estudiado.

Gómez y Diniz (1966) en Brasil fueron los primeros en estudiarlo habiendo obtenido dos fracciones tóxicas de las cua--

les se purificó un solo polipéptido denominado "tityustoxina - I" (TsTx I).

Toledo y Neves (1976) aislaron otra toxina denominada "tityustoxina II", la cual fue parcialmente caracterizada juntamente con la anterior. La Tityustoxina I está compuesta por 63 aminoácidos incluyendo una metionina y presenta 4 puentes disulfuro; mientras que la tityustoxina II tiene 78 residuos de aminoácidos, con dos metioninas y 6 puentes disulfuro, caso de excepción junto con la toxina II de C. sculpturatus (McIntosh y Watt, 1973; Babin et al 1974, 1975) y una toxina funcional en crustáceos de A. australis (Zlotkin, 1975, 1976).

Otros autores como Miranda et al (1966) y Linden y Raftery (1976) obtuvieron fracciones tóxicas sin haberlas caracterizado específicamente; estos últimos las probaron en relación a la captación de  $^{22}\text{Na}^+$  por células de neuroblastoma.

Independientemente y con métodos más eficaces, el grupo de Possani y col. lograron aislar y caracterizar varias toxinas de I. serrulatus. En esta tesis se presenta una contribución a estos estudios.

La  $\text{DL}_{50}$  del veneno soluble obtenida fue de 25  $\mu\text{g}$  por ratón de 20 g. (1.25 mg de veneno/ Kg de ratón). Con la excepción de la presencia de actividad de hialuronidasa, común en venenos de otras especies, no se pudieron detectar actividades de fosfolipasa, fosfodiesterasa, proteasa o actividad fibrinolítica. La primera toxina purificada y caracterizada hasta el nivel de secuencia N terminal fue la denominada toxina gamma, muy básica y la más abundante en el veneno. Se determinó su composición de aminoácidos y su secuencia N terminal, como se ha dicho, detectándose 62 aminoácidos incluyendo una metionina (Alagón et al., 1978; Possani et al., 1977). En este veneno -

fue posible resolver, además, cinco fracciones tóxicas distintas. Más recientemente y utilizando modificaciones al método usado inicialmente, pudieron distinguirse 10 fracciones cromatográficas tóxicas, habiéndose purificado y caracterizado 4 toxinas, las más importantes del veneno en concentración relativa (Possani et al 1981c); entre las diez se detectó también -- una toxina específica en su acción sobre insectos (Alagón et al., observaciones no publicadas).

Desde el punto de vista funcional uno de los componentes menores del veneno corresponde a una toxina de cadena corta es específica para el canal de  $K^+$  semejante a la noxiustoxina.

Se han definido para la toxina  $\gamma$  y la tityustoxina, mecanismos de acción diferentes sobre el canal de  $Na^+$  en sinaptomas de cerebro de rata y membranas de electroplaca de *Electrophorus electricus*. En efecto, sus acciones parecen tener lugar en sitios receptores también diferentes. Además la toxina tiene mayor afinidad por su sitio receptor que las otras toxinas de alacrán conocidas y efectoras del canal de  $Na^+$ . Por esta razón la toxina  $\gamma$  puede ser una herramienta muy importante para el aislamiento y el marcaje específico del canal (Barhanin et al 1982; Couraud y Rochat, 1980; Cahalan, 1975).

Se han realizado múltiples estudios farmacológicos y fisiológicos en diferentes tipos de preparaciones biológicas utilizando el veneno de T.s. o algunos de sus componentes aislados (especialmente la Tityustoxina I, la mejor conocida en este aspecto). Así tenemos que la tityustoxina es capaz de evocar la liberación de acetil colina, otras catecolaminas y agentes adrenérgicos en diversos sistemas, por estimulación del -- sistema nervioso autónomo; en fleo de rata produciendo una actividad espasmódica y actuando la sustancia P como otro mediador (Cunha-Melo et al., 1973; Freire-Maia et al, 1976); en el-

sistema circulatorio ocasionando un aumento de la presión sanguínea y bradicardia (Corrado, 1974; Freire-Maia et al., 1970, 1974; Celeste Henriquez, 1960); en rebanadas de corteza de cerebro de rata (Gómez et al 1973, 1975), hipotálamo, hipocampo, corteza y estriado (Macedo y Gómez 1982); en sinaptosomas aumenta la captación de  $Ca^{++}$  (Romey et al., 1976). Otros efectos incluyen edema pulmonar y pancreatitis en animales experimentales (Lima y Freire-Maia 1977; Fletcher et al 1978).

#### 6. Propósito de esta tesis

Esta tesis básicamente es el estudio comparativo del veneno del alacrán I. serrulatus Lutz y Mello proveniente de regiones geográficas separadas entre sí (Santa Bárbara, M.G., Corrego Novo, M.G., Cataguases, M.G. y Aparecida del Norte, S.P.) y representa también una contribución al aislamiento y caracterización de varios de los componentes polipeptídicos tóxicos del veneno (Possani et al 1981c, 1983 en rev.).

En relación a la toxina III-10, que parece ser una misma molécula que la toxina II-11 ó  $\gamma$ , se busca completar el análisis de su estructura primaria (secuencia de aminoácidos total) y llevar al cabo la síntesis química en fase sólida del penta-decapéptido correspondiente a su extremo N-terminal con objeto de estudiar sus propiedades antigénicas e inmunogénicas de manera preliminar.

## II.- MATERIALES Y METODOS

### 1. Materiales

El veneno de alacrán Tityus serrulatus empleado en esta tesis fue una donación del Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil, al Dr. Lourival D. Possani. Los lotes del mismo utilizados en los estudios comparativos fueron específicamente colectados por la Dra. Sylvia Lucas. El veneno liofilizado disuelto en buffer acetato de amonio, 20 mM, pH 4.7 o simplemente en agua, se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min, o en una minifuga Beckman en el caso de los lotes provenientes de diversas localidades brasileñas. Los sobrenadantes, que constituyen el veneno soluble, se guardaron en congelación, sin liofilizar,-- hasta su uso.

Las resinas cromatográficas provinieron de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia (Sephadex G-50, medio y fino), y de Whatman Inc., Clifton, New Jersey (Carboximetil-celulosa, -CM-32). Los tubos de diálisis, Spectrapor Type 3 (límite de exclusión de 3500) fueron de Spectrum Medical Industries, L.A.,- Cal. USA.

El ácido (1- <sup>14</sup>C) iodacético se adquirió de New England-Nuclear (Boston, Mass.), mientras que el ditiotreitól (DTT) -- provino de Chabiochem Behring Corp., La Jolla, Cal.

Los reactivos para secuenciación automática fenilisotio--cianato, ác. heptafluorobutírico y Quadrol fueron de Beckman - Instruments Inc. PA, Cal., lo mismo que los solventes heptano, benceno, acetato de etilo y cloruro de butilo, aunque también-

se emplearon solventes de Merck, Darmstadt. El polibreno usado fue de Pierce Chemical Co.

La proteasa V-8 de S. aureus se adquirió de Miles Lab., - Inglaterra, y las carboxipeptidasas fueron de Pierce.

En cuanto a la síntesis de péptidos la mayor parte de los t-BOC aminoácidos fueron de Penninsula Laboratories Inc., y el HF usado en la ruptura correspondiente fue de Matheson (Searle - Medical Products).

El ácido trifluoroacético utilizado en el sistema de cromatografía líquida de alta presión (C.L.A.P.) y en la síntesis de péptidos fue de Pierce Chem. Co., mientras que el 2-propanol y el diclorometano provinieron de Baker Chem. Co.

Finalmente el suero anti-arácnido usado en los experimentos inmunológicos fue también donación del Instituto Butantan.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

## 2. Pruebas de toxicidad

La toxicidad en ratones de las diversas fracciones o componentes tóxicos del veneno se prueba por inyección intraperitoneal de diferentes cantidades de proteína en 0.1 a 0.4 ml de agua o de amortiguador acetato de amonio. Las pruebas de  $DL_{50}$  se obtienen graficando el % de ratones muertos contra el logaritmo de la dosis. Se aplicaron 8 dosis diferentes en lotes - de 5 ratones de pesos entre 14 a 20 g según se describe en el pie de la Fig.1.

En los resultados el término "letal" significa que la can

tividad de veneno aplicada mata al ratón en un período máximo de 20 horas; "tóxico" significa que el ratón presenta los síntomas siguientes: excitabilidad, salivación, disnea, lacrimo y parálisis de las piernas, aunque el animal se recupera finalmente; "no tóxico" significa que la dosis aplicada no produce ningún efecto visible (lo mismo que controles con solución salina isotónica, al 0.9%).

La concentración de proteína se mide en base a la absorbancia a 280 nm asumiendo  $1 A_{280\text{nm}}^{1\text{cm}} = 1 \text{ mg/ml}$ .

### 3. Purificación de las toxinas

El veneno soluble en alícuotas de 1.5 a 2.0 ml (100 mg) - se fracciona primeramente en una columna de Sephadex G-50 de dimensiones 0.9 x 200 cm en amortiguador acetato de amonio, 20 mM, pH = 4.7. Las fracciones tóxicas provenientes de esta columna se cromatografiaron en una columna de intercambio iónico de CM-32 equilibrada con el mismo amortiguador y aplicando un gradiente salino de 0 a 0.55 M de NaCl. Los componentes tóxicos principales se purifican por recromatografía en las mismas condiciones.

La homogeneidad de las toxinas aisladas se comprueba por electroforesis en geles de poliacrilamida en el sistema de  $\beta$ -alanina-urea de Reisfeld et al., 1962 (ver sección 6 de Materiales y Métodos).

La localización de las fracciones o componentes tóxicos - se determina según se mencionó en la sección anterior.

Para eliminar las sales después de cada paso cromatográfico de intercambio iónico se empleó la técnica de diálisis. Esta se lleva al cabo en tubos con límite de exclusión de 3 500,

a temperatura ambiente y contra 1 lt de amortiguador acetato - de amonio o contra agua (si la toxina ya está pura), realizándose 3 cambios.

Para propósitos cromatográficos, la concentración de proteína se mide espectrofotométricamente como se definió más - - arriba, mientras que para la determinación de secuencia de aminoácidos, modificación química y digestiones enzimáticas, el - contenido proteico se determina por análisis de aminoácidos.

#### 4. Análisis de aminoácidos.

Las muestras para análisis de aminoácidos, después de ser evaporadas y concentradas en un aparato Savant, se hidrolizan con 200  $\mu$ l de HCL 6N a 110 °C en tubos sellados al vacío durante 24 y 48 horas. Después de la hidrólisis se abren los tubos, se evapora el HCl, se redisuelve el péptico seco en buffer citrato de sodio, 0.1N pH 2.2 (buffer de cargado) (60  $\mu$ l) y se - transfiere a los cilindros de aplicación de muestra. Los análisis se llevaron al cabo en un analizador de aminoácidos automático Durrum- D500. La resolución de los aminoácidos (ácidos, neutros y básicos) se realiza en una columna de intercambio catiónico con una resina sulfonada. Los aminoácidos se detectan colorimétricamente a 570 nm después de reaccionar con ninhidrina a 100° C (la prolina se detecta a 440 nm). La graficación e integración de los picos cromatográficos es automática.

Los valores de treonina y serina se extrapolan al tiempo - cero, dada su labilidad (dividiendo entre un factor de 0.95 y - 0.90 respectivamente). Los resultados se expresan como relaciones molares.

#### 5. Reducción y carboximetilación (Possani, et al., 1981c)

La reducción de las toxinas de alacrán se lleva al cabo -

con ditionotreitól (DTT) (8.33x sobre nmoles de Cis presentes) - en buffer Tris-HCl 0.2 M, pH 8.6 y con una concentración de -- EDTA de 1mg/ml y clorhidrato de guanidina 6M. Se añade a la - mezcla de reacción una gota de 1-octanol como agente tensoactivo para evitar la desnaturalización de la toxina durante un -- burbujeo de N<sub>2</sub> por 10 minutos. La reacción se lleva al cabo - por 2 horas a 35 °C. Se procede entonces a la carboximetila- - ción por 30-45 minutos con ácido iodacético marcado a tempera- tura ambiente. La toxina ya reducida y carboximetilada se cromatograffa entonces en una columna de Sephadex G-50 usando 20% de ácido acético como eluyente.

En un experimento típico se partió de 5.7 mg de toxina -- III-10 (814 nmoles) y se añadieron 8.35 mg de DTT en 20  $\mu$ l de buffer TRIS HCl 2M, correspondiente esto a un exceso de 8.33 X sobre las cisteínas presentes. Al final la mezcla de reacción consiste en 2 ml de TRIS-HCl 2 M, EDTA 1 mg/ml, guanidina HCl-6M).

Se carboximetiló con ácido iodacético utilizando un exce- so de 20% sobre las nanomolas de DTT, en este caso 65.1  $\mu$ moles de ácido iodacético (12.11 mg) en 250  $\mu$ l del buffer Tris-HCl - añadidos a la mezcla anterior.

Previamente al ácido iodacético frío se añadieron 10  $\mu$ Ci- de ácido iodacético radiactivo (1-<sup>14</sup>C) en 100  $\mu$ l de dimetilformamida.

## 6. Electroforesis

Para llevar a efecto el estudio electroforético de los ve- nenos de I. serrulatus provenientes de distintas regiones geo- gráficas, así como criterio de pureza en el proceso de purifi- cación de los diferentes componentes tóxicos del veneno se em-

plean geles cilíndricos de poliacrilamida en el sistema de  $\beta$ -alanina-urea de Reisfeld, R. A., et al., 1962.

Cada gel consta de una porción separadora y otra espaciadora. La primera (pH 4.8) está constituida por un gel con -- aproximadamente 6% de acrilamida, mientras que la segunda, muy corta (pH 5.55) tiene una concentración aproximada de 3% de -- acrilamida. Ambos geles contienen urea en concentración 10 M. Las proteínas corren hacia el cátodo en un amortiguador de -- alanina acético pH 4.42 (8 mA/gel, 100V). Las bandas de proteínas se tiñen con azul brillante de Coomassie G-250 (0.04%) -- en una solución 3.5% de ácido perclórico durante 40 minutos -- con un cambio, antes de ser fotografiados.

### 7. Digestión enzimática

La digestión de la toxina III-10 con proteasa V-8 de S. aureus (Drapeau, G.R., 1972, 1977), cuya especificidad consiste en romper enlaces peptídicos en los que interviene Glu o -- Asp por su extremo carboxilo, se llevó al cabo de la siguiente manera: 116 nanomoles de toxina se disolvieron en 1.2 ml de -- amortiguador fosfatos 50 mM, pH 7.8, EDTA 2 mM. La reacción -- tuvo lugar a 40 °C durante 12 horas siendo la relación de enzima/sustrato de 1/50 por peso. Se detuvo la reacción por calentamiento a 80 °C por 15 min. Después de centrifugar en minifuga se aplicó el sobrenadante (30  $\mu$ l) en un cromatógrafo líquido de alta presión para analizar y aislar los péptidos resultantes.

Para determinar el extremo C-terminal de la toxina, se emplearon carboxipeptidasas midiéndose la liberación de aminoácidos. Se emplearon la Carboxipeptidasa A (CpA) que libera rápidamente residuos no polares del extremo C terminal de péptidos y proteínas (aunque se liberan también His, Gln, Tre pero más-

carboxipeptidasa B (CpB) que libera Lis y Arg -  
 .emo. Finalmente la carboxipeptidasa Y (CpY) tie  
 - especificidad amplia aunque los residuos hidrofóbicos -  
 - liberan más rápidamente que los que tienen carga.

Tanto la carboxipeptidasa A como la B (Ambler, R.P., 1972),  
 mezcladas o por separado se disolvieron en buffer de fosfato -  
 de sodio 0.2 M, pH 8.0, empleándose una relación enzima/su<sup>u</sup>stra  
 to de 1:100 ó 2:100 en un volumen de 0.4 ml (50-60 nmol de to-  
 xina reducida y carboximetilada). La reacción se llevó al ca-  
 bo a 30°C en períodos de tiempo de 5, 10, 30, 60 min o a tiem-  
 pos largos de 20- 40 horas.

La carboxipeptidasa Y (Pierce Chem. Co.) se disolvió en -  
 buffer de acetato de N-etilmofolina, 0.025 M, pH 7 conteniendo  
 1 mM de EDTA con 0.01% de SDS o en su ausencia. Se usaron re-  
 laciones enzima/sustrato de 1:40 con 12-60 nmol de toxina en -  
 un volumen final de 0.2-0.4 ml (Hayashi, R., 1977; Hayashi, R.,  
 et al., 1978).

#### 8.- Secuencia de aminoácidos

La secuencia automática de aminoácidos se hizo en una se-  
 cuenciador Beckman 890 C según el sistema de Edman y Begg, - -  
 1967. El aparato realiza en la copa giratoria la reacción de-  
 Edman, la cual incluye tres etapas:

1º Acoplamiento. La proteína o péptido previamente seca  
 dos se disuelven en buffer Quadrol (pH 9.0-9.5) y son acopla--  
 dos por su extremo amino terminal con fenilisotiocianato para-  
 formar un derivado feniltiocarbamil del péptido. La reacción-  
 tiene lugar a 50°C. El benceno precipita la proteína y lava -  
 el exceso de fenilisotiocianato (FITC), mientras que con aceta  
 to de etilo se arrastra el Quadrol y los productos de degrada-  
 ción del FITC.

2º Ruptura. Por la acción del ácido heptafluorobutírico-anhídrido se separa el aminoácido N terminal en forma de derivado anilino-tiazolinona.

3º Conversión. Las tiazolinonas de aminoácido se convierten en sus respectivas feniltiohidantoinas (FTH) por reacción con HCL 1 N bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 10 minutos a 80°C.

Se empleó para el proceso de determinación de la secuencia el programa 122974 ("Quadrol Protefina") y la subrutina de secado 02772 para la aplicación de las muestras a la copa giratoria, disueltas en general en ácido acético al 20%.

Para polipéptidos pequeños como es el caso de las toxinas de alacrán, suele aplicarse previamente a la muestra problema la poliamina polibreno junto con un dipéptido como la glicilalanina o en su defecto alanina simplemente (3 mg de polibreno + 100 nmoles de aminoácido o dipéptido). El polibreno impide el arrastre rápido del péptido y aumenta por tanto el rendimiento del proceso, mientras que el dipéptido se añade para bloquear sitios reactivos de la poliamina. (Tarr, G.E., 1978; Hunkapiller, M.W. an L.E. Hood, 1978).

Finalmente se procedió a identificar las FTH de aminoácido por cromatografía líquida de alta presión en un aparato - - Hewlett-Packard 1084 A con un sistema de A) acetato de sodio - 0.01 M pH 4.03/ acetonitrilo/metanol, 9:1:0.5 y B) Metanol al 90%. La cromatografía se realizó en una columna de fase reversa Lichrosorb RP-10 con un flujo de 3 ml/min y a 40°C. Se utiliza un gradiente escalonado de metanol al 90%. (ver fig. A).

También se utiliza el sistema de hidrólisis reversa con - HI (J T Baker Chemical Co.), en el cual el FTH-aminoácido se hidroliza, identificándose el aminoácido liberado por análisis

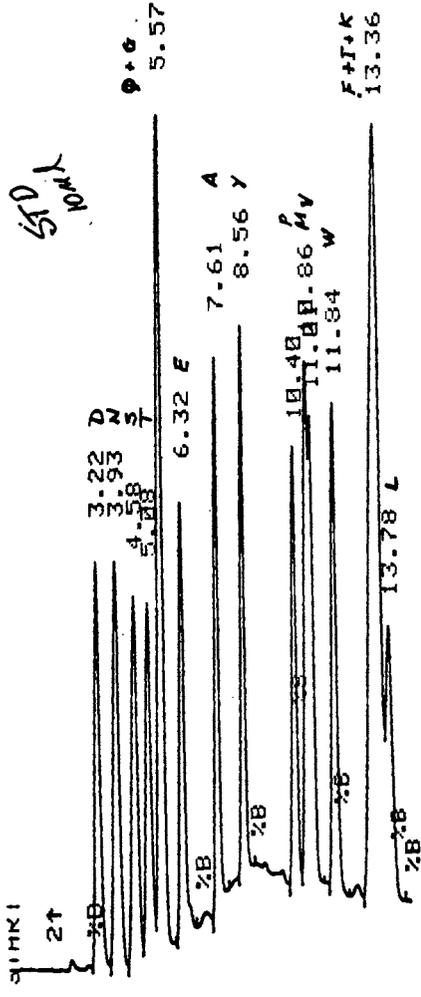


Fig. A. Patrón estándar de feniltiohidantoinas de amino-ácido obtenido por cromatografía líquida de alta presión en un cromatógrafo Hewlett Packard 1084 A.

La cromatografía se realizó en una columna de fase reserva Lichrosorb RP-10 con un flujo de 3 ml/min y a 40°C. Se utiliza un gradiente escalonado de metanol al 90%. El sistema emplea un buffer:

A) Acetato de sodio 0.01 M pH 4.03/acetonitrilo/metanol - 9:1:0.5.

B) Metanol al 90% en agua.

de aminoácidos automático.

Se empleó un secuenciador automático 890 M para la identificación de uno de los péptidos provenientes de la digestión - enzimática con proteasa V-8 de S. aureus. Se empleó el programa 1 (pre-ciclo de lavado del polibreno) y el programa 3 para péptidos (sub-rutina no. 347339 de la Cía. Beckman) con amortiguador Quadrol para la secuenciación del péptido mencionado.

### 9. Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis del pentadecapéptido correspondiente al extremo N-terminal de la toxina se llevó al cabo utilizando el método propuesto originalmente por Merrifield, R. B., 1963, de síntesis secuencial en fase sólida.

El péptido deseado se empieza a sintetizar partiendo del extremo C-terminal, acoplado los respectivos ter-butil oxycarbonil (tBOC) aminoácidos en forma secuencial a una resina de - copoliéstereno- 1% divinil benceno aminometilado.

Para formar la fenilacetamidometil-resina (PAM-resina) -- con el primer aminoácido, la sal de cesio de éste (Gisin, 1976; Wang, et al., 1977), se acopló primeramente a un derivado Br--fenacilester, para formar, vía un paso de reducción con zinc, - el derivado oximetil fenilacético del BOC-aminoácido, el cual finalmente se acopla a la amino-metil resina, que constituye - el soporte sólido (Mitchell, 1976a, b).

Cada ciclo de acoplamiento comprende los siguientes pasos (Erickson y Merrifield, 1976):

a) Desprotección del aminoácido unido a la resina por su carboxilo. Para ello se emplea ácido trifluoroacético al 50%-

en diclorometano, en una reacción de 30 minutos.

b) Lavados alternados con diclorometano y 2-propanol.

c) Neutralización del grupo amino del aminoácido con - trietilamina al 5% en diclorometano, seguida de un nuevo lavado con este mismo solvente.

d) Doble acoplamiento del tBOC-aminoácido respectivo - empleando N-N'diciclohexilcarbodiimida como acoplador. Se añaden 3 equivalentes de tBOC-aminoácido por grupo amino libre del anterior aminoácido e igual proporción del agente -- acoplante. El primer acoplamiento dura unas 2 horas y el segundo 12 horas. Entre ambos se repite el proceso de neutralización y se hace un lavado alternativo con diclorometano - y 2-propanol.

Los t-BOC aminoácidos utilizados fueron: Gli, Leu, Met, bencil (Bzl)-Ser, carbobenzoxi (CBZ)-Lis, metilbencil (MeBzl)-Cis, oxibencil (OBzl)-Glu, (OBzl)-Asp, tosil (Tos)-His y diclorobencil (Cl<sub>2</sub>Bzl)-Tir.

La ruptura del péptido sintetizado con respecto a la - resina y la desprotección de los aminoácidos se realizó con HF líquido a 4°C (al 90% en presencia de anisol) (Sakakibara, S. y Y. Shimonishi, 1965; Sakakibara, S., et al., 1967) durante 45-60 minutos, en un aparato rompedor de péptidos con recipientes y conductos de teflón (Protein Research Foundation, Japón).

El péptido se extrajo finalmente en agua o ácido acético al 5% y se liofilizó, habiéndose realizado una extracción etérea previa para eliminar el anisol remanente.

La composición de aminoácidos del péptido y los rendimientos de las reacciones se determinaron por análisis de aminoácidos (ver sección de Resultados).

## 10. Inmunolectroforesis

En una placa de acetato de celulosa de 7 x 11 cm se vierten 6 ml de agarosa al 1% fundida en Tris-glicina 0.025-M, pH 8.3 (tabletas de agarosa para inmunolectroforesis B10-RAD). Después de la gelación y de un período en refrigeración de 5 minutos, se hacen las correspondientes perforaciones en el gel y se aplican en los pocillos 10  $\mu$ l de los venenos a prueba (concentración de 10 mg/ml).

La electroforesis se hace a 400 V durante 2 horas empleando un buffer TRIS-glicina 0.025 M, pH 8.6 en los compartimentos aniónico y catiónico. La temperatura se mantiene cercana a la ambiental utilizando refrigeración por agua corriente.

Inmediatamente después de la electroforesis se remueven del gel las respectivas franjas y se aplica en cada una 50  $\mu$ l de suero antialacránico obtenido de caballos hiperinmunizados (Inst. Butantan). La inmunodifusión se realiza a temperatura ambiente en cámara húmeda y durante un período de 20-72 horas.

Al finalizar la inmunodifusión se lava la placa en una solución isotónica de NaCl (0.85%) por 10 min. y se seca por presión con papel filtro Whatman No. 1. El proceso se efectúa tres veces dejándose secar completamente.

La placa se tiñe en una solución de amido black al 0.5% durante 6 minutos. Para fijar y desteñir se utiliza una so-

lución metanol/ácido acético/agua 70:10:20. Finalmente la placa, una vez desteñida, de tal manera que las bandas de precipitación tengan un contraste adecuado, se deja secar por completo durante varias horas.

#### 11. Ensayos inmunológicos con el péptido sintético.

El péptido sintético correspondiente al extremo N-terminal de la toxina III-10 se polimerizó con glutaraldehído (conc. final 0.25%) en 2 ml de amortiguador de fosfato de potasio, -- 0.1 M, pH 7.6. La reacción se hizo a temperatura ambiente y con agitación durante 4 horas.

Se inmunizaron con el polímero obtenido y por vía subcutánea en cinco ratones, según el siguiente esquema.

Semana	Cantidad de polímero	Adyuvante completo de Freund (1:1 v/v)
1	100 $\mu$ g	+
2	200 $\mu$ g	+
3	200 $\mu$ g	+
4	200 $\mu$ g	-
6	200 $\mu$ g	-
8	200 $\mu$ g	-

La sangría de los ratones se efectuó por vía ocular una semana después de cada refuerzo, y obtenido el suero se probó por inmunodifusión para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra el péptido sintético y que puedan reaccionar de manera cruzada con otras toxinas, que posean antígenos en común, en especial de la fracción II de Sephadex-G-50 o incluso con el veneno total.

Para la inmunodifusión se usó una placa de acetato de celulosa con agarosa al 0.8%, aplicando en los 2 pocillos cen-  
trales suero anti-péptido (7a. semana) en uno y suero anti-  
arácido (I. Butantán) en el otro (15  $\mu$ l de c/u). Estos sue-  
ros se probaron contra veneno total de T. serrulatus, frac-  
ción II proveniente de Sephadex G-50 y toxina II-11 (III-10).  
Se aplicaron 150  $\mu$ g en 15  $\mu$ l en cada pocillo de las muestras-  
mencionadas y un control de buffer de fosfatos (PBS).

### III.- RESULTADOS

#### 1. Estudio comparativo del veneno de T. serrulatus proveniente de diferentes localidades geográficas.

Como la parte más importante de esta tesis se realizó con veneno donado por el Instituto Butantan de Sao Paulo (Brasil), era necesario verificar en un primer paso la calidad del veneno. Para tal objeto se consiguieron varias muestras de veneno de animales especialmente colectados por la Dra. Sylvia Lucas (véase agradecimientos) en las siguientes localidades brasileñas:

- 1) Corrego Novo y Sta. Bárbara (M.G.)
- 2) Sta. Bárbara (M.G.)
- 3) Corrego Novo (M.G.)
- 4) Aparecida del Norte (S.P.)
- 5) Cataguases (M.G.)

Un número pequeño de animales colectados en estas áreas geográficas muy restringidas y específicas (100 a 200 animales) produjeron una cantidad de veneno del orden de 10-50 mg. Con este veneno se hicieron estudios del patrón tóxico, del comportamiento electroforético, inmunolectroforético y cromatográfico. Las cuatro muestras diferentes de veneno se procesaron en paralelo con la muestra estándar comúnmente utilizada por el Instituto Butantan, la cual proviene básicamente de las regiones cercanas a Santa Bárbara (M.G.).

El estudio de la  $DL_{50}$  que se muestra en la Fig. 1 se realizó únicamente para dos lotes diferentes de veneno de T. serrulatus provenientes de lugares cercanos a Santa Bárbara (lotes A y B).

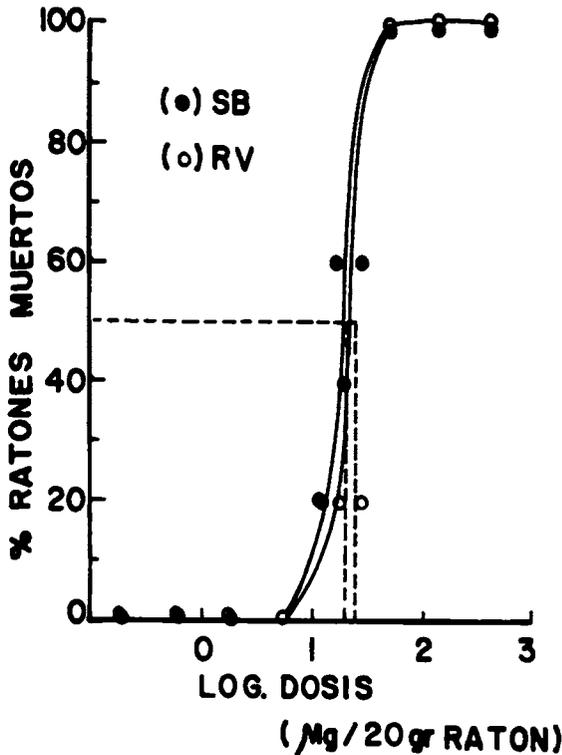


Fig. 1  $DL_{50}$  de dos lotes de veneno de *T. serrulatus* provenientes de la región de Sta. Bárbara y cercanías.

Partiendo de soluciones de veneno ajustadas a 10 mg/ml, se hacen las siguientes diluciones seriadas (1/3 cada vez):

	CONC.	µg/20g ratón	Log	Muertes		% muertes	
				A	B	A	B
A1*	2.5 mg/ml	500 µg	2.69	5	5	100	100
A2	0.83 "	166.5 µg	2.22	5	5	100	100
A3	0.28 "	55.5 µg	1.74	5	5	100	100
A4	0.09 "	18.5 µg	1.27	3	1	60	20
A5	0.03 "	6.2 µg	0.79	0	0	0	0
A6	0.01 "	2.1 µg	0.31	0	0	0	0
A7	0.003 "	0.7 µg	-0.17	0	1	0	20
A8	0.001 "	0.2 µg	-0.64	0	0	0	0

\* para el lote B se hacen las mismas diluciones. A1 y B1 corresponden a una dilución de 1/4 de la solución base de 10 mg/ml. (0.75 ml. de veneno + 2.25 ml. de sol. salina isotónica).

Se grafica el porcentaje de ratones muertos contra el log, de la dosis empleada (g/20 g de ratón). Cada punto representa una dosis aplicada a lotes escogidos al azar de cinco ratones de pesos entre 14 y 20 gr. Los puntos oscuros al veneno colectado en Sta. Bárbara y los puntos blancos al veneno de alacranes colectados en las cercanías de esa localidad. las dosis letales medias se obtienen por interpolación en las abscisas del 50% en las ordenadas.

Al graficar el porcentaje de ratones muertos contra el  $\log_{10}$  de la dosis ( $\mu\text{g}/20$  g de ratón) se obtuvieron valores de  $DL_{50}$  de  $21.1 \mu\text{g}$  y  $22.4 \mu\text{g}$  para A y B respectivamente, es decir, valores muy semejantes entre sí y semejantes al reportado por Possani, et al., 1977 ( $25 \mu\text{g}/20\text{g}$  ratón). No se realizó un estudio estadístico puesto que sólo se buscaba ratificar el dato de  $DL_{50}$  para dos lotes provenientes de lugares muy cercanos. Las gráficas obtenidas se muestran en la Fig.1.

En la Fig. 2 se observan los patrones electroforéticos que se obtuvieron a partir de  $100 \mu\text{g}$  de cada uno de 5 lotes de veneno colectados en 4 localidades brasileñas distintas; los geles cilíndricos de acetato urea revelan la presencia de 15 bandas de intensidades diferentes para cada uno de los 5 lotes de veneno. Si bien al comparar los geles entre sí se observan distintas proporciones en cuanto a la intensidad de las bandas. Los patrones electroforéticos son básicamente semejantes. Las bandas más intensas corresponden a los polipéptidos más básicos.

En seguida se procedió a hacer ensayos de inmunoelectroforesis con los mismos 5 lotes de veneno, para lo cual se aplicaron  $10 \mu\text{l}$  de cada uno en sus respectivos pocillos ( $100 \mu\text{g}$ ); después de la electroforesis se aplicaron  $50 \mu\text{l}$  de suero anti-arácnido (Butantan) en las franjas horizontales. El resultado se muestra en la fig. 3 en la cual se observan patrones de bandas simétricas, igualmente dispuestas para cada uno de los 5 lotes de veneno. La mayor parte de las bandas tienden hacia el extremo catódico. Es posible sin embargo notar algunas pequeñas diferencias en el patrón de bandas correspondiente al veneno colectado en Corrego Novo.

En contraste, en la fig. 3b se muestra otra inmunoelectroforesis en la cual se comparan los venenos de dos especies

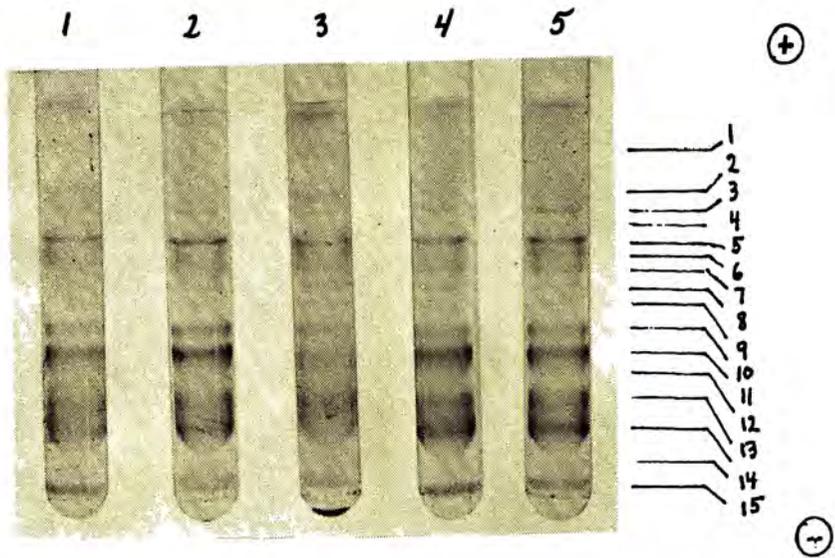


Fig. 2. Electroforesis de veneno soluble de T. serrulatus proveniente de 5 regiones geográficas distintas.

Estas regiones son: 1) Corrego Novo y Sta. Bárbara; 2)- Sta. Bárbara (estándar); 3) Corrego Novo M.G.; 4) Aparecida - del Norte S.P.; 5) Cataguases M.G.

Se emplearon geles cilíndricos de poliacrilamida (3%) en el sistema de  $\beta$ alanina-urea (Reisfeld, et al., 1962). Se aplicaron 100  $\mu$ g de cada lote. Las proteínas corren hacia el cátodo en un buffer  $\beta$ alanina-acético pH 4.42 (8 mA/gel, 100V) - - (ver materiales y métodos). Se observan en todos los geles varias bandas fuertes: 5, 10, 11, 13, 14, 15; bandas moderadas: - 3, 6, 7; y bandas débiles: 1, 2, 8, 9, y 12.

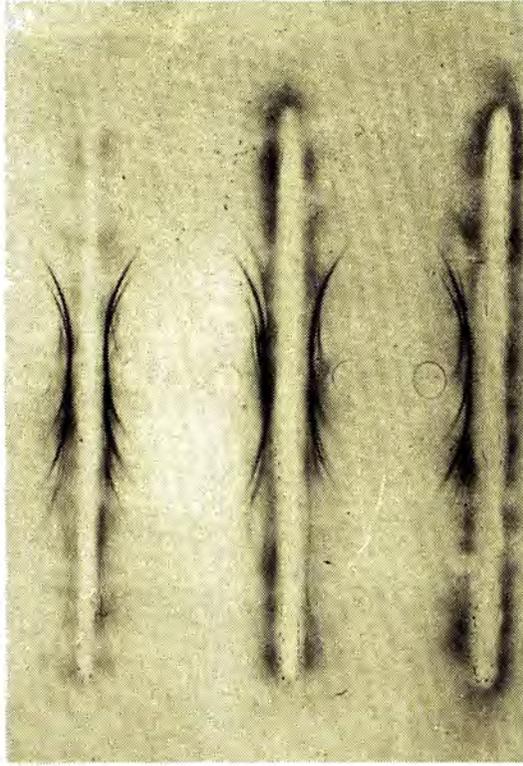


Fig. 3. Inmunolectroforesis del veneno soluble de I. se  
rrulatus proveniente de las cinco regiones geográficas mencio-  
nadas en la fig. 2.

En gel de la placa es de agarosa en buffer TRIS-glicina, -  
0.025 M, pH 8.3. La electroforesis se llevó al cabo a 400 V, -  
2 mA durante dos horas en el mismo amortiguador (pH 8.6) y la-  
difusión se dejó un día a temperatura ambiente y dos más en re-  
frigeración. Se seca la placa con papel Whatman no. 1 y se la  
vó con solución salina isotónica (0.05 %). El proceso se repi-  
tió tres veces. La placa previamente seca se tiñe con amido-  
black al 0.5% por 6 minutos y se destiñe con una solución MeOH/  
ACOH/H<sub>2</sub>O 70:10:20. Se aplicaron 100 µg de cada lote de veneno  
(10 µl) en cada pocillo y 50 µl de suero anti-arácnido (Butan-  
tan) en cada franja.

⊕



⊖

Fig. 3b. Inmunolectroforesis del veneno de I. serrulatus comparado con el veneno de la especie I. discrepans (Venezuela).

En las mismas condiciones descritas en la fig. 3a se aplicaron en el pocillo de la izquierda 100  $\mu$ g de veneno del alacrán I. discrepans y en la derecha 100  $\mu$ g del veneno estándar de I. serrulatus (lote 2). En la franja central, de nuevo se aplicaron 50  $\mu$ l del mismo suero anti-arácnido del I. Butantan.

diferentes del mismo género, a saber: T. serrulatus vs. T. discrepans. Puede verse con claridad la diferencia entre ambos. El veneno de T. discrepans muestra apenas dos bandas nuevas que comparadas con las múltiples bandas discernibles en el veneno de T. serrulatus al reaccionar con el suero respectivo, muestran una indudable heterogeneidad inter-especie.

El comportamiento cromatográfico, finalmente, de lotes de veneno que provienen de zonas restringidas o de mezclas de distintas áreas reveló resultados parecidos a los obtenidos con las anteriores técnicas. Estos resultados se muestran en la sección siguiente, y en las Figs. 4 y 5.

## 2. Purificación de varias toxinas del veneno de T. serrulatus.

Con objeto de analizar la composición del veneno desde un punto de vista cromatográfico, y caracterizar sus diversos componentes tóxicos, se aplicaron alícuotas de veneno soluble (varias aplicaciones independientes) en una columna de dimensiones 0.9 x 200 cm montada con Sephadex G-50 y equilibrada con buffer acetato de amonio, según se describió en Materiales y Métodos, obteniéndose el perfil cromatográfico de 4 - - fracciones que puede observarse en la Fig. 4. La primera de las fracciones presentó actividad hialuronidásica, mientras que los tres picos restantes presentaron actividad tóxica en ratones.

Las cuatro fracciones obtenidas se colectaron por separado, al ser eluidas en base a su peso molecular con el mismo amortiguador. Los datos de recuperación se registran en la tabla I.

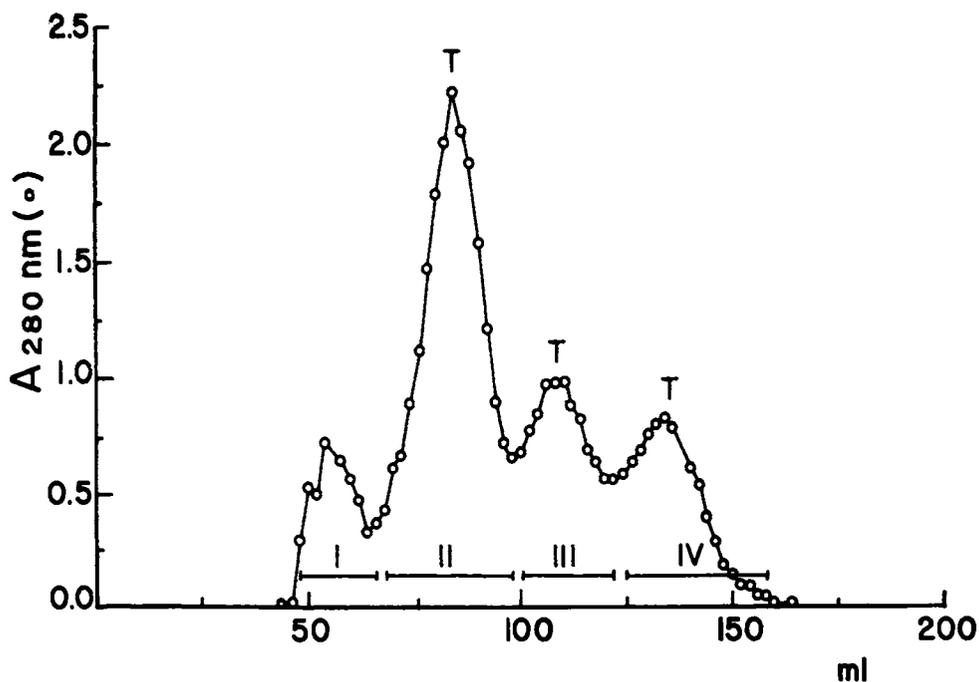


Fig. 4. Cromatografía en gel de exclusión del veneno soluble de I. serrulatus.

Se aplicaron en 1.4 ml lo correspondiente a 160 mg de veneno seco en una columna de Sephadex G-50 de dimensiones 0.9 x 200 cm equilibrada con acetato de amonio 0.02M, pH 4.7. Se eluyó con un flujo de 15 ml/hr, recolectándose fracciones de 2 ml y se mezclaron como se muestra con barras horizontales. La recuperación y los datos de toxicidad se muestran en la tabla I.

TABLA I Recuperación y toxicidad de los componentes cromatográficos.

Columna	Comp. proteico	% Recuperación <sup>a</sup>	Toxicidad <sup>b</sup>
Sephadex G-50 (Fig. 4)	Veneno soluble	100	Letal <sup>c</sup>
	Fracción I	14.1	No tóxico
	Fracción II	31.6	Letal
	Fracción III	19.9	Letal
	Fracción IV	14.4	Letal
	Tubos laterales <sup>d</sup>	2.4	
	Total	82.4	

a. En base a u. de  $A_{280}$

b. Letal significa que el componente a la dosis inyectada (20-40 $\mu$ g) mata al ratón antes de 20 horas.

Tóxico implica que el ratón presenta los siguientes síntomas: excitabilidad, salivación, disnea, diarrea, y al final se recupera.

No tóxico significa ausencia de síntomas.

c.  $DL_{50} = 21.7 \mu\text{g} / 20 \text{ g de ratón}$

d. Corresponden a tubos intermedios.

Las fracciones con actividad tóxica (II, III, IV) provenientes de la misma columna se recromatografiaron por separado en una columna de CMC-32 en las condiciones descritas en la Fig. 5. Los datos de toxicidad y recuperación se describen en la tabla II.

Cada fracción se resolvió en varias sub-fracciones o picos. La fracción II consta de 11 sub-fracciones principales de las cuales las tres últimas presentaron actividad tóxica en ratones; la fracción II-11 (8) corresponde a la toxina mejor caracterizada y que se encuentra en mayor cantidad.

En la fracción III se observan 10 fracciones y en la fracción IV se tienen ocho. A partir de la fracción III-7 y de la IV-5 pudo detectarse toxicidad en ratones.

Debe considerarse que algunos de los picos presentes en alguna de las fracciones pueden corresponder al mismo polipéptido presente en otra, dado que dichas fracciones no están totalmente resueltas, según se ve en el perfil de Sephadex G-50.

A continuación se purificaron por recromatografía cuatro polipéptidos tóxicos. Se eligieron por ser los más abundantes y por estar bastante bien resueltos en la primera cromatografía, lo cual facilita su purificación.

En la fig. 6a se observa la fracción III-10 recromatografiada en las mismas condiciones de la fig. 5. En vista de que se observa una banda con un contaminante ácido en geles de poliacrilamida, se volvió a cromatografiar dicha fracción, previa diálisis en la misma columna, pero con un sistema de fosfato de potasio, 50 mM pH 6, con un gradiente de 0-0.5 M NaCl. Se colectó finalmente el volumen marcado por la barra horizontal en la fig. 6b, que corresponde a un componente ho-

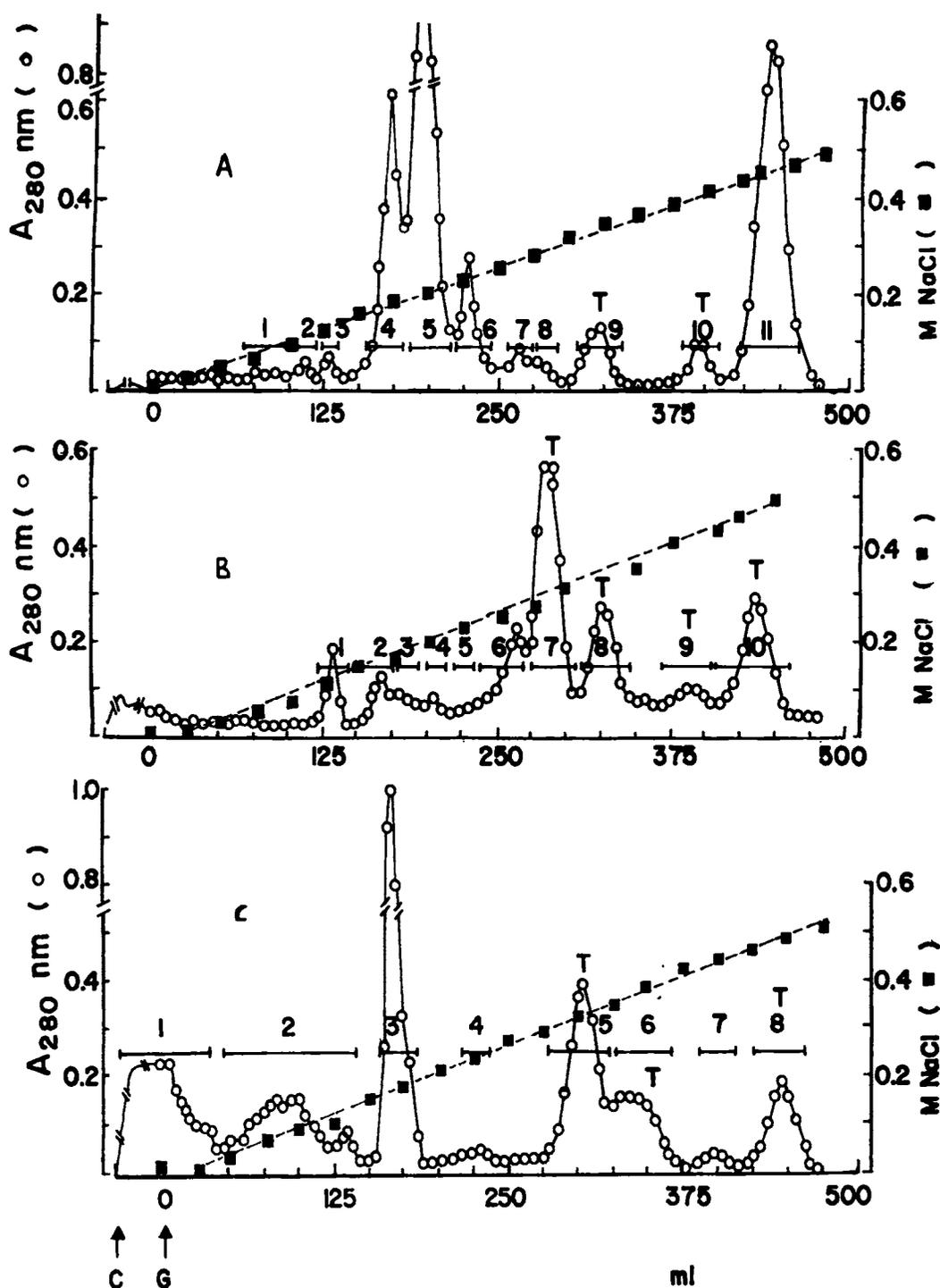


Fig. 5. Cromatografía de intercambio iónico de las fracciones II, III y IV de *I. serrulatus* provenientes de la columna de Sephadex G-50.

En una columna de CM-32, con dimensiones 0.9 x 20 cm, - - equilibrada con acetato de amonio, 0.02 M, pH 4.7, se aplicaron volúmenes determinados de las distintas fracciones. La velocidad de flujo fue de 30 ml/hr empleándose un gradiente lineal de 0 a 0.55 M de NaCl (250 ml vs. 250 ml). Se colectaron fracciones de 2.5 ml y se mezclan según se ve en las gráficas.

Fig. 5a. Se aplicaron de fracción II, 60 unidades de absorbancia a 280 nm en 50 ml del buffer acetato de amonio 0.02-M, pH 4.7. Las distintas fracciones se colectaron según se muestra (11 fracciones).

Fig. 5b. Se aplicaron 45 unidades de absorbancia a 280 nm en 56 ml de fracción III colectándose las 10 fracciones mostradas.

Fig. 5c. Se cargaron 92 unidades de absorbancia a 280 nm en 200 ml de buffer correspondientes a la fracción IV y se colectan 8 fracciones.

Para todos los casos C = cargado, G = inicio del gradiente. Los datos de recuperación y toxicidad se muestran en la tabla II.

TABLA II Recuperación y toxicidad de los componentes cromato  
gráficos.

Columna	Comp. proteico	% Recuperación <sup>a</sup>	Toxicidad <sup>b</sup>
CM-celulosa	Fracción II	100	Letal
(Fig. 5a.)	II-1	0.8	No probado
	II-2	1.0	No probado
	II-3	1.1	No probado
	II-4	12.1	No tóxico
	II-5	25.2	No tóxico
	II-6	5.2	No tóxico
	II-7	1.7	No tóxico
	II-8	0.9	No tóxico
	II-9	3.4	Letal
	II-10	2.4	Letal
	II-11	24.1	Letal
	Tubos laterales <sup>c</sup>	5.6	
	Total	83.4	
CM-celulosa	Fracción III	100	Letal
(Fig. 5b)	III-1	2.9	No tóxico
	III-2}	6.6	No tóxico
	III-3}		No tóxico
	III-4	2.5	No tóxico
	III-5	2.6	Tóxico
	III-6-7	32.4	Letal
	III-8	15.5	Tóxico
	III-9	6.3	Tóxico
	III-10	16.4	Letal
	Tubos laterales	2.4	
	Total	95.1	
CM-celulosa	Fracción IV	100.00	Letal
(Fig.5c)	IV-1	41.2	No probado
	IV-2	10.1	No tóxico
	IV-3	14.3	No tóxico
	IV-4	1.0	Letal
	IV-5	10.5	Letal
	IV-6	5.9	Letal
	IV-7	4.5	Letal
	Tubos laterales	2.6	
	Total	90.9	

a. En base a u. de A<sub>280</sub>

b. Definida al pie de la tabla I

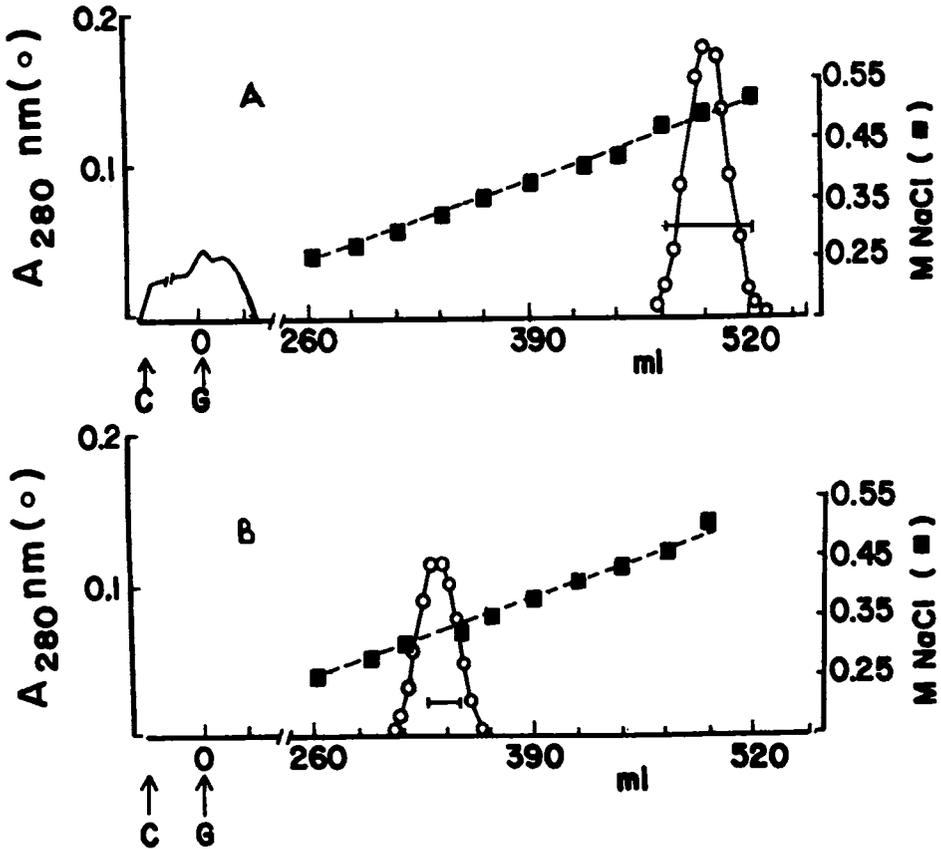


Fig. 6. Recromatografías por intercambio iónico de la -- fracción III-10 proveniente de Sephadex G-50.

6a. Se cargaron 8.3 u de  $A_{280}$  en 92 ml en una columna de CM-32 con dimensiones de 0.9 x 26 cm equilibrada con acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 y se eluyeron con un gradiente de 0 a 0.55 M de NaCl (270 vs. 270 ml). Se colectaron fracciones de 2.6 ml a un flujo de 31 ml/hr. La recuperación fue de 91%.

6b. Recromatografía de la misma fracción III-10 obtenida en el experimento anterior. Se cargaron 59 ml (barra horizontal de fig. 6a) correspondientes a 6.3 u de  $A_{280}$  en la misma columna de CMC-32 pero equilibrada con buffer  $\text{KPO}_4$ , 50 mM, pH 6 y se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 0.55 M. La recuperación fue del 54%.

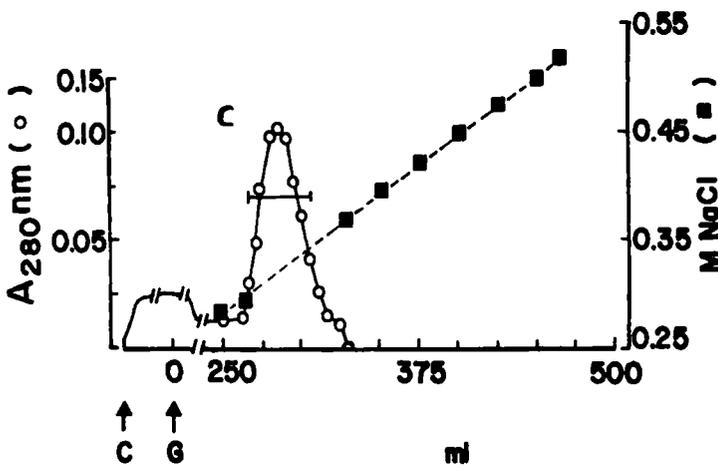
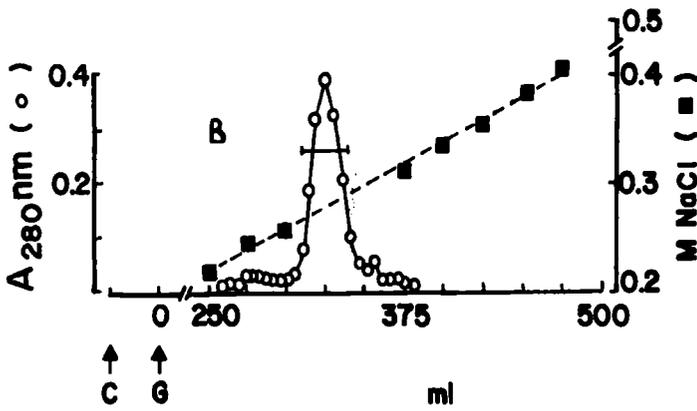
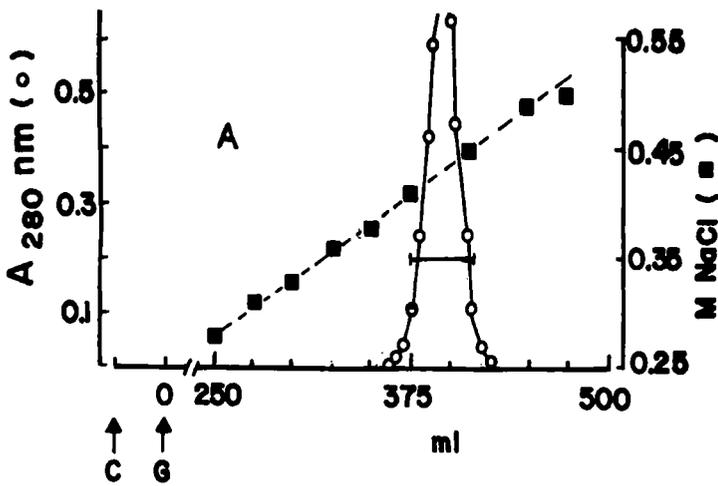


Fig. 7. Purificación de los componentes II-11, III-8 y -IV-5 del veneno de *T. serrulatus*.

Todos estos componentes fueron recromatografiados en las mismas condiciones de la fig. 5, en una columna de CMC-32 de  $0.9 \times 30$  cm equilibrada con buffer acetato de amonio. El flujo fue de 30 ml/hr colectándose fracciones de 2.6 ml.

a) Fracción II-11. Se cargaron 22 u de  $A_{280}$  en 87.5 ml - de buffer. Se obtuvo una recuperación del 80%.

b) Fracción III-8. Se aplicaron 3.4 u. de  $A_{280}$  en 40.5 - ml de buffer. Se recuperó el 100% del material.

c) Fracción IV-5. Se cromatografiaron 4.3 u de  $A_{280}$  en - 91 ml de buffer. Se recuperó el 61% del material aplicado.

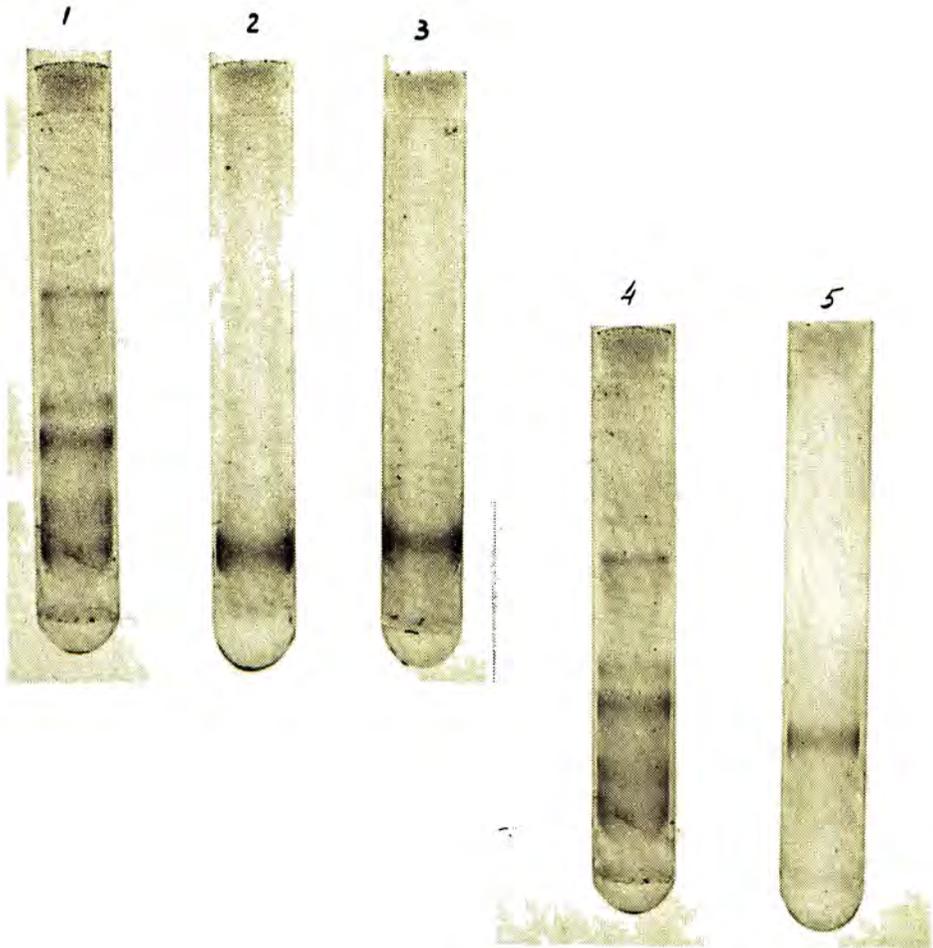


Fig. 7b. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las fracciones II-11 y IV-5 purificadas.

Se muestra en la parte superior las bandas de toxina II-11 homogéneas correspondientes a veneno colectado en la región de Sta. Bárbara y en sus cercanías (geles 2,3). A la izquierda se muestra un control con veneno total de T. serrulatus. (gel-1).

En la parte inferior se muestra la toxina IV-5 (gel 5) en forma de una sola banda homogénea después de ser recromatografiada en una columna de CM-32. A la izquierda se muestra igualmente un control con veneno total. (gel 4)

Para las toxinas III-8 y III-10 se obtuvieron bandas semejantes (datos no mostrados).

TABLA III Composición de aminoácidos de toxinas del veneno de I. serrulatus

Aminoácido	Toxina II-11	Toxina III-10
Asp	3.7 (4) <sup>e</sup>	3.8 (4) <sup>e</sup>
Tre <sup>b</sup>	0.9 (1)	1.1 (1)
Ser <sup>b</sup>	3.8 (4)	3.9 (4)
Glu	3.1 (3)	3.3 (3)
Pro	3.0 (3)	2.8 (3)
Gli	8.0 (8)	8.0 (8)
Ala	3.0 (3)	3.0 (3)
Val <sup>c</sup>	1.8 (2)	2.0 (2)
Met	0.9 (1)	0.9 (1)
Ile <sup>c</sup>	1.9 (2)	2.0 (2)
Leu	3.0 (3)	3.1 (3)
Tir	4.5 (5)	4.7 (5)
Fen	1.0 (1)	1.1 (1)
His	1.0 (1)	1.0 (1)
Lis	5.5 (6)	6.2 (6)
Arg	2.6 (3)	2.8 (3)
Cis	8.0 (8)	6.3 (6-8)
Trp <sup>d</sup>	n.d.	n.d.
Total	58 + trp	58 + trp
Peso molecular <sup>f</sup>	6313	6313

a) residuo/mol basado en gli = 8, 8 para II-11 y III-10

b) extrapolado a tiempo cero

c) valor después de 48 hrs. hidrólisis

d) n.d. - no determinado

e) números entre paréntesis representan el no. entero más próximo

f) peso mol. sin triptófano y asumiendo 8 cisteínas.

TABLA IV Composición de aminoácidos de toxinas del veneno de T. serrulatus.

Aminoácido	Toxina III-8	Toxina IV-5
Asp	4.9 (5)	9.5 (10)
Tre <sup>b</sup>	1.9 (2)	1.9 (2)
Ser <sup>b</sup>	2.8 (3)	2.8 (3)
Glu	2.2 (2)	2.0 (2)
Pro	2.8 (3)	2.8 (3)
Gli	6.0 (6)	4.0 (4)
Ala	5.6 (6)	2.9 (3)
Val <sup>c</sup>	1.9 (2)	1.8 (2)
Met	0.9 (1)	0.0 (0)
Ile <sup>c</sup>	1.8 (2)	1.8 (2)
Leu	1.3 (1)	3.0 (3)
Tir	5.3 (5)	7.7 (8)
Fen	2.9 (3)	0.0 (0)
His	2.7 (3)	1.0 (1)
Lis	6.9 (7)	6.7 (7)
Arg	1.0 (1)	0.0 (0)
Cis	6.5 (6-8)	7.0 (6-8)
Trp <sup>d</sup>	n.d.	n.d.
Total	60 + Trp	58 + Trp
Peso molecular	6569	6525

a) residuo/mol basado en gli = 6, 4 para III-8 y IV-5.

b) extrapolado a tiempo cero

c) valor después de 48 horas de hidrólisis

d) n.d. - no determinado

e) números entre paréntesis representan el no. entero más próximo

f) peso mol. sin triptofano y asumiendo 8 cisteínas.

mogéneo por geles de poliacrilamida en el sistema acetato - - urea.

En la Fig. 7 se muestran las recromatografías en CMC-32- de los componentes II-11 (  $\delta$  ), III-8 y IV-5. Se obtuvieron - bandas homogéneas como las mostradas en la Fig. 7b.

Se dializaron las fracciones homogéneas contra agua y fi nalmente se liofilizaron, procediéndose a caracterizarlas qu micamente por análisis de aminoácidos. Los resultados del -- análisis de estos componentes tóxicos se muestran en las ta-- blas III y IV. Son polipéptidos básicos que poseen entre 60- 63 aminoácidos entre ellos 8 cisteínas que forman casi con se guridad 4 puentes disulfuro (Kopeyan, C., et al 1974), dando a la molécula un carácter muy compacto, y de peso molecular - de 7000 aproximadamente.

Las toxinas II-11 y III-10 presentan una composición - - prácticamente idéntica aunque su comportamiento cromatográfico no fue semejante por CMC. Las toxinas III-8 y IV-5 mues-- tran composiciones distintas.

El siguiente paso fue la determinación de la estructura- primaria de las toxinas purificadas. La secuencia N-terminal de estas toxinas se realizó previamente (Possani, et al., - - 1981c). Como parte de esta tesis se pretende completar la se cuencia de la toxina III-10, cuyo extremo C-terminal no ha si do aún determinado.

### 3. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la toxina III-10

La primera etapa en la determinación de la secuencia con sistió en la reducción y carboximetilación de la toxina. - -

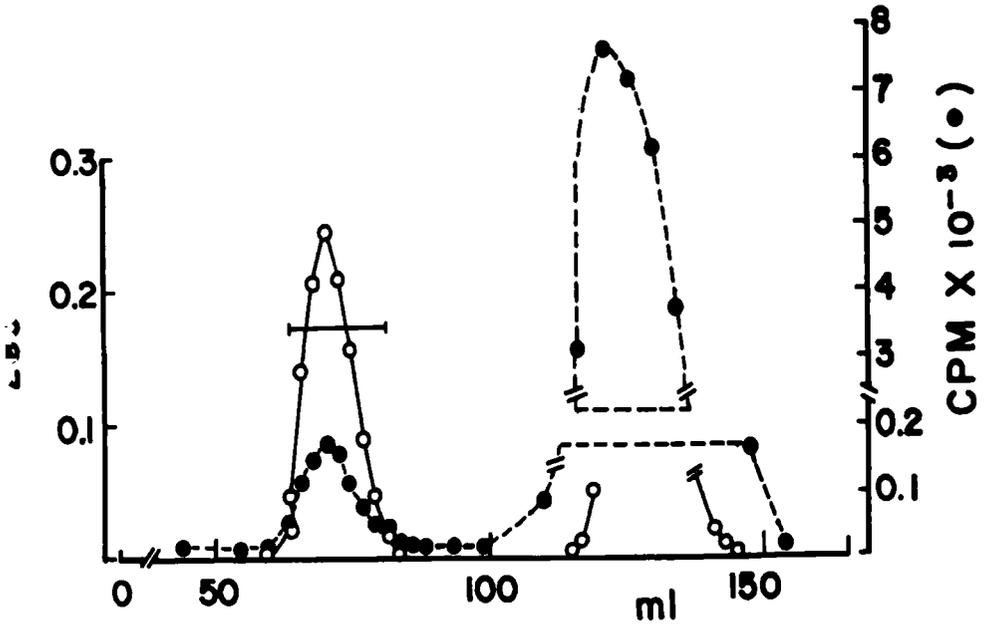


Fig. 8. Filtración en gel de la toxina II-11 de *I. serrulatus* reducida y carboximetilada.

En una columna de Sephadex G-50 de 0.9 x 200 cm se aplicaron 5.7 mg de toxina II-11 (814 nmoles) reducida y carboximetilada en un volumen de 2.3 ml de mezcla de reacción. Se eluyó con AcOH al 10% con un flujo de 20 ml/hora colectándose fracciones de 2.2 ml. Eluye en primer término la toxina y en seguida los reactivos excedentes.

(ver Materiales y Métodos, sección 5; Fig. 8).

Teniendo ya la toxina reducida y carboximetilada se intentó determinar la secuencia C-terminal de la misma utilizando para ello la acción enzimática de varias carboxipeptidasas: A, B y Y (CpA, CpB y CpY).

En un experimento típico con CpA, a una solución de 400- $\mu$ l de buffer de fosfatos de sodio 0.2 M, pH 8 con 50 nmoles de toxina III-10 se añaden 5  $\mu$ l (0.64 nmol) de CpA disuelta en bicarbonato de amonio 1 M.

En otro experimento típico con CpB se intentan hidrolizar 12 nmoles de toxina disueltas en 120  $\mu$ l del mismo buffer con 1 nmol (10  $\mu$ l de bicarbonato de amonio).

Se sacan alícuotas de 25-30  $\mu$ l deteniéndose la reacción con ácido acético 20%. Se evaporan éstas y se hace análisis de aminoácidos, correspondientes a los distintos tiempos.

No se pudo observar hidrólisis significativa en el extremo carboxilo terminal de la toxina con ninguna de las dos enzimas, aún cuando se hicieron varios experimentos cambiando variables distintas.

La CpY fue probada en presencia de 0.01% de SDS en la mezcla de reacción. En este experimento 12 nmoles de toxina en 200  $\mu$ l de acetato de N-etilmorfolina 0.025 M, pH 7, se digirieron con 0.3 nmoles (0.8  $\mu$ g en 20  $\mu$ l de agua) de CpY a temperatura ambiente. La relación enzima/sustrato fue en este caso de 1/40. Se sacaron alícuotas de 50  $\mu$ l parando la reacción con ácido acético al 20%. Se esperaba una hidrólisis máxima por alícuota de 3 nmoles.

Se tuvieron en este experimento varios problemas evidentes:

a) Liberación de múltiples aminoácidos, aún desde el tiempo 0, lo cual podría explicarse por la presencia de una endoproteasa contaminante (posiblemente la proteasa A de levadura) b) al tratar de inhibir la actividad endoproteásica -- con pepstatina (preincubación de la enzima por 4 minutos con 10  $\mu$ l de pepstatina A, 5 mM), inhibidor específico para proteasas ácidas, se observa una desaparición de la actividad enzimática, lo cual corrobora la hipótesis anterior y puede indicar que el extremo C terminal no es accesible a la acción enzimática.

En vista de estos problemas se decidió fragmentar la toxina III-10 con proteasa V-8 de S. aureus con el fin de aislar el extremo C-terminal, para tenerlo accesible al ataque de la enzima e incluso secuenciar el fragmento, lo cual finalmente se hizo.

En la Fig. 9 se observa el patrón obtenido por cromatografía líquida de alta presión (C.L.A.P.) de una digestión de 0.816 mg de toxina III-10 con proteasa V-8 (Miles Lab). Se determinó la radiactividad de cada fracción dado que el fragmento C terminal esperado (un hexapéptido) contiene cisteína marcada, y se hizo análisis de aminoácidos de estas mismas -- fracciones con objeto de identificar los fragmentos obtenidos.

En la tabla V se muestra la posible identidad de los péptidos obtenidos, determinada por análisis de aminoácidos. El hexapéptido N terminal producto de la ruptura en el Asp 55 parece corresponder al pico 2 obtenido por C.L.A.P.

Una vez aislado este hexapéptido fue tratado con CpY sin producirse liberación de ningún aminoácido, por lo cual se secuenciaron finalmente 3.5 nmoles del mismo. La secuencia C--

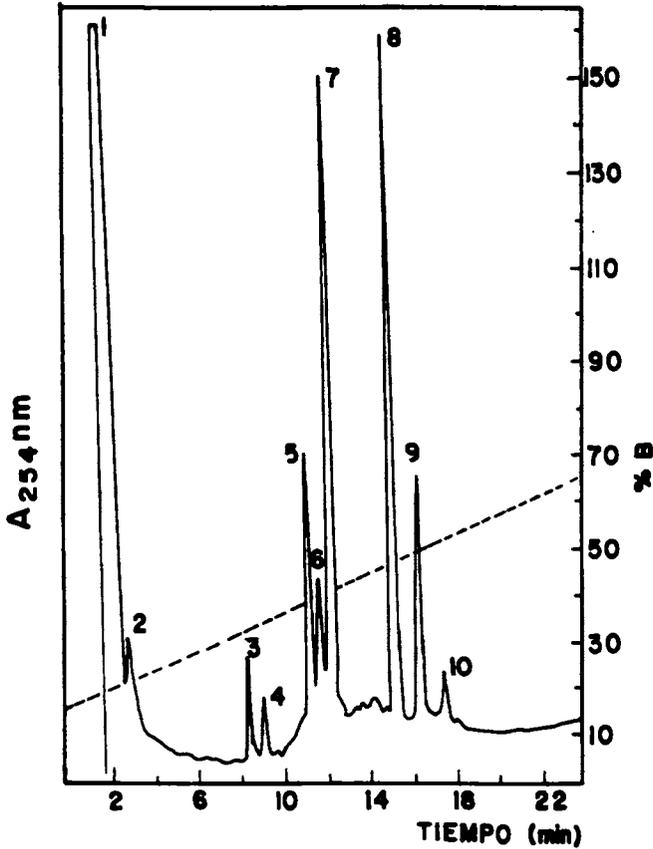


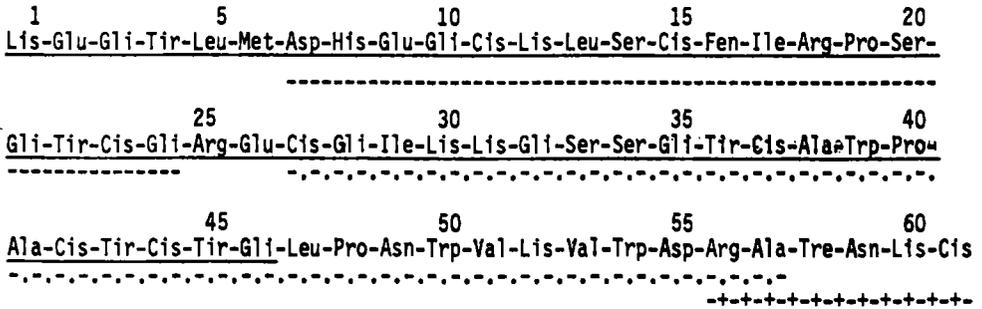
Fig. 9 Cromatografía líquida de alta presión (C.L.A.P.) - de una digestión enzimática de la toxina II-11 de T. serrulatus con proteasa V-8 de S. aureus.

Se aplicaron 50  $\mu$ l (aprox. 5 nmoles) del péptido tóxico digerido en una columna Lichrosorb RP 18 (fase reversa) y se cromatografió la muestra en un sistema: A) ácido trifluoroacético-0.1% en agua B) Gradiente de 0-55% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  con ác. trifluoroacético. El flujo fue de 1 ml/min a 40°C y la longitud de onda empleada en el registro fue 254 nm. En la tabla V se indica la posible identidad de los picos que muestran radiactividad debida a carboximetil-Cis radiactiva.

TABLA V Composición de aminoácidos de péptidos de la toxina-III-10 obtenidos por digestión con proteasa V-8 de S. aureus.

No. de fracción	1 + 2*	5	7	7-8
Asp	1.0 (1)	-	-	2.3 (2)
Tre	0.9 (1)	-	-	-
Ser	0.3 (0)	2.5 (2)	2.6 (2)	-
Glu	1.2 (1)	1.4 (1)	0.3 (0)	-
Pro	-	0.9 (1)	1.4 (1)	1.1 (1)
Gli	0.6 (1)	3.9 (3)	4.7 (4)	-
Ala	1.3 (1)	0.3 (0)	2.1 (2)	-
Cis	-	-	-	-
Val	-	-	-	1.6 (2)
Met	-	-	-	-
Ile	-	1.2 (1)	1.0 (1)	-
Leu	0.2 (0)	1.3 (1)	-	0.9 (1)
Tir	-	1.3 (1)	3.0 (3)	-
Fen	-	1.1 (1)	-	-
His	0.2 (0)	-	-	-
Lis	1.8 (2)	1.1 (1)	2.2 (2)	1 (1)
Arg	0.9 (1)	2.0 (2)	-	-
Péptido corres-				
pondiente se--	A + F	D	E	G
gún fig. 10.				

\*Ver fig. 9



Auto \_\_\_\_\_  
 CN-Br -----  
 V-8 pH ácido -.-.-.-.-.  
 V-8 pH básico -+--+--+--+

Péptidos aislados por C.L.A.P. provenientes de la digestión con proteasa V-8 de S. aureus.  
 A ----- 1 - 2  
 D ----- 10 - 26  
 E ----- 27 - 49  
 G ----- 47 - 55  
 F ----- 56 - 61

Fig. 10. Secuencia de aminoácidos total de la toxina III-10 de T. serrulatus.

Con líneas horizontales por debajo de la secuencia se muestran los diversos fragmentos obtenidos por métodos químicos o enzimáticos para estructurar la secuencia total. La secuencia hasta el residuo 57 fue realizada anteriormente por Possani et al., 1981 (Carlsberg Res. Comm., 46: 195-205). Los últimos cuatro residuos fueron determinados por secuenciación automática del hexapéptido F obtenido por digestión con proteasa V-8 de S. aureus en amortiguador fosfatos de sodio, 0.2 M, pH 8.

Abajo se indican los péptidos provenientes de la digestión con dicha proteasa, aislados por C.L.A.P. e identificados por análisis de aminoácidos.

terminal obtenida es Arg-Ala-Tre-Asn-Lis-Cis. En la Fig. 10- se muestra la secuencia total de la toxina III-10, la mayor - parte de la cual se realizó anteriormente (Possani et al., -- 1981 c, 1983 en rev.).

#### 4. Síntesis de la región N-terminal correspondiente a la toxina III-10.

En la Fig. 11 se muestra el pentadecapéptido N-terminal- sintetizado en fase sólida tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

En relación a este péptido sintético se hicieron cuatro- tipos de estudios:

- a) Se determinó la composición de aminoácidos del pépti- do por hidrólisis con HCl/ácido propiónico 1:1 duran- te 15 minutos a 160°C, en base a lo cual se determina- ron también los rendimientos de la ruptura con HF del enlace entre el péptido y la resina;
- b) Se estudió su toxicidad en ratones;
- c) Se determinó su perfil cromatográfico por C.L.A.P.;
- d) Se realizaron estudios inmunológicos con el mismo, -- los cuales se describen en la siguiente sección.

En la tabla VI se registran los análisis de aminoácidos realizados con el péptido ya separado de la resina, así como- con la resina unida al péptido antes y después de la ruptura.

Los datos de análisis de aminoácidos revelaron una compo- sición que es consistente con la que se esperaba para el pen-



TABLA VI Composición de aminoácidos del péptido sintético<sup>a</sup>

	Resina-péptido	Resina después de ruptura	Péptido después de ruptura	Composición teórica
Asp	0.9 (1)	0.8 (1)	0.8 (1)	1
Ser	1.1 (1)	0.85 (1)	0.5 (1)	1
Tre	-	-	-	-
Glu	2.1 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2
Pro	-	-	-	-
Gli	2.0 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	2
Ala	-	-	-	-
Val	-	-	-	-
Met	0.7 (1)	0.7 (1)	0.8 (1)	1
Ile	-	-	-	-
Leu	2.0 (2)	2.0 (2)	1.9 (2)	-
Tir	0.8 (1)	0.8 (1)	0.7 (1)	1
Fen	-	-	-	-
His	1.1 (1)	0.8 (1)	1.0 (1)	1
Lis	2.1 (2)	1.7 (2)	1.9 (2)	2
Arg	-	-	-	-
Cis	n.d. <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	2
TOTAL	13	13	13	15

a. Residuo/mol basado en gli; Hidrólisis con HCL/ác. propiónico 1:1 160°C, 15 mi

b. No determinado.

tadecapéptido sintetizado (ver fig. 11).

El rendimiento de la ruptura con HF se calcula de la siguiente manera (de un peso total de resina-péptido de 2.83 g, estos datos corresponden a la 2a ruptura efectuada, la más -- eficiente, y que se realizó con 1.186 g del material, es decir, la mitad aproximadamente):

1º Control (resina-péptido):

$$\frac{22 \text{ nmol Leu}^*}{2 \text{ Leu/péptido}} \times \frac{200 \mu\text{l} \text{ totales}}{200 \mu\text{l} \text{ analizados}} \times \frac{1186 \text{ mg res. - pept.}}{1.375 \text{ mg en } 200 \text{ l}}$$

$$= 94 \ 880 \text{ nmol} = 94.88 \mu\text{mol}$$

2º- Resina después de la ruptura:

$$\frac{12 \text{ nmol Leu}}{2} \times \frac{200 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}} \times \frac{817.6 \text{ mg}}{2.07 \text{ mg}} = 23698 \text{ nmol} = 23.69 \mu\text{mol}$$

3º Péptido separado

$$\frac{23.3 \text{ nmol Leu}}{2} \times \frac{100 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}} \times \frac{173.2 \text{ mg}}{0.145 \text{ mg}} \times 69578 \text{ nmol} = 69.58 \mu\text{mol}$$

Por tanto:	94.88 $\mu\text{mol}$	- - - -	100%
	69.58 $\mu\text{mol}$	- - - -	x

$$x = \text{Rendimiento} = 73.3\%$$

Quedó unido a la resina consiguientemente el 26.7% del péptido, el cual puede recuperarse haciendo una ruptura adicional.

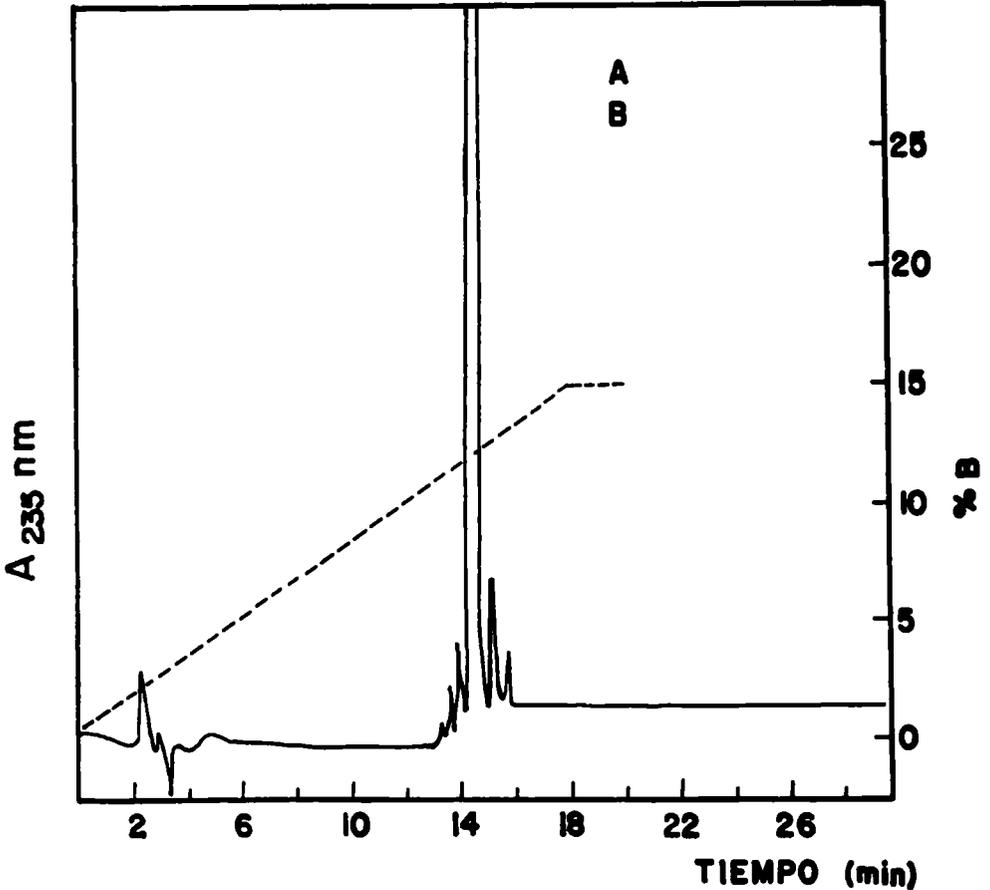


Fig. 12. Cromatografía líquida de alta presión del péptido sintético.

Se aplicaron 100  $\mu$ l de una solución con  $A_{196} = 9.3$ , en una columna de fase reversa Waters RP18. Se cromatografió la muestra en un sistema de ác. trifluoroacético 0.05% aplicando un gradiente 0-15% MeOH, con un flujo de 1.5 ml/min y utilizando una long. de onda de 235 nm. La recuperación fue del 80%.

Para probar la posible toxicidad del péptido, se pesaron 1.29 mg del mismo ajustándose la concentración a 1 mg/ml con agua bidestilada. En seguida se inocularon dos ratones a y b:

- a.- Con 200  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$
- b.- Con 300  $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$

Ninguno de los dos animales experimentales mostró síntomas de intoxicación en estas condiciones.

Se muestra, en tercer término, en la fig. 12 el perfil en C.L.A.P. del pentadecapéptido sintético detectado a una longitud de onda de 235 nm en una columna de fase reversa. El pico mayor representa al menos el 85% del material aplicado, y la recuperación en relación a éste es del 80% mínimo. Las condiciones de la cromatografía se describen al pie de la fig. -- mencionada.

##### 5. Inmunización de ratones con el pentadecapéptido N-terminal sintético.

En colaboración con Georgina Gurrola se prepararon polímeros del péptido con glutaraldehído con los cuales se inocularon varios ratones siguiendo el esquema de inmunización descrito en la sección de materiales y métodos. En la fig. 13 se muestra el resultado de la inmunodifusión realizada. En la parte izquierda se muestra una banda de precipitación producto de la reacción entre la toxina III-10 íntegra y el suero obtenido como resultado de la inmunización de los animales con el péptido N-terminal sintético. El suero, que se encuentra en el pocillo central, no muestra reacción aparente con la muestra de veneno total ni con la fracción II (Sephadex G-50) del mismo, reacción que sí se observa en el extremo derecho en el cual el suero anti-arácnido del I. Butantan produce cuatro ban

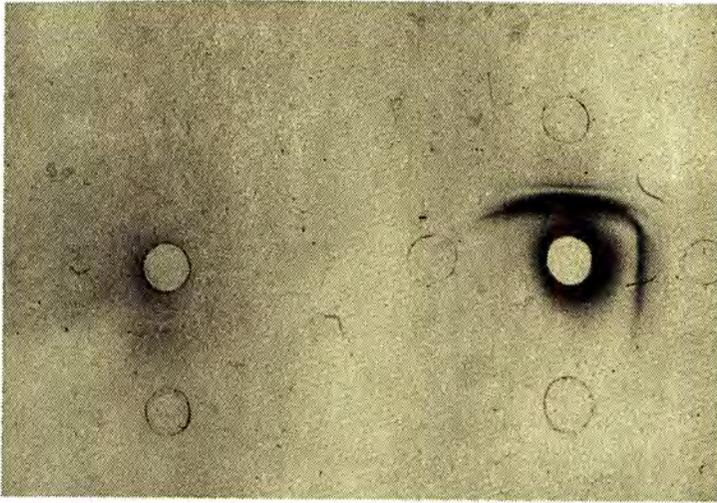


Fig. 13. Inmunodifusión con suero anti-pentadecapéptido-N terminal sintético.

En los pocillos centrales se aplicaron, a la izquierda, - 15  $\mu$ l de suero anti-péptido y a la derecha 15  $\mu$ l de suero anti arácnido del Instituto Butantan.

En los pocillos circundantes se aplicaron las siguientes-muestras: 1) Veneno total de T. serrulatus (150  $\mu$ g); 2) Fracción II del mismo veneno (150  $\mu$ g); 3) Toxina III-10 (50  $\mu$ g) - 4) Control PBS (buffer fosfatos).

Se dejó la inmunodifusión durante 12 horas a temperatura-ambiente. Se tiñó con amido black al 0.5% y se destiñó con -- ácido acético al 10%.

Se observa a la izquierda una banda tenue de precipita- - ción de la reacción del suero anti-péptido sintético con la toxina III-10.

A la derecha se observan 4 bandas de precipitación corres- pondientes al veneno total al reaccionar con suero anti-arácnido y otra más referente a la fracción II del mismo veneno.

das al reaccionar con veneno total de T. serrulatus y una al - hacerlo con la fracción II (la banda se une por su extremo con su correspondiente antígeno homólogo del veneno total).

El suero anti-extremo N terminal de la Toxina III-10 corresponde al obtenido del sangrado de la 7a semana de tres de los cinco ratones originales, después del refuerzo de la 6a semana.

#### IV.- DISCUSION

##### a. Homogeneidad del veneno del alacrán T. serrulatus

El estudio comparativo de lotes de veneno de T. serrulatus provenientes de varias localidades, por determinación de  $DL_{50}$ , electroforesis e inmunoelectroforesis reveló que a pesar de la heterogeneidad de origen de los mismos, presentan composiciones semejantes al ser analizados por estas técnicas.

En la Fig. 1 se muestra que dos lotes provenientes de regiones cercanas a Sta. Bárbara resultan tener una  $DL_{50}$  que se sobreponen.

En la Fig. 2 se observa que los 5 lotes de veneno procedentes de cuatro regiones distintas presentan una distribución muy semejante de la 14-15 bandas (fuertes, moderadas y débiles) presentes en los geles electroforéticos respectivos.

Lo mismo puede observarse en la Fig. 3 donde se observan 4 ó 5 bandas fuertes agrupadas cerca del centro, mientras que 4 bandas débiles se encuentran dirigidas al cátodo y otras 5 se hallan del lado del ánodo.

Todos los lotes muestran pues una composición homogénea que descarta la posibilidad señalada por algunos autores (Gómez y Diniz, 1966; Coutinho Netto y Diniz, 1976) de la presencia de variaciones inter-específicas significativas en los venenos de alacranes colectados en áreas restringidas, ya que siempre se habían utilizado mezclas de venenos provenientes de áreas más amplias (Possani et al., 1977).

Además de la representatividad de las muestras de veneno que comúnmente se analizan, se pone de manifiesto la naturaleza básica de los principales componentes tóxicos, en especial en la electroforesis y la cromatografía en columna (ver más -- abajo) y que el número de componentes aparentes es relativo al poder resolutivo de la técnica utilizada en el análisis.

Finalmente en la fig. 3b se observa claramente la diferencia que existe en los venenos de dos especies diferentes de -- alacrán, como son I. serrulatus y I. discrepans (proveniente -- de Venezuela), al ser analizados por inmunoelectroforesis contra el suero antialacránico obtenido contra I. serrulatus, I. trinitatus y I. bahiensis. (I. Butantan); este experimento resultó ser un control muy adecuado.

A pesar de estos experimentos, sin embargo no pueden descartarse variaciones pequeñas indiscernibles con estas técnicas. De hecho el lote de veneno proveniente de Corrego Novo -- (M.G.), presenta ciertas pequeñas diferencias.

b. Purificación y caracterización parcial de algunas toxinas de I. serrulatus.

La cromatografía de exclusión y la de intercambio iónico han sido los métodos más comunes, utilizados en la purificación de componentes tóxicos de venenos de alacrán, a partir -- de los trabajos de Miranda, et al., 1966.

Lo dicho sobre el número de componentes tóxicos y su naturaleza básica y del poder resolutivo de la técnica se aplica -- también en este caso, y aun de manera más específica dependiendo de la estrategia de la purificación (Gómez y Diniz, 1966; -- Miranda, et al., 1966; Possani et al., 1977, 1981, 1983).

Según esto se hace necesario establecer un criterio químico para poder resolver el problema de la identidad de los componentes tóxicos.

El perfil cromatográfico de los distintos lotes de veneno estudiados (colectados en general en regiones cercanas a Sta.-Bárbara o en zonas distantes hasta 100 Km y en distintas épocas del año) es cuantitativamente el mismo, aunque sí existen diferencias en las proporciones cuantitativas de las distintas fracciones. Esto de todos modos no anula la representatividad de las muestras usadas, como se dijo más arriba (ver Figs. 4 y 5).

En la tabla I y II se registran los datos de recuperación de los distintos componentes cromatográficos y los de toxicidad en base al criterio descrito al pie de la tabla I. Como puede observarse se obtuvo una recuperación del 82% en la columna de Sephadex G-50 siendo la fracción II la más abundante con 32% del total. En las columnas de CM-celulosa se obtuvieron recuperaciones que van del 80 al 95% para las fracciones II, III y IV. Los componentes letales o tóxicos correspondieron a la parte más básica del gradiente de fuerza iónica.

Fue posible purificar por simple recromatografía, en orden decreciente de basicidad los componentes II-11, III-10, III-8 y IV-5, que son los principales componentes tóxicos desde el punto de vista cuantitativo, como se aprecia en la tabla II y en las figs. 5, 6 y 7.

Según el volumen de elución en la fig. 5, las toxinas II-11 y III-10, o la III-10 y la IV-8 pudieran ser una misma toxina. Lo mismo puede decirse de los componentes II-10 y III-9 ó del III-9 y del IV-7, que eluyen de acuerdo al gradiente salino a fuerzas iónicas semejantes.

El primer paso para la caracterización química de las diversas fracciones cromatográficas fue el análisis de aminoácidos. En las tablas III y IV se muestra la composición de aminoácidos de las toxinas mencionadas. Los comp. II-11 y III-10 parecen corresponder a una sola toxina, mientras que la III-8- y la IV-5 son distintas. Debido a este criterio se nombra indistintamente a la toxina con composición de aminoácidos idéntica como II-11 ó III-10.

Puede notarse que todas las toxinas presentan 8 Cys y 1 - Met con excepción de la IV-5 que no posee metioninas. Por otra parte predominan los residuos básicos sobre los ácidos -- con la excepción nuevamente de la toxina IV-5 en la cual parecen predominar los ácidos (aunque no se descarta la posible -- presencia de Asn o Gln).

Como criterio de pureza de los componentes aislados se -- utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida, como se muestra en la fig. 7b donde se observan las bandas electroforé- ticas de las toxinas IV-5 y de la II-11 (dos lotes distintos)- en forma homogénea. Bandas del mismo tipo se han obtenido para los otros dos componentes purificados.

El criterio definitivo y paso fundamental en la caracteri- zación e identificación de las toxinas presentes, y en estu- - dios más finos y de mayor complejidad, fue la determinación de la estructura primaria de los polipéptidos.

c. Secuencia de aminoácidos de una toxina del veneno de Tityus serrulatus.

Con objeto de determinar la secuencia de la toxina III-10 se requirió abrir la cadena polipeptídica rompiendo los puen- - tes disulfuro, para lo cual se redujeron éstos con ditiotrei--

tol y se carboximetilaron las cisteínas con ácido iodacético - radiactivo, para evitar la reoxidación y tener marcadas las -- cisteínas, haciéndose más fácil su identificación.

La actividad específica de la toxina reducida y carboximetilada puede calcularse de la manera siguiente:

Vol colectado	- - - - -	23 ml
A <sub>280</sub>	- - - - -	0.115
Actividad	- - - - -	218 cpm (5 µl en 5 ml Bray)
a A <sub>280</sub> total	- - - - -	23 ml x 0.115 = 2.645
Actividad total	- - - - -	218 cpm x 200 x 23 ml = 1 002 800 cpm

$$\text{Coef. de extinción de la toxina } E^{280} = 3.3$$

$$A_{280} \text{ total} / E^{280} = 0.801 \text{ mg}$$

$$\frac{801 \text{ g}}{7000 \text{ g/mol}} = 0.114 \text{ mol} = 125 \text{ nmol}$$

$$\text{Act. específica} = 1\,002\,800 / 125 \text{ nmol} = 8.022 \times 10^3 \text{ cpm/nmol}$$

Una vez que la toxina se redujo y carboximetiló como va - dicho se intentó como parte de esta tesis, determinar los cuatro últimos aminoácidos de la secuencia, ya que el resto de la secuencia fue determinada previamente por secuenciación automática (Possani et al., 1977, 1981, 1983).

La dificultad de la determinación del extremo C terminal - por secuenciación automática estriba en que dado que el rendimiento repetitivo de cada ciclo de secuencia nunca es del 100%, debido a la pérdida de muestra por arrastre de los solventes y por acoplamiento incompleto, el ruido que se obtienen en los -

ciclos finales aumenta hasta que se vuelve imposible identificar los aminoácidos. La pérdida del péptido por arrastre es mayor en tanto que éste se va haciendo más pequeño.

Por este motivo se emplearon diversas carboxipeptidasas, entre ellas la CpA, CpB y CpY. Se sabía por composición de aminoácidos y los datos de secuencia que esos últimos 4 aminoácidos son Tre, Cis, Lis y Asn.

La CpA libera rápidamente residuos no polares, al igual que His, Gln, Tre y Asn y Ser más lentamente. La CpB libera rápidamente sobre todo residuos básicos como Lis y Arg. Se emplearon ambos tipos de enzima e incluso una mezcla de ellas, sin que pudieran obtenerse resultados claros. Presumiblemente el extremo C terminal no fue accesible al ataque enzimático.

Los resultados obtenidos con CpY en presencia de SDS estuvieron lejos de ser claros, debido al problema de una aparente contaminación de la enzima con actividad endoproteásica inhibible con pepstatina A.

Debido a las razones expuestas en la sección de resultados, se decidió fragmentar enzimáticamente la toxina III-10 y tratar de aislar la porción C terminal para evitar los problemas de posibles impedimentos conformacionales. Aprovechando la presencia de Asp en la posición 55 de esta toxina de 61 aminoácidos se utilizó la proteasa V-8 de S. aureus (Miles Lab.) que rompe uniones peptídicas con Glu, o con Asp si se emplea para este último caso un buffer  $\text{NaPO}_4$  0.2 M, pH 8. La ruptura se lleva a cabo por el extremo COOH de los aminoácidos mencionados. (Drapeau et al., 1972).

Se analizó la muestra de toxina digerida por CLAP obteniéndose 10 fracciones principales (long. de onda 254 nm) se--

gún se observa en la fig. 9. Los péptidos hidrofílicos eluyeron en primer término y los más hidrofóbicos en seguida, en el sistema de gradiente de metanol en columna de fase reversa. - En la tabla V se identifican algunos de los fragmentos obtenidos con porciones de la secuencia de la toxina (ver fig. 10), - en base al análisis de aminoácidos respectivo. El péptido C - terminal parece corresponder a la fracción 2. Se pensó llevar al cabo, como paso a seguir la digestión de este péptido - con CpY o la determinación de su secuencia por reacción de Edman.

La digestión del péptido C-terminal con CpY se intentó -- sin que hubiera liberación de aminoácidos, lo cual indica que el extremo del mismo está bloqueado y que no se trata de un -- problema conformacional.

Finalmente se determinó la secuencia del hexapéptido C -- terminal en un secuenciador automático de alta sensibilidad -- Beckman 890 M encontrándose la secuencia siguiente: -Arg-Ala-  
Tre-Asn-Lis-Cis-OH.  
56

Este resultado confirma la identidad del péptido aislado por C.L.A.P., proveniente de la digestión de la toxina III-10 - con proteasa V-8 de S. aureus, y explica el hecho de que las - carboxipeptidasas no pudieran digerir el extremo C terminal. - En efecto, la Cis C terminal se encuentra en forma de su carbo<sub>x</sub>imetil derivado, que no permite el ataque enzimático.

En base a la secuencia de aminoácidos propuesta para esta toxina III-10 puede clasificársela en un grupo estructural específico basándose para ello en el grado de homología existente entre las secuencias conocidas de toxinas de alacrán. En - la tabla VII se registran algunas de las secuencias completas -

TABLA VII Secuencias completas de aminoácidos de las toxinas de alacrán

Grupo

	Css II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAF----ACWC-THLY-EQAVVWPLPNK-TCN
	Css III	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAF----ACWC-EALP-DHTOVW-VPNK--CT
1.	Css I	KDGYLVEK-TGCKKTCYKLGENDFCNRECKWKHIGGSYG YCYGF----GCYC-EGLP-DSTQTWPLPNK--CT
	CsE v1	KEGYLVKKS D GCKYDCFWLGKNEHNTCECKAKNQGGSYG YCYAF----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CS
	CsE v2	KEGYLVNKSTGCKYGLKLGENE GNKCECKAKNQGGSYG YCYAF----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CSS
	Cse v3	KEGYLVKKS D GCKYGLKLGENE GCDECKAKNQGGSYG YCYAF----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--SC
2.	T.s. III-10	KEGYLMD-HEGCKLSCF-IRPSGYCGRECGIKK--GSSGYCAWP----ACYC-YGLPNWVKVDRATNKC
	AaH I	KRDGYIVYPN-NCVYHC VPP-----CDGLCKKN-GGSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPIKDTSRK--CT
	AaH 1'	KRDGYLVYPN-NCVYHCIPP-----CDGLCKKN-GGSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPLKDTSRK--CT
3.	AaH I''	KRDGYIVYPN-NCVYHC VPP-----CDGLCKKN-GGSSGSSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPIKDTSRK--CTR
	AaH III	VRDGYIVNSK-NCVYHC VPP-----CDGLCKKN-GAKSGS-CGFLIPSGLACWC-VALP-DNVPIKDPSYK--CHS
	AaH II	VKDG YIVDDV-NCTYFCGR---NAYCNEE CKL-KGFSG-YCQWASPYGNACYCYK-LP-DHVRTKGPGR---CH
	Lqq V	LKDG YIVDDV-NCTFFCGR---NAYCNDECKKK-GGESG-YCQWASPYGNACWCYC-LP-DRVSIKEKGR---CN
	Amm V	LKDG YIDDL-NCTFFCGR---NAYCDECKKK-GGESG-YCQWASPYGNACWCYC-LP-DRVSIKEKGR---CN
4.	Bot III	VKDG YIVDDR-NCTYFCGR---NAYCNEE CKL-KGESG-YCQWASPYGNACYCYC-VP-DHVRTKGPGR---CN
	Bep M10	VRDGYIADDK-DCA YFGGR---NAYCDEE CKK--GAESG-KCWYAGQYGNACWCYC-LP -DWVPIKQKVS GK-CN
	Lqq IV	GVRDAYIADDK-NCVYTCGS---NSYCNTECKD-GAESG-YCQWLKGYGNACWCIK-LP-DKVPIRIP--GK-CR
5.	Bot II	GRDAYIAQPE-NCVYECAK---NSYCN DLCTKN-GAKSG-YCQWLGRWGNACYC-IDLP-DKVPIRIEGK---CHF
	Bot I	GRDAYIAQPE-NCVYECAQ---NSYCN DLCTKD-GATSG-YCQXLGKYGNACWC-KDLP-DNVPIRIPGK---CHF

TABLA VI Secuencias completas de aminoácidos de las toxinas de alacrán (Cont...)

6.	C.n. II-11	TIINVKCTSPKNCSKPKELYGSSAGARCMNGKCKCYXN
7.	AaH IT	KKNGYAVDSS-GKAPECLL---SNYCINNQTKV-HYADKGYCCLL-----SCYCFGLNDDKKVLEISDRKSYCDTTIIN
8.	Be IT	MCMPCFTTRPDMAQQCRACCKGRGKCFGPQCLCGYD
	Amm P2	CGPCFTDPYTESKCATCCGGRGKCVGPQCLCNRI

Css II, III de Centruroides suffusus suffusus activas en mamíferos (García 1976; Zlotkin y col., 1978); CsE I, v1, v2, v3: CsE I Centruroides sculpturatus Ewing y variantes activa en pollos la primera y en insectos las últimas (Babin, 1975, 1974); T.s. III-10 Tityus serrulatus activa en mamíferos (Possani et al., 1983); AaH I, I', 1", III Androctonus australis Héctor activas en mamíferos (Rochat, et al. 1976; 1970 abc, 1972); Lqq Leirus quinquestriatus quinquestriatus (Kopeyan 1978; Rochat 1976, 1970); Amm V -- Androctonus mauretanicus mauretanicus activa en mamíferos; Bot III Buthus occitanus tunetanus activa en mamíferos (Rochat et al 1976); Bep M10 Buthus epeus activa en mamíferos (Grishin et al. 1981); Bot I, II: Buthus occitanus tunetanus activa en mamíferos (Rochat et al. 1976) AaH IT Androctonus australis Héctor activa en insectos (Zlotkin, 1971; Rochat, 1979); Be IT Buthus epeus activa en insectos; Amm p<sup>2</sup>- Androctonus mauretanicus mauretanicus activa en insectos (Rochat, 1979).

conocidas de alacranes norteamericanos y norteafricanos, alineadas en base a la posición de los residuos de cisteína e introduciendo espacios para hacer máxima la homología.

La estructura primaria de esta toxina III-10 del alacrán sudamericano parece corresponder a un grupo intermedio entre los correspondientes a toxinas de alacranes norteamericanos y norteafricanos. También se observa en general la importancia de la posición de las cisteínas, básicas para la estructuración terciaria del polipéptido al formar puentes disulfuro. También se observa que las secuencias N-terminales varían menos que las C terminales para toxinas de un mismo grupo estructural (Dent, 1982).

#### 4. Síntesis del péptido N terminal

En base a tres serie de datos de la literatura se decidió sintetizar el pentadecapéptido N-terminal para determinar sus propiedades tóxicas e inmunogénicas, a saber:

a) Datos de la estructura tridimensional de la toxina v-3 del alacrán C. sulpturatus obtenidos por difracción de rayos X, que sugieren que la porción de la molécula en cuestión, puede estar involucrada en el sitio activo. (Fontecilla-Camps, et al., 1982).

b) Datos de las secuencias de toxinas de alacrán conocidas que indican que la porción N-terminal es una de las zonas que mejor están conservadas, en especial, en alacranes americanos. (Rochat, et al., 1979; Dent, 1982).

c) El hexapéptido N terminal de la toxina parece estar involucrado en la toxicidad de la toxina (Possani et al., 1983).

El análisis de aminoácidos tanto del péptido separado como unido a la resina que sirve como fase sólida, reveló una -- composición de aminoácidos que corresponde a la esperada teóricamente, tal como se observa en la fig. 11 y en la tabla VI .

El perfil del péptido obtenido por C.L.A.P. (fig. 12) a - 235 nm muestra preliminarmente que se encuentra puro al menos en un 85% en el sistema utilizado.

Finalmente al probarse la toxicidad del péptido se observa que no tiene ningún efecto, ya sea porque no corresponde en realidad al sitio activo o más probablemente porque no adquiere la conformación requerida inculado como tal en solución, - por lo cual el siguiente paso sería probar su toxicidad acoplado a un acarreador adecuado.

El proceso de ruptura con HF del péptido en relación a la fase sólida se hizo dividiendo el material en dos porciones. - El rendimiento de la reacción de ruptura determinado por análisis de aminoácidos para la primera fue de 59.8%. Al aumentar de 45 a 60 min el tiempo de reacción a 0 °C se logró subir el rendimiento al 75% aunque parece haber mayor destrucción de se rina o su transformación en treonina.

##### 5. Propiedades inmunológicas del péptido sintético.

Si bien el pentadecapéptido no parece ser tóxico, un polímero del mismo obtenido por reacción con glutaraldehído, al -- ser inyectado en ratones después de seguir el esquema de inmunización descrito en métodos, fue capaz de inducir la producción de anticuerpos capaces de reaccionar con la toxina II-11-(III-10) tal como se observa en la fig. 13 en la correspondiente inmunodifusión.

Este experimento demuestra que el extremo N-terminal constituye en primer término un determinante antigénico expuesto - y capaz de ser reconocido por los respectivos anticuerpos. Faltarían hacer experimentos para determinar si este determinante es compartido por otras toxinas de la misma fracción de Sephadex G-50 o del veneno total, cosa que aparentemente no ocurre en las condiciones de este experimento, que no muestra bandas de inmunoprecipitación correspondientes (esto sin embargo puede ser un efecto simple de exceso de antígeno).

En segundo término se observa que el polímero obtenido -- con el péptido sintético posee propiedades inmunogénicas que -- podrían aprovecharse, al menos en parte, para el diseño de una futura vacuna contra el veneno de alacrán. Faltaría demostrar la capacidad de reacción cruzada de estos anticuerpos con los demás componentes tóxicos del veneno para lograr una neutralización efectiva del mismo.

## V. PERSPECTIVAS FUTURAS

Entre las perspectivas futuras que se abren con la terminación de este proyecto, y muchas de las cuales están en proceso efectivo de realización por nuestro grupo y por otros grupos tenemos:

a) Registro exacto del número y naturaleza de las neurotoxinas presentes en el veneno de T. serrulatus.

Así por ejemplo se han caracterizado parcialmente otros componentes menores de T. serrulatus (Possani et. al., 1983).

b) Análisis comparativo del grado de homología en la secuencia de las toxinas aisladas de este veneno, entre sí, y en relación a toxinas de otros venenos, con su correspondiente asignación a los grupos estructurales de toxinas conocidas y la posibilidad de encontrar nuevos tipos (Possani et. al., 1977; Rochat, et al 1970; Rochat, et. al., 1979).

c) Correlaciones filogenéticas posibles (en base a la secuencia de aminoácidos de las toxinas) de este alacrán sudamericano con especies del Norte de Africa y del Norte de América (incluyendo México) (Possani et. al., 1983).

d) Estudios fisiológicos con las toxinas individuales en preparaciones de tejido nervioso (axones, sinaptosomas, placas neuro-musculares, etc.), y en relación sobre todo con la interacción de aquéllas con canales iónicos de sodio y potasio. -- (Barhanin, et. a., 1982; Possani et. a., 1982 ; Couraud et. al. 1982).

e) Conociendo la secuencia de aminoácidos es también posi

ble pensar en la caracterización de las estructuras secundaria, terciaria y en general de la estructura tridimensional de estos polipéptidos con técnicas como dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear, difracción por rayos X etc. (Possani, et. al., 1981; Fontecilla-Camps, et. al., 1982; Wuthrich, 1976) y consecuentemente estudios sobre relación estructura-función.

f) Aislamiento y caracterización bioquímicos de las moléculas receptoras (canales) (Catterall, et. al, 1982; Hartshorne, et. al., 1982; Barhanin, et. al., 1982).

g) Caracterización de secuencias de aminoácidos que funcionen como determinantes antigénicos y la posible preparación de una vacuna sintética en contra del veneno del alacrán.

## VI CONCLUSIONES

El estudio comparativo, mediante las técnicas descritas - en esta tesis, de varios lotes de veneno del alacrán Tityus serrulatus provenientes de distintas localidades brasileñas, a saber: Corrego Novo (M.G.), Santa Bárbara (M.G.), Cataguases - (M.G.) y Aparecida del Norte (S.P.), nos permite concluir que estos lotes no difieren entre sí desde un punto de vista cualitativo y que por lo tanto el lote de veneno normalmente usado - (Santa Bárbara, M.G.) constituye una muestra representativa.

De la caracterización parcial de cuatro de los componentes tóxicos purificados del veneno de T. serrulatus, a saber: II-11 (✓), III-8, III-10 y IV-5, se desprende que estas toxinas son moléculas polipeptídicas cortas de naturaleza básica, constituidas por unos 60 aminoácidos, correspondiendo las toxinas II-11 y III-10 a una misma molécula en base a su análisis de aminoácidos.

La secuencia C terminal de la toxina III-10 (II-11) es definitivamente: --Tre-Asn-Lis-Cis. Con ésto la estructura primaria de esta toxina queda completa (Possani, L.D., et. al., - 1981c, 1983 en rev.).

El pentadecapéptido N-terminal de esta misma toxina, sintetizado por el método en fase sólida de Merrifield, aunque no es tóxico en ratones al ser aplicado como tal (sin acarreador), parece conformar un determinante antigénico importante, con -- propiedades inmunogénicas cuando se aplica en forma de polímero.

## VII. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Sylvia Lucas del Instituto Butantan (Brasil) su generosa donación de los lotes de veneno de I. serrulatus empleados para su estudio comparativo.

Agradezco también a los Q.F.B. Ricardo Molinar, Salvador-Sánchez y Georgina Gurrola por su colaboración en los experimentos de síntesis de péptidos en fase sólida, análisis por -- C.L.A.P. del pentadecapéptido sintético y en los experimentos de inmunización y obtención del suero anti-péptido sintético, respectivamente.

Se agradece al Dr. Brian M. Martin del National Institute of Health, Bethesda, Md., U.S.A., por su colaboración en la de terminación de la secuencia del péptido C terminal de la toxina III-10 del veneno de I. serrulatus.

Finalmente agradezco de manera especial al Dr. Lourival - D. Possani por el apoyo y estímulo prestados para la realización de esta tesis.

Parte de esta tesis, concretamente la referente a análisis de aminoácidos y a secuenciación de aminoácidos se realizó en la Unidad de Análisis de Aminoácidos y Estructura de Proteínas en el Instituto de Investigación Biomédicas.

Parte de los datos presentados aquí fueron expuestos durante el VII Congreso Internacional de Biofísica y III Congreso Panamericano de Bioquímica (México, 1981).

La elaboración final de esta tesis se realizó gracias a la beca otorgada por el Comité Técnico de Becas del Programa de Superación del Personal Académico (U.N.A.M.).

VIII B I B L I O G R A F I A

1. Albuquerque, E., Daly, J., Witkop, B. (1971). Science, - -  
172: 995.
2. Alagón, A., Possani, L.D., Erickson, B.W. (1978). Isola-  
tion and characterization of several proteinas from - - -  
Tityus serrulatus scorpion venom. Proc. 5th Inter. Symp.-  
on Animal, Plant and Microbial toxins. San José, Costa Ri  
ca. Pergamon Press, New York. pp. 609-618.
3. Ambler, R.P., (1972) Methods Enzymol. 25: 143-154, 262- -  
272.
4. Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M., and Mlejnek, R.V. --  
(1974). Amino acid sequences of neurotoxic protein va -  
riants from the venom of Centruroides sculturatus Ewing.-  
Arch. Biochem. Biophys. 164: 694-706
5. Babin, D.R., Watt, D.D. Goos, S.M. and Mlejnek, R. V. - -  
(1975). Amino acid sequence of neurotoxin I from Centru--  
roides sculpturatus Ewing. Arch. Biochem. Biophys. 166: -  
125-134.
6. Balozet, L (1971). Scorpionism in the old world. In Veno-  
mous Animals and their Venoms, Vol III, W. Bucherl y E.E.  
Buckley (Eds). Academic Press, New York, pp. 349-371.
7. Barhanin, J., Giglio, J.R., Leopold, R., Schmid, A., Sam-  
paio, S.V. y Lazdunski, M. (1982). Tityus serrulatus ve--  
nom contains 2 classes of toxins Tityus gamma-toxin is a  
new tool with a very high-affinity for studying the Na<sup>+</sup> -

- channel. J. Biol. Chem. 257: 2553-2558.
8. Bergman, C., Dubois, J.M., Rojas, E. y Rathmayer, W. - - (1976): Biochim. Biophys. Acta, 455: 173-184.
  9. Bucherl, W. (1971). Classification, biology, and venom extraction of scorpions. In Venomous Animals and their Venoms, Vol. III, W. Bucherl and E.E. Buckley (Eds). Academic Press, New York, pp. 317-347.
  10. Cahalan, M.D. (1975). Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by Centruroides - - sculpturatus venom. J. Physiol (Lond.) 244: 511-534.
  11. Cárbaz, A.T. and Possani, L.D. (1982). Electron microscopic evidence for scorpion toxin binding to synapses of rat brain cortex. Neuroscience Lett. 32: 103-108.
  12. Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. y - Maelicke, A. (1982). Selective blockage of voltage-dependent  $K^+$  channels by a novel scorpion toxin. Nature 296: - 90-91.
  13. Carbone, E., Prestipino, G. Wanke, E. Possani, L.D. and - Maelicke, A. (1983). Selective action of scorpion neurotoxins on the ionic currents of the squid giant axon. Toxicon, en prensa.
  14. Catterall, W. (1976). Purification of a toxic protein - - from scorpion venom which activates the action potential- $Na^+$  ionophore. J. Biol. Chem. 251: 5528-5536.
  15. Catterall, W.A. (1977). J. Biol. Chem., 252 (23): 8669- - 8676.

16. Catterall, W.A. (1977). J. Biol. Chem., 252 (23): 8660- - 8668.
17. Catterall, W., Hartshorne, R.P. y Beneski, D.A. (1982). - Molecular properties of neurotoxin receptor sites associa- - ted with sodium channels from mammalian brain. Toxicon, - 20 (1): 27-40.
18. Ceccarelli, B. y Clementi, F. (Eds.) (1979). Neurotoxins: Tools in Neurobiology, Adv. Cytopharmacol. Vol. III, Ra-- ven Press, New York.
19. Celeste Henriques, M., Gazzinelli, G., Diniz, C.R., Gó- - mez, M.V. (1968). Effect of the venom of the scorpion - - Tityus serrulatus on adrenal gland catecholamines. Toxi-- con 5: 175-179.
20. Chicheportiche, R., y Lazdunski, M. (1970). The conforma-- tion of small proteins. The state-diagram of a neurotoxin of Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 14: - - 549-555.
21. Corrado, A.P. Riccioppo Neto, F. y Antonio, A. (1974). -- The mechanism of the hypertensive effect of Brazilian - - scorpion venom (Tityus serrulatus Lutz and Mello). Toxi-- con 12: 145-150.
22. Conti, F., Hille, B., Neumcke, W., Nonner, W., y Stampfli, R. (1976). J. Physiol., 262: 729-742.
23. Couraud, F., Rochat, H., y Lissitzky, S. (1980). Binding- of scorpion neurotoxins to chick embryonic heart cells in culture and relationship to calcium uptake and membrane - potential. Biochem. 19: 457-462.

24. Couraud, R., Jover, E., Dubois, J.M. y Rochat, H. (1982). Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. Toxicon, 20 (1): 9-16.
25. Cunha-Melo, J.R., Freire-Maia, L., Tafura, W.L., Maria, T.A. (1973). Mechanism of action of purified scorpion toxin on the isolated rat intestine. Toxicon 11: 81-84
26. Darbon, H. Rochat, H., Kopeyan, C. y Tietschoten, J.V. (1982). Covalent structure of the insect toxin of Androctonus australis Hector. Toxicon, 20: 64.
27. Delori, P., Van Rietschoten, J., y Rochat, H. (1981). Scorpion venoms and neurotoxins: An immunological study. Toxicon, 19: 393-407.
28. Del Pozo, E. C. y Anguiano, L.G. (1947). Acciones del veneno de alacrán sobre la actividad motora de músculo estriado. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (México), 8: 231-263.
29. Dent, M.A.R. (1982). Aislamiento y caracterización química de diversas toxinas del veneno del alacrán Centruroides noxius Hoffmann. Tesis para Maestría en Ciencias presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México. -- Fac. de Ciencias Químicas, Bioquímica, México.
30. Dickerson, R.E. y Geis, I. (1969). The Structure and Action of Proteins. Harper and Row, New York.
31. Drapeau, G.R., Boily, Y. y Houmard, J. (1972). J. Biol. Chem., 247: 6720-6726.

32. Drapeau, G.R. (1977). Methods Enzymol. Cleavage at Glutamic Acid with Staphylococcal Protease. 147: 189-191.
33. Erickson, B.W. (1978). Sequence homology of snake, scorpion and bee toxins. In Toxins: Animal, Plant and Microbial, P. Rosenberg (Ed.). Pergamon Press, Oxford. pp. - - 1071-1086.
34. Erickson, B.W. y R.B. Merrifield. (1976). Solid Phase Synthesis. In The Proteins. Vol. II 3rd Ed. Academic Press, Inc., New York, pp. 255.
35. Erickson, B.W., Sekulski, J.M. y Sellers, P.H. (1982). Recognition of patterns in protein sequences by metric analysis. In Methods in Protein Sequence Analysis, M. Elzinger (Ed.). Humana Press, Clifton, N.J. pp. 553-554.
36. Erickson, B.W. y Sellers, P.H. (1983). Recognition of pattern in genetic sequences, In Time Warps, String Edits, and Macromolecules, D. Sankoff y J.D. Kruskal (Eds.). Addison-Wesley, Reading, Mass, en prensa.
37. Fletcher, P.L., Jr., Fletcher, M.D. y Possani, L.D. - - (1978). Abstr., Annu. Meet. Am. Pancreatic Assoc., Chicago.
38. Flores, R. (1963). Observaciones sobre la sintomatología y tratamiento de la intoxicación por picadura de alacrán. Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. 23 (3-4): 175-178.
39. Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Suddath, F.L., - - Watt, D. y Bugg, C.E. (1980). Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6496-6500.

40. Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Ealick, S.E., Suddath, F.L., Watt, D.D., Beldmann, R.J. y Bugg, C.E. (1981). Architecture of scorpion neurotoxins a class of membrane-binding proteins. TIBS, nov.: 291-296.
41. Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J. Suddath, F.L. y Bugg, C.E. (1982). The three dimensional structure of scorpion Centruroides sculpturatus neurotoxins. Toxicon 20: 1-8.
42. Freire-Maia, L., Pinto, G.I. y Franco, I. (1974): Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 188: 207-213.
43. Freire-Maia, L., Cunha-Melo, J.R., Gómez, M.V., Tafuri, W.L., Maria, T.A., Calixto, S.L., Futuro-Neto, H.A. (1976) Studies on the mechanism of action of Tityustoxin. In: Animal, Plant and Microbial toxins. Ed. A. Ohsaka, K. Hayashi y Y. Sawai. Plenum Press, New York, Vol. 2. pp. 273-285.
44. Gillespie, J.I. y Meves, H.J. (1980). The effect of scorpion venoms on the sodium currents of the squid giant axon. J. Physiol. (Lond) 308: 479-499.
45. Gisin, B.F. (1973). Helv. Chim. Acta., 56: 1476.
46. Gómez, M.D., Dai, M.E.M. y Diniz, C.R. (1973). Effect of scorpion venom, Tityustoxin, on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. J. Neurochem. 20: 1051-1061.

47. Gómez, M.V., Diniz, C.R. y Barbosa, T.S. (1975). J. Neurochem., 24: 331-336.
48. Gómez, MV. y Diniz, C.R. (1966). Separation of toxic components from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus venom. Mem. Inst. Butantan 33: 899-902.
49. Goyffon, M. y Kåvøer, J. (1978). Chactoid venoms. In Arthropod Venoms Handb. Exp. Pharm., Vol. 48 Springer-Verlag, Berlin, pp. 395-418.
50. Grishin, E.V., Soldatov, N.M., Soldatova, L.N. y Ovchinnikov, Yu.A. (1978). Isolation and characterization of - - toxins from the venom of Middle-Asian scorpion Buthus - - eupeus. Toxicon, 5: 419.
51. Grishin, E.V., Soldatov. N.M., Soldatova, L.N. y Ovchinnikov, Yu.A. (1979). Studies of the toxins from Buthus - - eupeus scorpion venom. Toxicon 17 (Supl. 1): 60
52. Grishin, E.V., Soldatova, L.N., Soldatov, N.M., Kostetskii P.V. y Ovchinnikov, Yu.A. (1980). Amino acid sequence of insect toxin 1-2 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus. Sov. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.-Bioorg. Khim.) 5 (9): 949-956.
53. Grishin, E.V., Volkova, T.M. y Soldatova, L.N. (1982). -- Toxic components from the venom of caucasus USSR subspecies of scorpion Buthus eupeus. Bioorg. Khim. 8: 155-164.
54. Habersetzer-Rochat, C. y Sampieri, F. (1976). Structure--function relationships of scorpion neurotoxins. Biochem.-15: 2254-2261.

55. Hagag, M., Tu, A.T. y el-Asmar, F. (1983). Isolation of -minax toxins from the venom of the scorpion Buthus minax and their metabolic effects. Arch. Biochem. Biophys. 220: 459-466.
56. Hartshorne, R.P., Messner, D.J., Coppersmith, J.C. y Catterall, W. (1982). The saxitoxin receptor of the sodium-channel from rat brain. J. of Biol Chem., 257 (23): 13888-13891.
57. Hayashi, R.; Moore, S. y W.H. Stein. (1973). J. Biol. Chem., 248: 2296-2302.
58. Hayashi, R. (1977). Methods Enzymol. 47: 84093.
59. Herzog, W.H., Feibel, R.M. y Bruant, S.H. (1964): J. Gen. Physiol. 47: 719-733.
60. Hille, B. (1968): J. Gen. Physiol., 51: 199-219.
61. Hoffmann, C.C. (1938). Nuevas consideraciones acerca de los alacranes mexicanos. An. Inst. Biol. 9 (1,2): 318-337
62. Hunkapiller, M.W. y L.E. Hood (1978) Biochem. 17: 2124-2133
63. Ivanov, O. Ch. (1981). The evolutionary origin of toxic -proteins, Toxicon, 19: 171-178.
64. Ivanov, O. Ch. (1978). Application of the "Profiles of relationship" method to distantly related proteins. J. Molec. Evolution, 12: 1
65. Jaques, R. (1956) The hyaluronidase content of animal venoms. In: Venoms, Amer. Ass. Adv. Sci. 291.

66. Jover, E., Couraud, F. y Rochat, H. (1980a). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to -- two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. -- Biochem. Biophys. Res. Commun. 95: 1607-1614.
67. Jover, E., Martin-Moutot, N. Couraud, F. y Rochat, H. - - (1980b). Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions and - other neurotoxins. Biochem. 19: 463-467.
68. Kopeyan, C., Martínez, G., Lissitzky, S., Miranda, F. y - Rochat, H. (1974). Disulfide bonds of toxin II of the - - scorpion Androctonus Australis Hector. Eur. J. Biochem. - 47: 483-489.
69. Kopeyan, C., Martínez, G. y Rochat, H. (1978). Amino - - acid sequence of neurotoxin V from the scorpion Leiurus - quinquestriatus quinquestriatus. FEBS. Lett. 89: 54-58.
70. Kopeyan, C., Martínez, G. y Rochat, H. (1979). Amino acid sequence of neurotoxin III of the scorpion Androctonus - - australis Hector. Eur. J. Biochem. 94: 609-615.
71. Kopeyan, C., Martínez, G. y Rochat, H. (1982). Primary -- structure of toxin IV of Leirus quinquestriatus quinques- triatus and characterization of a new group of scorpion - neurotoxins. Toxicon, 20: 71.
72. Koppenhofer, E. y Schmidt, H. (1968a) Die Wirkung von - - Skorpiengift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnu-- rrrings I. Die Perme bilitäten PNa und PK. Plügers Arch.- Ges. Physiol., 303: 133-149.
73. Koppenhofer, E. and Schmidt, H. (1968b). Incomplete so - -

- dium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. Experientia (Basel) 24: 41-42.
74. Lazarovici, P., y Zlotkin, E. (1982), A mammal toxin derived from the venom of a chactoid scorpion. Comp. Biochem-Physiol. C. 71: 177-181.
  75. Lazarovici, P. Yanai, P. y Zlotikin, E. (1982a). Insect - toxin components from the venom of a chactoid scorpion. - Toxicon 20: 333-334.
  76. Lazarovici, P., Yanai, P., Pelhalte, M., Y Zlotkin, E. - (1982b). Insect toxic components from the venom of a - - chactoid scorpion Scorpio maurus palmatus (Scorpionidae). J. Biol. Chem. 257: 8397-8404.
  77. Lazdunski, M. et. al. (1980)., Ann. N. Y. Acad. Sci., 358: 169-182.
  78. Linden, C.D. y Raftery, M.A. (1976). Isolation of a scorpion toxin for use as a probe of the electrically excitable sodium channel. Biochem. Biophys. Res. Commun., 72: - 646-653.
  79. Lissitzky, S., Miranda, F. Etzensperger, P., Mercier, J.- (1956). Sur la toxicité du venin de deux especes de scorpion nord africains. C.R. Soc. Biol. (Paris). 150: 741-743.
  80. Lima, E.G. y Freire Maia, L. (1977) Toxicon 15, 225-234.
  81. Lund, A.E. y T. Narahashi (1980). 10th Ann. Mtg. Soc. Neurosci. Abstr. p. 301.
  82. Macedo, T.M. y Gómez, M.V. (1982). Effects of tityustoxin

- (TsTx) from scorpion venom on the release and synthesis - of acetylcholine in brain slices. Toxicon 20 (3): 601-606.
83. Master, R.W.S., Rao, S. y Soman, P.D. (1963). Electrophoretic separation of biologically active constituents of - scorpion venom. Biochim. Biophys. Acta 71: 422-428.
84. Masutani, T., Seyama, I. Narahashi, T. y J. Iwasa. (1981) J. Pharmacol. Exp. Ther., in press.
85. Mazzoti, L. y Bravo-Becherell, M.A. (1963). Scorpionism - in the Mexican Republic. In Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Area. Pergamon - - Press, London, pp. 119-131.
86. McInstosh, M.E. y Watt, D.D. (1972) Purification of toxins from the north American scorpion *Centruroides sculpturatus*. In Toxins of animal and Plant Origin, A. de Vries - and E. Kochva, (Eds), Vol. 2. Gordon and Breach, New York pp. 529-544.
87. Merrifield, R.B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85: 2149.
88. Miranda, F., Rochat, H., Lissitzky, S. (1960). Sur la neurotoxine du venin de scorpion. I-Purification a partir du venin de deux especes de scorpions nord-africains. Bull.-Soc. Chim. Biol. (Paris) 42: 379-391.
89. Miranda, F., Rochat, H., Lissitzky, S. (1961). Sur la - - neurotoxine du venin des scorpions. II-Utilization de - - l'electrophorese sur papier pour l'orientation et le controle de la purification. Biochimie. 43: 945-952.
90. Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, C. y Lissitzky, S. (1970).

- Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the -- scorpions Androctonus australis Hector, Buthus occitanus-tunetanus and Leiurus quinquestriatus quinquestriatus. Eur J. Biochem. 16: 514-523.
91. Mitchell, A.R., Erickson, B.W., Ryabtsev, M.N., Hodges, - R.S. y Merrifield, R.B. J. Am. Chem. Soc. 98, 7357 (1976)
92. Mitchell, A.R., Kent, S.B.H., Erickson, B.W., Merrifield, R.B., Tetrahedron Lett. p. 3795 (1976).
93. Mohamed, A.H., Kamel, A., Ayobe, M.H. (1969)a Studies of-phospholipase A and B activities of egyptian snake venoms and scorpion toxin. Toxicon 6: 293-298.
94. Mohamed, A.H., Kamel, A., Ayobe, M.H. (1969b) Some enzymatic activities of egyptian snake venoms and a scorpion -- venom. Toxicon, 7: 185-188.
95. Moss, J., Thoa, N.B. y Kopin, I.J. (1974). On the mechanism of scorpion toxin-induced release of norepinephrine-from peripheral adrenergic neurons. J. Pharmacol Exp. - - Ther. 190: 39-48.
96. Narahashi, T., Moore, J.W., Scott, W.R. (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster -- giant axons. J. Gen. Physiol. 47: 965-974.
97. Narahashi, T., Shapiro, B.I. Deguchi, T., Scuka, M. y - - Wang, C.M. (1972). Am. J. Physiol., 222: 850-857.
98. Narahashi, T., Moore, J.W. y Shapiro, B.I. (1969). Science, 163: 680-681.

99. Narahashi, T. (1974). Physiol. Rev., 54: 813-839.
100. Okamoto, H., Takahashi, K. y Yamashita, N. (1977): Nature 266: 465-468.
101. Okamoto, H. (1980). Binding of scorpion toxin to sodium - channels in vitro and its modification by beta-bungarotoxin. J. Physiol, 299:
102. Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, Jr. P.L. y Erickson B.W. (1977). Purification and properties of mammalian - - toxins from the venom of the brazilian scorpion Tityus - - serrulatus Lutz and Mello. Arch. Biochem. Biophys. 180: 394-403.
103. Possani, L.D., Ramirez, G.A., Fletcher, Jr. P.L. y Gurrola, M.A.H. (1978). Isolation of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides elegans - - (Thorell). FEBS Lett. 91: 261-264.
104. Possani, L.D., Fletcher, Jr. P.L., Alagón, A.B.C., Alagón, A.C. y Juliá, J.Z. (1980). Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, Centruroides limpidus tecomanus Hoffman. Toxicon - 18: 175-183.
105. Possani, L.D., Dent, M.A.R., Martin, B.M., Maelicke, A. y Svendsen, I. (1981a). The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 46: 207-214.
106. Possani, L.D., Fernández de Castro, J. y Juliá, J.Z. - - (1981b). Detoxification with glutaraldehyde of purified - scorpion (Centruroides noxius Hoffmann) venom. Toxicon 19:

107. Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J. y Svendsen, I. (1981c). Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Carlsberg Res. Commun. 46: 195-205.
108. Possani, L.D., Steinmetz, W.E., Dent, M.A.R., Alagón, A.-C. y Wutrich, K. (1981d). Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. Biochim. Biophys. Acta 669: 183-192.
109. Possani, L.D., Martin, B.M. y Svendsen, I. (1982). The primary structure of Noxiustoxin: A  $K^+$  channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffman. Carlsberg Res. Commun 47: 285-289.
110. Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I. Rode, G.S. y Erickson, B.W. (1983). Toxins from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello: primary structure and sequence comparison by metric analysis. Biochem J. (en rev).
111. Ramirez, G.A., Fletcher, JR., P.L., Rode, G.S. y Possani-L.D. (1981). N-terminal sequence of toxin II.6.3. from the venom of the scorpion Centruroides elegans. Presentado durante el VII Congreso Internacional de Biofísica y III-Congreso Pan-Americano de Bioquímica. México. p. 157.
112. Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. y Williams, D.E. (1962), Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195: 281-283.
113. Ritchie, J.M. y R.B. Rogart. (1977). Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 79: 1-51

114. Rochat, C., Rochat, H., Miranda, F. y Lissitzky, S. (1967) Purification and some properties of the neurotoxins of androctonus australis Hector. Biochemistry 6: 578-585.
115. Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S. y Edman p. (1970). The amino acid sequence of neurotoxin I of An--droctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 17: 262-266.
116. Rochat, R., Rochat, C., Sampieri, F., Miranda, F. y Lissit zky, S. (1972). The amino acid sequence of neurotoxin II of Androctonus australis Hector. Eur. J. Biochem. 28: 381-388
117. Rochat, J. (1978). Scorpion Toxins: Chemistry and mode of action. Presentado durante el 3er. Simposio Internacional de Citofarmacología, julio, Venecia, Italia.
118. Rochat, J., Bernard, P. y Couraud, F. (1979). Scorpion --toxins: chemistry and mode of action, In Advances in Cytopharmacology, Vol. 3. B. Ceccarelli y F. Clementi (Eds.) - Raven Press, New York, pp. 325-334.
119. Romey, G., Chicheportiche, R., Lazdunski, M., Rochat, H.,- Miranda, F. y Lissitzky, S. (1975). Scorpion neurotoxin- a presynaptic toxin which affects both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels - in axons. B)ochem Biophys. Res. Commun. 64: 115-121.
120. Romey, G., Abita, H.P., Chicheportiche, R., Rochat, H. y - Lazdunski, M. (1976). Scorpion neurotoxin: mode of action- on neuromuscular junctions and synaptosomes, Biochim. - - Biophys. Acta. 448: 607-619.
121. Rosso, J.P. y Rochat, H. (1982). Characterization from the venom of Androctonus mauretanicus mauretanicus. of ten pro teins including six neurotoxins. Toxicon 20: 76-77.

122. Sakakibara, S., y Shimonishi, Y., (1965). Bull. Chem. Soc. Jpn., 38: 1412.
123. Sakakibara, S., Shimonishi, Y., Kishida, Y., Okada, M. y - Sugihara, H. (1967). Bull. Soc. Jpn, 40: 2164.
124. Selvarajan, V.R., Narayana Reddy, K. Swami, K.S. (1975). - Scorpion venom effects on succinate dehydrogenase activity of sheep tissues. Toxicon 13: 143-144.
125. Shulov, A., Levy, G. (1978). Venoms of Buthinae. In: Arthropod Venoms Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 48. Sergio Bettini Ed. Srpinger-Verlag, New York. pp. 309-317.
126. Straub, R. (1956). Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 14:1-28
127. Suddath, F.L., Bugg, C.E., Ealick, S.A., Almassy, R.J. y - Fontecilla-Camps, J.C. (1982). The 1.3 Angstrom structure of a scorpion Centruroides sculpturatus neurotoxin, a membrane binding protein. Biophys. J. 37: 185-186.
128. Tarr, G. Beecher, J.M., Bell, M. y Mackean, D.J. (1978). - Anal. Biochem. 84: 622-627.
129. Toledo, D. y Neves, A.G. (1976). Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion Tityus serrulatus. Comp. Biochem Physiol. 55B: 249-253.
130. Tu, A.T. (1977). Scorpion venoms. In venoms: Chemistry and Molecular Biology, A.T. Tu (Ed.). John Willey and Sons, -- New York, pp. 459-483.
131. Ulbricht, W. (1969): Ergeb. Physiol., 61: 18-71.

132. Watt, D.D. (1964). Biochemical studies of the venom from the scorpion Centruroides Sculpturatus. Toxicon. 2: 171-180.
133. Watt, D.D., Simard, J.M., Babin, D.R. y Mlejnek, R.V. (1978). Physiological characterization of toxins isolated from scorpion venom. In Toxins: Animal, Plant and Microbial, P. Rosenberg (Ed.) Pergamon Press, Oxford, pp. 647-660.
134. Watters, J.J., Possani, L.D., Mochca-Morales, J., Hess, B. (1981). Determination of alfa-helix and beta-sheet structure in toxins purified from the venoms of Latin American scorpions. 4th Sur. Symposium on animal, Plant and Microbial Toxins, Marseille, Francia. Toxicon 20 (1); 81.
135. Watters, J.J., Possani, L.D., Mochca-Morales, J y Hess, B. (1982). Determination of alfa-helix and beta-sheet structure in toxins purified from the venoms of Latin American scorpions. Toxicon 20: 81.
136. Wutrich, K. (1976). NMR in Biological Research: Peptides and proteins. Elsevier/ North Holland, Amsterdam.
137. Zhdanova, L.N., Adamovich, T.B., Nazimov, I.V., Grishin, E.V., Ovchinnikov, Yu. A. (1978). Amino-acid sequence of insect-toxin I-1 from the venom of the Central Asian scorpion Buthus eupeus. Sov. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl. Bioorg. Khim) 3 (4): 366-372.
138. Zlotkin, E. (1973). Chemistry of Animal venoms. Experientia 29: 1453-1588.
139. Zlotkin, E., Rochat, H. Kopeyan, C., Miranda, F. y Lissitzky, S (1971). Purification and properties of the insect --

toxin from the venom of the scorpion Androctonus Australis Hector. Biochimie 53: 1073-1078.

140. Zlotkin, E., Martínez, G., Rochat, H. y Miranda, F. (1975) A protein toxic to crustacea from the venom of the scorpion Androctonus australis. Insect. Biochem. 5: 243-250.
141. Zlotkin, E., Martínez, G., Rochat, H., Miranda, F. (1976) A protein from scorpion venom toxic to crustaceans. In: -- Animal, Plant and Microbial Toxins. Eds. A. Ohsaka, K. Hayashi y U Sawai. Plenum Press, N.Y. pp. 73-80.
142. Zlotkin, E., Miranda, F. Y Rochat, H. (1978). Chemistry -- and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 48. S. Bettini (Ed.), - Springer Verlag, Berlin, pp. 317-369.
143. Zlotkin, E., Lester, D. Lazarovici, P. y Pelhalte, M. - - (1982). The chemistry and axonal action of two insect toxins derived from the venom of the scorpion Buthotus judaicus. Toxicon. 20: 323-331.