

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IMPLEMENTACION DE UN METODO GENERAL PARA LA  
CARACTERIZACION DE GENES QUE CODIFICAN  
PARA TOXINAS DEL VENENO DEL ALACRAN  
CENTRUROIDES NOXIUS HOFFMANN

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

## B I O L O G O

PRESENTA

MIGUEL CORONA VILLEGAS



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección .....

Expediente .....

Número .....

C. MIGUEL CORONA VILLEGAS  
P R E S E N T E . -

Por este conducto nos permitimos informar a usted, que se autoriza el cambio de tema de tesis Titulada "Implementación de un Método General para la caracterización de genes que codifican para toxinas del alacran Centruroides Noxius Hoffman" en sustitución de "CARACTERIZACION DE LA REGION GENOMICA QUE CODIFICA PARA LA TOXINA II 9.2.2 DEL ALACRAN Centuroide-Noxius".

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al Dr. Baltazar Becerril Luján.

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
"AÑO DEL BICENTENARIO"  
EL DIRECTOR



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

*[Firma manuscrita]*  
M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE.

EL SECRETARIO

*[Firma manuscrita]*

M. EN C. MARTÍN P. TENA MEZA.

c.c.p.- El Dr. Baltazar Becerril Luján.- Director de Tesis.- Pte.

c.c.p.- El expediente del alumno.

CBZ/MTM/vsg.

Al contestar este oficio ctesee fecha y número



CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CEINGEBI / UNAM, APDO. POSTAL 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62271, MEXICO

FAX: (52) (73) 172388

CUERNAVACA, MORELOS, 10 DE ABRIL DE 1999.



COMISION EVALUADORA DE TESIS DE  
LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presente:

Estimados miembros de la Comisión:

Por medio de la presente doy mi aprobación para que Miguel Corona Vilegas, quien realizó su tesis de licenciatura bajo mi dirección en el Instituto de Biotecnología UNAM, presente al documento de su tesis con el tema "Implementación de un método general para la caracterización de genes que codifican para toxinas del veneno del alacran Lepidurus mexicanus Forman" para su revisión a sus sinodales en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Guadalajara.

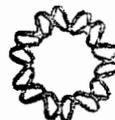
sin otro particular, quedo de Ustedes.

Atentamente

Dr. SALAZAR BELTRÁN LUJÁN.



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



COMISION EVALUADORA DE TESIS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.

Cuernavaca Mor., 17 de Marzo 1992

PRESENTE:

Estimados miembros de la comisión:

Por medio de este conducto, doy mi aprobación para que Miguel Corona Villegas imprima su tesis titulada "Implementación de un método general para la caracterización de genes que codifican para toxinas del veneno del alacrán Centruroides noxius Hoffmann" la cual realizó bajo mi dirección.

Sin otro particular, quedo de ustedes.

ATENTAMENTE.

DR. BALTAZAR BECERRIL LUJAN.

---

ESTA TESIS SE REALIZO BAJO LA DIRECCION  
DEL DOCTOR BALTAZAR BECERRIL LUJAN EN EL  
LABORATORIO DEL DOCTOR FRANCISCO BOLIVAR  
ZAPATA DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE  
LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

*A MIS PADRES.*

*Con gratitud, por su apoyo y confianza.*

*A PATRICIA.*

*A ti hermana, que has elegido también  
esta hermosa profesión de la Biología.*

*A JOSE GPE. VILLEGAS LOPEZ*

*A usted tío, que a lo largo de mi carrera  
siempre ha estado presente para darme la mano.*

*A MIS AMIGOS. Jesús, José y Roberto.*

*A ustedes, compañeros y hermanos en ideales  
y afanes en la vida.*

## **AGRADECIMIENTOS\***

*A la Universidad de Guadalajara, por haberme brindado el privilegio de estudiar en forma gratuita en un ambiente de libertad de pensamiento.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, ejemplo de excelencia académica, mi respeto y agradecimiento por haberme ofrecido un espacio en donde continuar mis estudios.*

*A Intercambio Academico UDG-UNAM, mi más sincero agradecimiento por haberme brindado todas las facilidades posibles para el otorgamiento de la beca que hizo posible la realización de esta tesis.*

*Al Dr. Baltazar Becerril Lujan, quién dirigió ésta tesis, un reconocimiento muy especial.*

*Al Dr. Francisco Bolivar Zapata, por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio.*

*Al Dr. Lourival D. Possani, por su apoyo e interés mostrados para la realización de esta tesis.*

*Al Dr. Enrique Merino Pérez, por su valiosa ayuda y estímulo.*

*Al Dr. Guillermo Gosset Lagarda, por su cooperación en la realización de esta tesis.*

*A mi Maestro Luis Alfredo Burgos, quien me motivó a seguir este camino.*

*A Soledad, quién me dio su consejo firme y seguro en el momento más trascendente.*

*A mis compañeras, Consuelo García, Alejandra Vazques y María Luisa Esteves, quienes hicieron mucho más agradable mi estancia en el laboratorio.*

*\* Esta tesis fue financiada en parte, por el proyecto IN202689 de DGAPA/UNAM concedida a los Doctores L.D. Possani y B. Becerril.*

'EL OBJETIVO ESENCIAL DE LA VIDA, ES LA  
EVOLUCION, LA RECUPERACION DE CONCIENCIA  
MEDIANTE LA EXPERIENCIA, SU METODO'.

## INDICE GENERAL

1.- RESUMEN.....	(1)
2.- INTRODUCCION.....	(2)
2.1.- Importancia del estudio de los alacranes.....	(3)
2.2.- Taxonomía y distribución del género <i>Centruroides</i> ....	(3)
2.2.1.- Especies de Importancia en los Estados Unidos.....	(3)
2.2.2.- Especies de importancia en México.....	(3)
2.3.- Composición del veneno de alacrán.....	(4)
2.4.- Extracción y purificación del veneno de alacrán.....	(4)
2.5.- Estructura de las toxinas de alacrán.....	(5)
2.5.1.- Estructura primaria.....	(5)
2.5.2.- Estructura secundaria y terciaria.....	(9)
2.5.3.- Relaciones estructura-función.....	(13)
2.5.3.1.- Estructura primaria: análisis y correlaciones.....	(13)
2.5.3.2.- Estructura terciaria: correlaciones funcionales....	(13)
2.5.3.3.- Modificaciones químicas: correlaciones funcionales.	(15)
2.6.- Especificidad y mecanismo de acción molecular.....	(16)
2.6.1.- Especificidad toxina-canal.....	(16)
2.6.1.1.- Estructura y especificidad.....	(16)
2.6.1.2.- Canales iónicos y mecanismos de acción molecular...	(17)
2.6.2.- Especificidad toxina-especie.....	(18)
2.7.- Genética molecular de las toxinas de alacrán.....	(19)
3.- ANTECEDENTES.....	(23)
3.1.- Parte de bioquímica.....	(23)
3.1.1.- Purificación de el veneno de <i>Centruroides</i> .....	(22)
3.1.2.- Determinación de la secuencia toxina II.9.2.2.....	(22)
3.2.- Parte de biología molecular.....	(27)
3.2.1.- Construcción del banco de ADNc de <i>C.noxius</i> .....	(26)
3.2.2.- Aislamiento de clonas positivas.....	(28)
3.2.3.- Secuenciación de clonas positivas.....	(32)
3.2.4.- Análisis de las secuencias.....	(33)
4.- OBJETIVO.....	(37)
5.- HIPOTESIS.....	(37)
6.- MATERIAL Y METODOS.....	(38)
6.1.- Extracción del ADN genómico.....	(38)
6.2.- Purificación y digestión del ADN genómico.....	(39)
6.3.- Southern ADN genómico.....	(41)
6.4.- Reacción en Cadena de la polimerasa.....	(45)
7.- RESULTADOS.....	(50)
7.1.- Extracción y purificación del ADN.....	(50)
7.2.- Digestión con enzimas de restricción.....	(53)
7.3.- Southern ADN genómico.....	(53)
7.4.- Reacción en Cadena de la polimerasa.....	(56)
8.- DISCUSION.....	(64)
9.- CONCLUSIONES.....	(68)
10.- BIBLIOGRAFIA.....	(69)

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	(7)
FIGURA 2.....	(8)
FIGURA 3.....	(11)
FIGURA 4.....	(12)
FIGURA 5.....	(22)
FIGURA 6.....	(24)
FIGURA 7A.....	(25)
FIGURA 7B.....	(26)
FIGURA 7C.....	(26)
FIGURA 8.....	(29)
FIGURA 9.....	(30)
FIGURA 10.....	(31)
FIGURA 11.....	(35)
FIGURA 12.....	(36)
FIGURA 13.....	(48)
FIGURA 14.....	(51)
FIGURA 15.....	(52)
FIGURA 16.....	(54)
FIGURA 17A.....	(55)
FIGURA 17B.....	(55)
FIGURA 18A.....	(57)
FIGURA 18B.....	(57)
FIGURA 19.....	(58)
FIGURA 20.....	(60)
FIGURA 21.....	(62)
FIGURA 22A.....	(63)
FIGURA 22B.....	(63)

## RESUMEN

Los accidentes causados por las picaduras de alacrán constituyen un problema de salud en nuestro país. Los componentes activos del veneno de alacrán son proteínas básicas y cortas llamadas toxinas, las cuales actúan específicamente sobre los canales de sodio y potasio de células excitables.

El alacrán *Centruroides noxius* originario de Nayarit, es uno de los escorpiones mas tóxicos del mundo. Actualmente, se conoce la secuencia completa de aminoácidos de varias toxinas de este alacrán, entre ellas la de la toxina II-9.2.2, una toxina bloqueadora de canales de sodio. No se ha reportado hasta la fecha la secuencia de la región genómica de ninguna toxina de alacrán.

En este trabajo se implemento una metodología general para la caracterización de las regiones genómicas que codifican para toxinas del alacrán *Centruroides noxius*. Para ello se tomó como modelo el ADN complementario de la clona Cn 121. Esta clona se aisló de un banco de ADN complementarios rastreado con una mezcla de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos de una región de la toxina II-9.2.2.

Como paso inicial, se montó una metodología para la extracción y purificación de ADN genómico de alacrán. El ADN genómico extraído y purificado de *C. noxius* mostró poder ser digerido con diferentes enzimas de restricción. Los productos de estas digestiones se hibridaron usando como sonda radioactiva el inserto de ADNc de la clona Cn 121.

Los resultados de estos experimentos mostraron que en las digestiones con la enzima *EcoRI* se genera un fragmento de alrededor de 750 pb en el cual se encuentra la totalidad o la mayor parte del gen que codifica para el ADNc de la clona Cn 121.

Como una manera de corroborar los datos obtenidos con las hibridaciones y aislar el gen de la clona Cn 121 y otros genes relacionados, se realizaron experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como templado ADN genómico. En estos experimentos se amplificó la región genómica que correspondería a la secuencia codificable del ADNc de la clona Cn 121 (332 pb) así como las regiones estructurales de otros genes relacionados (de alrededor de 270 pb). Estos resultados sugieren que en la zona que abarca la región codificadora, tanto el gen de la Cn 121, como los demás genes de toxinas amplificados, se transcriben en productos de tamaño similar a su región genómica.

En otra serie de experimentos de PCR, se lograron amplificar varios fragmentos del banco de ADNc, entre los cuales al parecer se encuentran el ADNc de la toxina II.9.2.2. y otras toxinas relacionadas.

## 2.-INTRODUCCION

### 2.1.-IMPORTANCIA MEDICA Y CIENTIFICA DEL ESTUDIO DE LOS ALACRANES.

Investigadores de diversos países se han interesado en los venenos de los alacranes debido a la alta incidencia de casos fatales por sus picaduras (Magalhaes,1946; Russell, 1967; Bucherl, 1978; Habermehl; 1981; Goyffon *et al.*, 1982). En México (Mazzoti y Bravo-Becherelle 1963), Brasil (Bucherl,1971), Africa del Norte (Bazolet, 1971), y Medio Oriente (Shulov, 1955), los alacranes aún representan un problema médico y un riesgo para la vida humana.(ver revisión Possani 1984).

En México, en los periodos comprendidos de 1940- 1949 y 1957- 1958, fueron reportadas un total de 20,352 muertes causadas por picaduras de alacrán (Mazzotti y Bravo-Becherelle, 1963; citado por Keegan, 1980). Aunque el numero de muertes causadas por las picaduras de alacrán ha disminuido en años recientes, en el presente son atendidos más de 200 000 casos de picaduras de alacrán anualmente; en tanto que el promedio de personas fallecidas por esta causa es del orden 700 a 800, en su mayoría niños menores de dos años (Déhesa/Avila,1989). Los estados mas afectados por este problema son Colima, Guerrero, Nayarit y Morelos (Keegan, 1980).

No obstante que las picaduras de alacrán representan para algunos países un serio problema de salud pública; el enfoque actual de la investigaciones sobre los venenos de los alacranes dejo de ser objeto de interés unicamente médico. En realidad, la investigación moderna paso a ocuparse de las toxinas del veneno de animales ponsoñosos como herramientas para estudios de neurobiología, electrofisiología y farmacología molecular. (Catterall, *et al* 1986)

En la actualidad, con el advenimiento de las técnicas de la ingeniería genética molecular, se ha generado un considerable interés en su utilización para acelerar las posibilidades de estudio de la organización genómica y expresión de las toxinas de alacrán.

### 2.2.- TAXONOMIA Y DISTRIBUCION DEL GENERO CENTRUROIDES

En el mundo se conocen alrededor de 600 especies de alacranes incluidos dentro de 70 géneros y 6 familias (Miranda *et al.*, 1970). La mayor parte de las especies venenosas conocidas están dentro de la familia *Buthidae*, a la cual pertenece el género *Centruroides* de los alacranes mexicanos. La especie *Centruroides noxius* originaria de Nayarit es de particular interés, ya que por la alta toxicidad de su veneno es considerada como una de las especies más venenosas del mundo (Hassan, 1984).

Las especies de este género de alacranes americanos se encuentran distribuidos en algunos países de américa del sur, centro américa, Estados Unidos y México, el cual parece ser su centro de distribución. Aunque alrededor de 30 especies han sido reportadas para este género, en algunos casos la validez de tal clasificación se encuentra en duda; esto debido a que algunas de las características que son

consideradas como criterio para la separación de especies muestran considerable variación. Dos de tales características, color y presencia de una espina accesoria sobre el telson, se ha encontrado que son particularmente irrelevantes al respecto, puesto que pueden presentar variación en una misma especie (Keegan, 1980).

Al igual que otros alacranes de la familia *Buthidae*, las especies del genero *Centruroides* son encontradas frecuentemente debajo de la corteza de los árboles, troncos caídos o en grietas. Esta misma tendencia a ocultarse por arriba del suelo, en lugar de hacerlo en madrigueras terrestres, los ha llevado en algunas zonas a convertirse en especies domésticas. La mayoría de las picaduras de alacrán ocurren cuando los arácnidos son tocados accidentalmente en sus madrigueras o cuando salen de cacería en busca de alimentos; cuando esto sucede, pican inmediatamente y emprenden una rápida retirada. Mientras algunas especies son altamente venenosas, otras solo provocan un breve dolor con su picadura ( Keegan, 1980).

### 2.2.1.- Especies de Interés en los Estados Unidos.

*Centruroides sculpturatus* Ewing.- Esta especie es la única verdaderamente venenosa en los Estados Unidos, siendo inicialmente descrita por Ewing en 1928. Ennik (1972) reporta su ocurrencia en Nuevo México, Arizona, California y norte de México (Ennik, 1972, citado por Keegan 1980).

*Centruroides vittatus* Say.- Fue descrita inicialmente por Say en 1821. Esta especie es de poca importancia médica, y su trascendencia radica en que es la especie más ampliamente distribuida de todos los escorpiones americanos. En los estados Unidos ha sido reportada en Georgia, Florida, Kansas, Texas, Arkansas, Louisiana, Nuevo México, Kentucky, Colorado, Oklahoma, sur de Illinois y Missouri (Stahnke, 1956; Muma, 1967). En México, ha sido reportada en Tamaulipas, Coahuila, Chihuahua, Nuevo León y Zacatecas (Diaz Nájera, 1964).

### 2.2.2.- Especies de interés en México

De las 28 especies reportadas para el genero *Centruroides* en México, ocho son considerablemente peligrosas para el hombre:

*C. elegans* (Thorell), 1877; *C. infamatus* (Karsch), 1879; *C. infamatus ornatus* (Pocock), 1902; *C. limpidus* (Karsh), 1879; *C. limpidus tecomanus* (Hoffman), 1932; *C. suffusus* (Pocock), 1902; *C. sculpturatus* (Ewing) 1928; y *C. noxius* (Hoffmann), 1932. (citados por Keegan, 1980)

*Centruroides suffusus*.- Es el famoso alacrán del estado de Durango. Además de en esta entidad, también se le puede encontrar en Zacatecas (Diaz Najera, 1964). Whittemore and Keegan (1963), encontraron que el veneno de *C. suffusus* presentó una toxicidad en ratón similar a *C. limpidus tecomanus* y cerca de la mitad de la de *C. noxius*. Debido a la antigüedad de estos datos, es necesario redocumentar la importancia médica de esta especie.

*Centruroides elegans*.- Esta especie ha sido reportada en los estados de Guerrero, Jalisco, Nayarit, Sinaloa y las Islas Tres Marias (Keegan, 1980).

*Centruroides limpidus*. Hoffmann (1932) considera que esta especie puede propiamente dividirse en dos subespecies, *C. limpidus* (Karsch), 1879 y *C. tecomanus* Hoffmann, 1932. La distribución de *C.l. limpidus* ocurre en la región central del estado de Guerrero, Morelos y sur de Puebla; mientras que *C. l. tecomanus* solo se ha reportado en el estado de Colima. Esta especie es de considerable importancia médica, como quedó dramáticamente demostrado en 1959, cuando un ciclón azotó la ciudad costera de Colima y ocasionó el derrumbe de multitud de viviendas de adobe. Las alacranes que así salieron de sus escondites, causaron cientos de víctimas durante la crisis (Keegan, 1980).

*Centruroides noxius*.- Este pequeño pero extremadamente venenoso alacrán, fue descrito inicialmente por Hoffmann en 1932. Ha sido reportado principalmente en el estado de Nayarit, aunque también se han dado algunos registros en Jalisco y el Sur de Sinaloa (Keegan, 1980). Su gran interés reside en el hecho de que es considerado la especie más venenosa de México y uno de los alacranes más tóxicos del mundo (Dent et al., 1980).

### 2.3.- COMPOSICION DEL VENENO DE ALACRAN

En diversas investigaciones en las cuales se ha purificado el veneno de alacrán, se ha demostrado que sus componentes activos son péptidos, (ver revisión en Rochat et al., 1979) los cuales se conocen como toxinas. Estos péptidos pueden actuar específicamente bloqueando canales de sodio o potasio (Caterall, 1979; Carbone., 1982; Possani, et al., 1982) (ver sección 6.2).

Los venenos de los alacranes de la familia *Buthidae*, están compuestos principalmente por proteínas neurotóxicas y pequeños péptidos de función desconocida (Zlotkin et al., 1978; Possani et al., 1980). Las hialuronidasas parecen ser las únicas enzimas presentes en cantidades significativas, aunque en algunas especies como *Buthus tamulus*, se mostró la presencia de una fosfodiesterasa (Master et al., 1963). En la composición de los venenos de algunas especies de alacrán, también se han encontrado neurotransmisores tales como la serotonina en *Leiurus quinquestriatus* (Adam and Weiss, 1958) e histamina en *Palamneus gravimanus* (Ismail et al., 1975, citado en revisión Possani, 1984).

### 2.4.-EXTRACCION Y PURIFICACION DEL VENENO DE ALACRAN.

La mayoría de los trabajos bioquímicos reportados sobre toxinas de alacrán se han llevado a cabo con veneno extraído por estimulación manual o eléctrica de los telsons (Babin et al., 1974; Zlotkin et al., 1978; Rochat et al., 1979; Possani et al., 1980; 1981a; Hagag et al., 1983), ya que el uso de glándulas homogeneizadas presenta el problema de contaminación del veneno con componentes de alto peso molecular (Possani et al., 1980, 1981b).

La presencia de toxinas en los diferentes venenos es usualmente seguida por el efecto que estas presentan al ser inyectadas en animales de laboratorio (Tu, 1977; Zlotkin et al., 1978, citado en revisión Possani, 1984).

Las técnica más ampliamente utilizada para la purificación de toxinas de alacrán, consiste en su extracción del veneno crudo a través de solubilización en agua y centrifugación seguida por una cromatografía en columna (ver revisión Zlotkin *et al.*, 1978). La filtración en gel con reciclamiento en Sephadex G-50, es seguida de 1 ó 2 cromatografías de intercambio iónico sobre soportes insolubles como puede ser la carboximetilcelulosa (Rochat *et al.*, 1979; Possani *et al* 1981 a, c). Las resinas se equilibran y las muestras son aplicadas en una serie de diferentes sistemas de buffer a valores específicos de pH y fuerza iónica (revisión Possani, 1984).

En algunos casos, la estrategia para la purificación involucra un paso cromatográfico de intercambio iónico seguido de filtración en gel de Sephadex (Babin *et al.*, 1974; Watt *et al.*, 1978; Hagag *et al.*, 1983). Es difícil definir cual es la mejor estrategia para purificar una toxina dada. En principio, aquella que dé la toxina más pura y con el mejor índice de recuperación, es el método de elección (revisión Possani, 1984).

Para verificar la homogeneidad de las toxinas purificadas, la mayoría de los autores han usado tanto electroforesis en gel de acrilamida en el sistema de urea  $\beta$  - alanina de Reisfeld *et al.*, (1962), como secuenciación directa por degradación automática de Edman. Se han utilizado otros criterios para determinar la pureza en el estudio de algunas toxinas de alacrán, como son el enfoque isoelectrico, la ultracentrifugación analítica y la ausencia de un aminoácido dado en la composición química de las toxinas (Caterall, 1976; Lazarovici *et al.*, 1982a; Hagag *et al.*, 1983, citados en revisión Possani, 1984).

## 2.5. ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS DE ALACRAN.

### 2.5.1. Estructura Primaria.

La estrategia seguida para la determinación de la secuencia de aminoácidos de toxinas de alacrán, es exactamente la misma que la que se sigue para cualquier otra proteína o polipéptido. Por esta razón, el primer aspecto importante es el conocimiento de la composición química de las toxinas y sus péptidos derivados después de una digestión parcial. Esta información proporcionará el número y tipo de aminoácidos que se pueden esperar durante la secuenciación. Cuando el peso molecular de la proteína es conocido por otros métodos, la composición química, con la que se obtiene el peso molecular mínimo, indicará si la proteína está compuesta por una o varias cadenas polipéptidicas. El análisis total de aminoácidos ayudará también a localizar péptidos o aminoácidos que se pudieran haber perdido después de la digestión enzimática de una muestra dada (revisión por Possani, 1984).

Las toxinas de alacrán, como algunas otras de origen animal, son proteínas básicas y cortas de una sola cadena (Miranda *et al.*, 1970) de 28 (Lazarovici *et al.*, 1982a,b) a 78 aminoácidos (Toledo and Neves, 1976). La mayor parte de las toxinas son de alrededor de 60 a 65 aminoácidos (revisión Zlotkin 1978). Aminoácidos como lisina, cisteína y tirosina, se encuentran en las secuencias en relativa abundancia (de 5 a 10); en cambio, se presentan en bajo contenido aminoácidos tales como fenilalanina e isoleucina (de 1 a 2) en algunas especies y de fenilalanina e histidina en otras. La metionina es un aminoácido extremadamente raro en las toxinas de alacrán (Possani *et al.*, 1977).

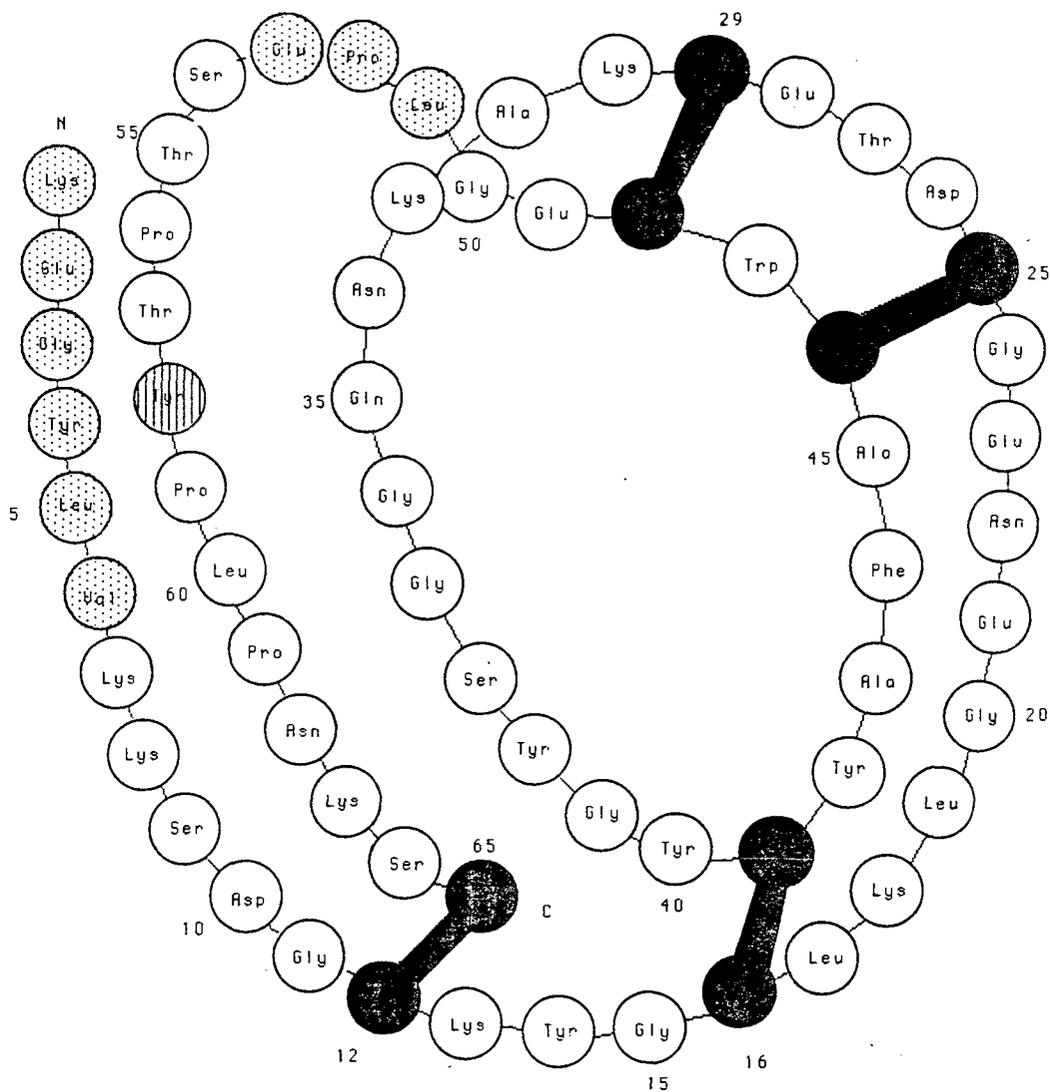
Alrededor de 120 toxinas aisladas en forma pura se han reportado de las cuales, la secuencia de aminoácidos completa de más de un tercio se ha determinado (revisión Possani, 1984; Meves *et al.*, 1989). Dado que las toxinas de alacrán son polipéptidos ricos en puentes disulfuro, uno de los pasos iniciales durante la determinación de la secuencia de aminoácidos es la reducción y alquilación de los residuos de cisteína (revisión Zlotkin *et al.*, 1978). Este tratamiento permite identificar fácilmente las posiciones de las cisteínas derivatizadas en la cadena polipeptídica. Para la determinación de la secuencia, la gran mayoría de las toxinas ha sido primero sujeta a degradación automática de Edman (Rochat *et al.*, 1970a, 1972; Kopeyan *et al.*, 1979; Grishin *et al.*, 1980, 1981; Possani *et al.*, 1981a,c). Normalmente este procedimiento permite determinar inequívocamente la posición de varias docenas de residuos de aminoácidos en la estructura primaria total. Por ejemplo, Rochat *et al.*, (1970a, 1972), usando secuenciación automática, ha determinado 38 y 43 aminoácidos de la región N terminal de las toxinas I y II, respectivamente, de *Androctonus australis*. También por este procedimiento Kopeyan *et al.* (1979) ha secuenciado 34 aminoácidos de la región N terminal de la toxina III del mismo alacrán. Grishin *et al.*, (1980), determinó 33 aminoácidos de la parte N terminal de la toxina II contra insectos del alacrán *Buthus eupeus* y Possani *et al.* (1982) ha determinado 37 de los 39 aminoácidos totales de la noxiustoxina de *Centruroides noxius* (revisión Possani, 1984).

La secuenciación automática ha ayudado grandemente en la determinación de la estructura primaria de las toxinas de alacrán, así como la de otros péptidos. Sin embargo, la parte difícil en este trabajo no es la determinación de la región N terminal, sino la determinación de la secuencia completa. La técnica usual para este propósito, es la combinación de secuenciación automática directa de la toxina entera, con cortes enzimáticos o químicos del polipéptido y subsecuente análisis de los aminoácidos de los péptidos resultantes. Con el solapamiento de estos péptidos se obtiene finalmente un mapa, en el cual, cada pieza de información de la secuencia es compilada en orden para dar un resultado único y coherente (revisión Possani 1984).

Se ha encontrado que múltiples toxinas están presentes en el veneno de una especie determinada y que en el caso de las toxinas que actúan sobre canales de sodio (ver sección 2.6.2.) éstas exhiben entre sí notable similitud en sus secuencias de aminoácidos. Así mismo, estas toxinas conservan regiones que son similares en las toxinas encontradas en otras especies. (ver figura 1). Esta similitud destaca, sobre todo, cuando se alinean las secuencias con respecto a los residuos de cisteína. En la figura # 2, se muestra la estructura primaria de la variante 3 de *Centruroides sculpturatus* una típica toxina bloqueadora de canales de sodio, la cual contiene 4 puentes disulfuros y posee 65 aminoácidos.

	1	10	20	30	40	50	59
Css II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN	YCLRECKQQY	GKSSGGYCYA	F	ACWCTHLYEQ		
Css III	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN	YCLRECKQQY	GKSSGGYCYA	F	ACWCEALPHD		
CsE I	KDGYLVEK	TGCKRKT	CYKLGENDFCNRECK	WKHIGGSYGYCYG	F	GCYCEGLPDS	
CsE v2	KEGYLVNKSTGCKYGC	LKLGGENEGCDTECKAKN	QGGSYGYCYA	F	ACWCEGLPES		
CsE v3	KEGYLVKSDGCKYGC	LKLGGENEGCDTECKAKN	QGGSYGYCYA	F	ACWCEGLPES		
Cn-II.9.2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDN	YCLRECKQQY	GKAGGYCYA	F	ACWCTHLYEQ		
Cn II-14	KDGYLVDA	GCKKNCYKLGKNDYCNRECR	MKHRGGSYGYCYG	F	GCYCEGLSDS		
TsIII-10	KEGYLMDH	EGCKLSCFYR	PSGYCGREGYK	K	GSSGYCAW	P	ACYCYGLPNW
TsIII-8	KEGYAMDH	EGCKFSCFYR	PAGFCDGYCKTHLK	ASSGYCAW	P	ACYCYGVFNX	
Ts IV-5	KDGYFVEYDN	CAYICWNY	DNAYCDKLC	KDK	K	ADSGYCYWV	H
							ILCYCYGLPXX
AaH II	KDGYIVDDVN	CTYFC	GRNAYCNEEC	TKLK	GESGYCQWASPYGNAC	YCYKLPDH	
Bot III	KDGYIVDDRN	CTYFC	GRNAYCNEEC	TKLK	GESGYCQWASPYGNAC	YCYKVPDH	
Lqq V	KDGYIVDDKN	CTFFC	GRNAYCNDEC	KK	KGGESGYCQWASPYGNAC	WCYKLPDR	
Amm V	KDGYIIDDLN	CTFFC	GRNAYCDEEC	KK	KGGESGYCQWASPYGNAC	WCYKLPDR	
Be M10	RDGYIADDKD	CAYFC	GRNAYCDEEC	KK	GAESGKCYWAGQYGNAC	WCYKLPDW	
Lqq IV	RDAYIADDKN	CBYTC	GSNSYCNEEC	TK	DGAESGYCQWL	GKYGNACWCIKLPDK	
Bot I	RDAYIAQFEN	CBYEC	AQNSYCNDEC	TK	DGATSGYCYCQWL	GKYNACWCKDLPDN	
Bot II	RDAYIAQFEN	CBYEC	AKNSYCNDEC	TK	NGAKSGYCYCQWL	GKYNACWCKDLPDK	
AaH I	RDGYIVYPNN	CBYHC	VP	P	CDGLC	KK	NGGSSGSSCF
AaH III	RDGYIVNSKN	CBYHC	VP	P	CDGLC	KK	NGAKSGSCGFLIP
							SGLACWCVALPDN

**FIGURA 1.-** Se muestran las secuencias N terminales de 21 toxinas de alacrán alineadas con respecto a sus cisteínas. Para propósitos de alineamiento el primer aminoácido fue eliminado en algunas secuencias (AaH I, II, y III, Amm V, Lqq IV y V, Ts IV-5, Bot I, II, y III y Be M10). La numeración del 1 al 59 se refiere a este alineamiento y no a las posiciones de los aminoácidos en las respectivas secuencias. El conjunto de los primeros siete aminoácidos están presentes en el mismo alineamiento en las 20 toxinas. Se encuentran remarcados los aminoácidos que son comunes en la alineación de las 20 toxinas. En el primer bloque se encuentran toxinas de alacranes norteamericanos, en el segundo de sudamericanos en el tercero de norteafricanos excepto Be M10 que es de un alacrán de asia central. En el caso de la secuencia C, (datos no publicados tesis maestría García R. C.) se determinó la secuencia de aminoácidos a partir de la de nucleótidos de un ADNc que posiblemente exprese una toxina funcional aún no aislada del alacrán *C. noxius* (Modificado de Possani et al., 1983).



**Figura 2.-** Secuencia de aminoácidos de la variante 3 de *Centruroides sculpturatus*. Los puentes disulfuro están señalados en negro y los residuos conservados con puntos. El residuo 58 el cual parece ser un aminoácido esencial para la actividad de la toxina I de *Androctonus australis* Hector está señalado con rayas (modificado de Fontecilla Camps, et al 1981).

### 2.5.2.- Estructura Secundaria Y Terciaria.

Las principales características de la estructura secundaria y terciaria de las toxinas de alacrán han sido estudiadas principalmente por las siguientes técnicas: dispersión rotatoria óptica, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear y cristalografía por difracción de rayos X. Estudios sobre la caracterización espectroscópica de 6 diferentes toxinas específicas sobre canales de sodio de alacranes de los géneros *Centruroides* y *Tityus* muestran que estas toxinas son moléculas bien estructuradas, reversiblemente resistentes a desnaturalización termal, y contienen de 20 a 22% de estructura  $\beta$  plegada y de un 4 a 11% de  $\alpha$  hélice. Además se encontraron indicaciones de diferencias estructurales entre las especies del género norteamericano *Centruroides* y el alacrán sudamericano *Tityus serrulatus* (Possani *et al.*, 1981d; citado en Possani 1984).

Aunque una combinación de varias de estas técnicas ha permitido conocer los detalles de la estructura secundaria y terciaria, la cristalografía por difracción de rayos X, es sin duda la técnica que más información ha aportado. Hasta el momento con esta técnica, se ha logrado determinar la estructura tridimensional de dos toxinas de alacrán. Juan C. Fontecilla Camps y colaboradores (1980; 1988) determinaron la estructura tridimensional de la toxina variante 3 del alacrán norteamericano *Centruroides sculpturatus* con cristalografía por difracción por rayos X. La estructura terciaria de esta toxina contiene características estructurales que se cree que son típicas para otras toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de sodio. lo cual fue también corroborado por datos obtenidos en estudios de resonancia magnética nuclear realizados por Arseniev *et al.* 1984, citado en Possani, 1984).

La estructura terciaria completa de la variante 3 de *C. sculpturatus*, (fig. 2) tiene dos y media vueltas de estructura  $\alpha$  hélice, las cuales abarcan de los residuos 23 al 32, y un corto trecho de 3 hebras de estructura  $\beta$  plegada antiparalela, el cual incluye las regiones que van de los residuos 1-4, 37-41 y 46-50. Las estructuras  $\alpha$  hélice y  $\beta$  plegada, se unen por los puentes disulfuro de las cisteínas en las posiciones 25 y 46 y de las cisteínas en las posiciones 29 y 48. Un tercer puente disulfuro, entre la cisteína 16 y la 41, esta también localizada cerca de la  $\alpha$  hélice y  $\beta$  plegada. Estos tres puentes disulfuros están ocultos dentro de la molécula. Algunos bucles salen desde el denso armazón de la estructura secundaria. El cuarto puente disulfuro, entre la cisteína 12 y 65, esta expuesto en un extremo de la molécula.

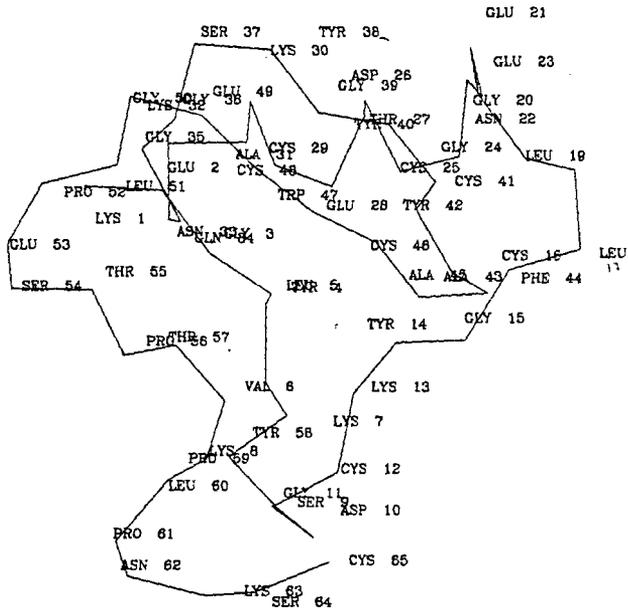
Los autores describen la forma total de la molécula comparándola con una mano derecha empuñada, con la cual presenta cierta similitud. De acuerdo con esto, La  $\alpha$  hélice corre a lo largo de los nudillos del puño; la región de la estructura  $\beta$  plegada se encuentra a lo largo de la segunda y tercera unión de los dedos; el dedo pulgar coincide con las dos asas constituidas por los residuos 16-21 y los residuos 41-46. La muñeca corresponde a el tramo del extremo COOH

terminal que comprende los residuos 52-65 y un asa compuesto por los residuos 5 al 14; y la segunda unión del menique se encuentra cercana al extremo NH<sub>2</sub> terminal de la molécula. El esqueleto de carbonos  $\alpha$  forma una gran superficie plana que incluye el trecho que correspondería a la superficie plana formada por los segundos falanges de los dedos y la parte inferior del puño (que puede observarse colocando la mano empuñada a la altura de los ojos). Esta superficie plana esta compuesta principalmente por regiones conservadas y por aminoácidos de carácter hidrofóbico (Fontecilla *et al.*, 1981). En la Figura 3, se muestra el esqueleto de carbonos  $\alpha$  la variante 3, señalándose a los aminoácidos con sus respectivas posiciones. En la figura 4, se muestra una imagen tridimensional de la molécula con sus nubes electrónicas.

Por otra parte, más recientemente el mismo Fontecilla Camps y Hebersetzer-Rochat (1988) determinaron la estructura tridimensional de la toxina II del alacrán norteafricano *Androctonus australis* Hector (AaH II). Las características más importantes de su estructura secundaria, son una trecho de  $\alpha$  hélice que comprende de los residuos 19 al 28 y un triplete de hebras  $\beta$  plegadas que se encuentran orientadas antiparalelamente, las cuales comprenden las regiones que van de los residuos 2-4, 32-37 y 45-51. La estructura  $\beta$  plegada se encuentra más o menos paralela a la  $\alpha$  hélice, ambas estructuras se encuentran unidas por puentes disulfuro a través de las posiciones Cis-22 y Cis-46, así como por las Cis-26 y Cis-48. Un tercer puente disulfuro se encuentra cercano y conecta las cisteínas de las posiciones 16 y 36. El cuarto puente disulfuro se encuentra entre las posiciones Cis-12 y Cis-63. Las moléculas de la variante 3 y AaH II, muestran en general características estructurales similares, las cuales definen la estructura general de las toxinas bloqueadoras de canales de sodio (Fontecilla Camps *et al.*, 1988).

Más recientemente, también se ha determinado la estructura tridimensional de la caribdotoxina, una toxina bloqueadora de canales de potasio. Esta toxina es un péptido de 37 residuos (Gimenez-Gallego *et al.*, 1988), con 8 aminoácidos básicos y 2 ácidos, 3 puentes disulfuro y un N terminal bloqueado por un residuo de piroglutamico.

La estructura tridimensional de la caribdotoxina se encuentra enclavada sobre las bases de 3 hebras de estructura  $\beta$  plegada en direcciones antiparalelas. La molécula es marcadamente elipsoidal con los ejes mayor y menor de 2.5 nm y 1.5 nm, respectivamente. Los grupos funcionales muestran una notoria segregación espacial sobre la superficie de la toxina. Una cara de la molécula es fuertemente polar, en tanto que en la cara opuesta, se encuentran expuestos la mayor parte de los grupos hidrofóbicos (ver Park *et al.*, 1991).



Estructura de carbonos alfa de la toxina variante 3.

*Fig # 3.- Se muestra el esqueleto  $\alpha$  carbonado de la variante 3 de Centruroides esculpuratus. Se indican la posición de los aminoácidos.*

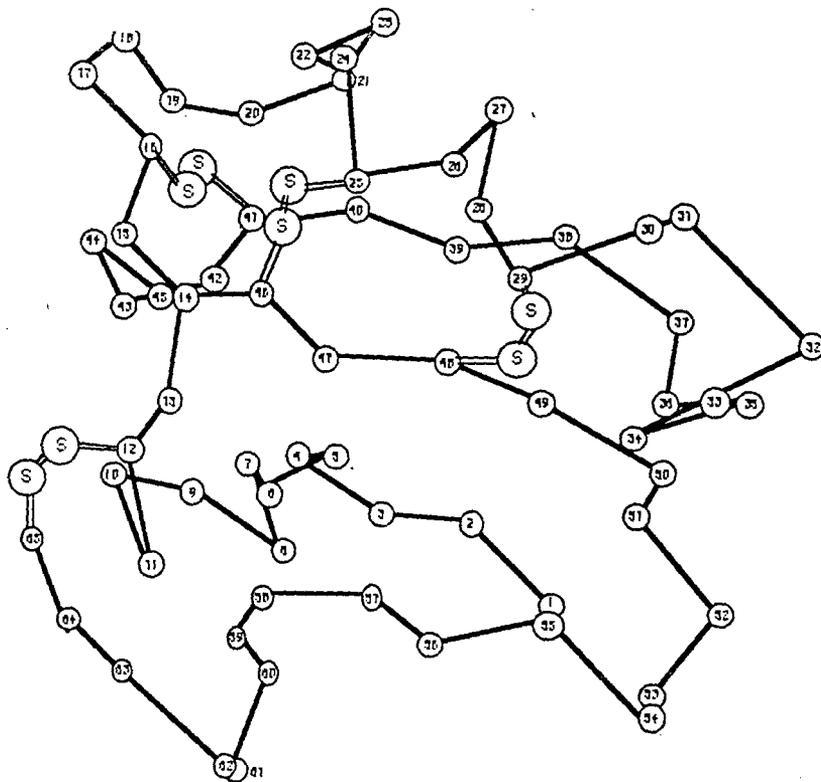
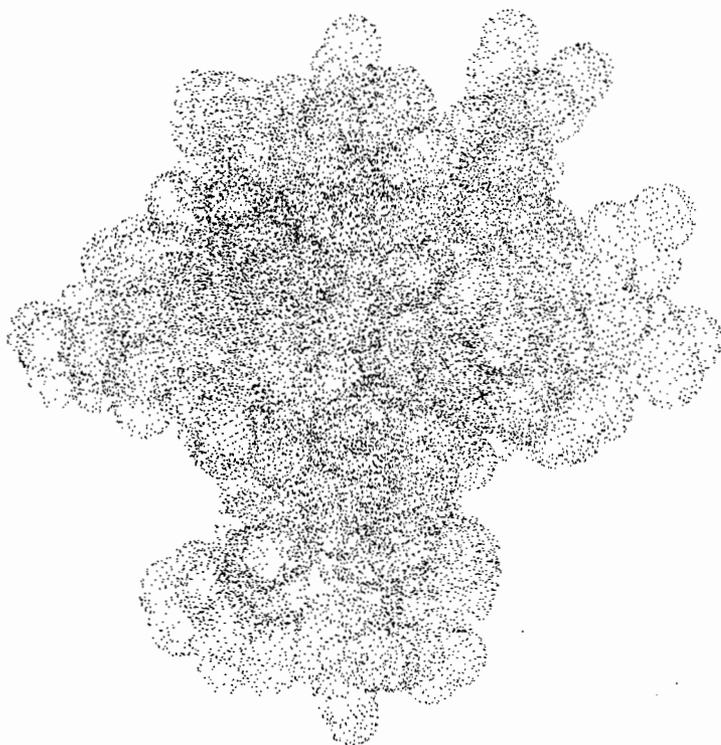


FIGURA 3A Esqueleto  $\alpha$  carbonado de la toxina variante 3 del alacrán *Centruroides sculpturatus* en donde se muestran los átomos de azufre conectados a los carbonos  $\alpha$  de los residuos de cisteína. Este dibujo fue elaborado usando el programa ORTEP por Fontecilla-Camps *et al.* (1980).



***Figura # 4.- Imagen tridimensional de la molécula de la variante 3 de Centruroides sculpturatus mostrando las nubes electrónicas de sus átomos.***

### 2.5.3.- Relaciones Estructura Función.

El análisis diferencial de la estructura tridimensional de las moléculas de la variante 3 y AaH II, junto con las conclusiones obtenidas al confrontar estos resultados con las observaciones realizadas al comparar la estructura primaria de las demás toxinas secuenciadas; han permitido ir formulando la mayor parte del cuerpo de una teoría para explicar las relaciones existentes entre las características estructurales de una toxina y sus funciones específicas.

#### 2.5.3.1.- Estructura Primaria: Análisis y Correlaciones Funcionales.

En la opinión de L. D. Possani (ver rev. 1984), hay por lo menos dos formas de analizar las relaciones estructura-función. Una consiste en tomar una toxina dada, introducir mutaciones en su estructura y probar su función. El otro sistema en cambio, consiste en la comparación de las regiones estructurales de una variedad de toxinas similares, con su acción sobre sitios específicos; para de esta manera, deducir cuales regiones estructurales son las responsables de determinada función.

Análisis métricos realizados sobre las secuencias de una variedad de toxinas, muestran que los aminoácidos conservados son de gran importancia para la estabilización de la estructura secundaria y terciaria (rev. Possani, 1984). Fontecilla Camps *et al.* (1981) a su vez, realizó un análisis de las estructuras de 28 toxinas de alacrán. Encontrando que aunque las secuencias exhiben considerable variación, mostraban tres regiones conservadas. La región conservada más grande corresponde de los residuos 1-6 de la variante 3, la segunda región a los residuos 45-47 y la tercera región a los residuos 51-53. (ver figura # 2)

#### 2.5.3.2.-Estructura Terciaria: Correlaciones Funcionales.

Cuando se determinó la estructura tridimensional de la primera toxina de alacrán, la variante 3 de *C. sculpturatus*, se vieron confirmadas muchas de las expectativas acerca de las relaciones estructura-función de las toxinas.

En el análisis de esta estructura se encontró que los aminoácidos conservados, con excepción de los residuos de cisteína, destacan en el modelo estereo espacial de la toxina (fig. 2). Los residuos conservados 1-4, 47 y 52-53 están agrupados sobre la superficie de la molécula formando una superficie larga y continua que se extiende por la parte media de la molécula, abarcando casi todo su ancho. Estos aminoácidos parecen ser buenos candidatos para desempeñar papeles funcionales en las neurotoxinas de alacrán.

Por otra parte, los aminoácidos conservados de las posiciones 5, 6, 45 y 51 que se encuentran por dentro de la estructura de la molécula, probablemente desempeñan importantes funciones en el mantenimiento de la estructura tridimensional. La variante-3 muestra también una interesante distribución tridimensional de los residuos hidrofóbicos, los cuales forman una banda larga y

continua de residuos hidrofóbicos expuestos a lo largo de la molécula. Siete de los ocho residuos aromáticos de la proteína están contenidos en esta banda. La parte posterior de la molécula contiene pocos residuos aromáticos, la mayor parte de los cuales no se encuentran expuestos (Fontecilla Camps *et al.*, 1981).

Fontecilla Camps y colaboradores, al confrontar sus datos con otras investigaciones, encontraron evidencias para hacer suponer que las características generales de la estructura tridimensional de la variante 3 es típica de las toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de sodio. Estas evidencias son:

1) Aunque la estructura primaria de diferentes toxinas muestra limitada homología, la localización de los residuos más conservados sugiere que las toxinas de alacrán tienen una misma configuración.

2) El uso de métodos para predecir estructuras secundarias en proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos, indica que las demás toxinas de alacrán tienen características en común con la variante 3.

3) Estudios sobre la modificación química de toxinas de *Androctonus australis* Hector, demuestran ser consistentes con las características estructurales generales de la variante-3. Por ejemplo, tal como se predijo para la estructura de la variante-3, solo uno de los cuatro puentes disulfuro en AaII es realmente susceptible a reducción.

4) En las demás toxinas analizadas, las deleciones e inserciones de aminoácidos ocurren en las regiones donde las alteraciones a la estructura general de la molécula de la variante-3 serían mínimas. Las deleciones de la variante-3 ocurren primariamente entre los residuos 18 y 24, en una de las asas que se extienden hacia afuera de la densa coraza de la estructura secundaria. En tanto que las inserciones en la estructura de la variante-3, ocurren principalmente entre los residuos 44 y 45, los cuales están localizados en otra asa protuberante en la estructura de la molécula. Parece existir una interesante correlación entre estas dos asas adyacentes: Las inserciones entre los residuos 44 y 45 se presentan acompañados por deleciones entre los residuos 18 y 24. Otras inserciones de segmentos se presentan en algunas toxinas en el extremo COOH y NH<sub>2</sub> terminal; así como en los residuos 8-12 y en la asa que incluye los residuos 32 y 35. Ninguna de estas inserciones o deleciones parece afectar en forma significativa las principales características de las estructuras secundarias de la molécula (Fontecilla Camps *et al.*, 1981).

Con la determinación de la estructura tridimensional de Aa II, la segunda toxina de alacrán conocida a este nivel, muchas de las anteriores hipótesis fueron corroboradas. Un hecho importante es que aunque AaH II, se encuentra en el veneno de *Androctonus australis* Hector que es una especie norteafricana, presentó características estructurales similares a la variante-3 de *Centruroides sculpturatus*

un alacrán de norteamérica. Lo cual da más validez a la idea de una estructura general de las toxinas específicas para canales de sodio (Fontecilla Camps *et al.*,1988).

La variante 3 comparte con AaH II una región similar altamente estructurada, la cual contiene la  $\alpha$  hélice, el triplete de hebras  $\beta$  plegadas antiparalelas y tres de los cuatro puentes disulfuro. En tanto, como se esperaba, los aminoácidos que componen las asas protuberantes de la densa armazón de la estructura secundaria, varían en forma apreciable en ambas moléculas. Tal como se había predicho, las mayores diferencias fueron encontradas en las regiones donde ocurren inserciones y en el extremo COOH terminal.

El carácter hidrofóbico de la superficie conservada de AaH II es determinado principalmente por la presencia de un grupo de residuos aromáticos en la superficie molecular, el cual también se presenta en la variante-3. Este grupo de residuos aromáticos también se ha encontrado en la cardiotoxina de *Naja mossaibica* (Boshard, 1979) y pueden estar implicados en la interacción de las toxinas con sus receptores.

#### 2.5.3.3.- Modificaciones químicas y correlaciones funcionales.

El enfoque de producir modificaciones químicas para determinar relaciones estructura función, se ha utilizado ampliamente en toxinas de AaH I y AaHII. De estas investigaciones principalmente destacan los siguientes resultados:

1) Existe una drástica pérdida en la actividad farmacológica, cuando la Lis-58 es biotinizada, o cuando la Lis- 56, equivalente en Aa I, es acetilada. también se observa una considerable pérdida de actividad por modificación del residuo básico de la posición 2 y remoción del dipéptido del extremo N terminal. (Sampieri *et al.*, 1978; Jover *et al.*, 198).

2) La toxicidad de AaH II es anulada, por reducción y S-metilación de los puentes disulfuro expuestos. (Fontecilla *et al.*,1981).

3) Los grupos carboxilo de cinco de siete aminoácidos ácidos en Aa II pueden ser químicamente modificados, lo cual resulta en una inactivación de la toxina.

4) Las modificaciones químicas, sugieren que la superficie hidrofóbica conservada de la molécula, puede contener sitios que estén involucrados en las interrelaciones de las toxinas de alacrán con membranas excitables.

5) Estudios sobre modificaciones químicas, y otras evidencias (Jover *et al.*, 1980; Okamoto, 1980), sugieren también, que las interacciones de las toxinas de alacrán con membranas excitables pueden involucrar a residuos básicos positivamente cargados sobre la superficie de la molécula. El único residuo básico altamente conservado, que en la variante-3 corresponde a la posición Lis-1; puede por lo tanto, contribuir a las interacciones de las toxinas de alacrán con los receptores membranales.

Acerca de las relaciones estructura función, podemos decir a manera de conclusión, que a pesar de los significativos progresos realizados para llegar a su comprensión, todavía falta conocer en detalle los mecanismos finos que determinan, entre otros aspectos, la toxicidad y la especificidad.

## 2.6.- ESPECIFICIDAD Y EL MECANISMO DE ACCION MOLECULAR DE LAS TOXINAS DE ALACRAN.

### 2.6.1 -Especificidad Toxina-Canal

#### 2.6.1.1.- Estructura y especificidad de las toxinas de alacrán.

Según su especificidad sobre los canales voltaje dependientes se han reconocido hasta el momento dos tipos diferentes de toxinas: aquellas que actúan específicamente sobre los canales de potasio y las que lo hacen sobre los canales de sodio (Caterall, 1979; Carbone., 1982; Possani, *et al.*,1982). Un mismo veneno de determinada especie de alacrán, puede contener ambas clases de toxinas.

Las toxinas que actúan sobre los canales de potasio tienen alrededor de 28 a 39 aminoácidos y una estructura tridimensional compacta dada por 3 puentes disulfuro; en tanto que las toxinas que bloquean a los canales de sodio son mayores (de 61 a 78 aminoácidos) y presentan una compactación estructural dada por 4 puentes disulfuro.(Miranda *et al.*, 1970; Kopeyan *et al.*, 1974; Fontecilla Camps *et al.*,1980; Possani *et al.*, 1982 y 1983).

Hasta el momento, la mayoría de las toxinas de alacrán que se han reportado son específicas de canales de sodio. Dentro de esta clase se encuentra la toxina II.9.2.2 de *Centruroides noxius*, y las dos toxinas de las cuales se tiene resuelta la estructura tridimensional, la variante-3 de *Centruroides sculpturatus* y la AaH II de *Androctonus australis*. De las toxinas bloqueadores de canales de potasio tenemos a la caribdotoxina y a la noxiustoxina.

La noxiustoxina es un péptido de 39 aminoácidos aislado a partir del veneno de *Centruroides noxius*. Esta toxina, es el primer péptido bloqueador de canales de potasio descrito, el cual ha sido totalmente sintetizado *in vitro* (Possani *et al.*,1981 a, 1982). Esta toxina ha demostrado ser un bloqueador específico de canales voltaje-dependientes de  $K^+$  en axón gigante de calamar (Carbone *et al.*, 1982, 1987), así como de la permeabilidad de  $K^+$  en sinaptosomas de cerebro de ratón (Sitges *et al.*, 1986). También esta toxina ha mostrado modificar los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , en músculo esquelético reicorporado en bicapas artificiales (Valdivia *et al.*, 1988). El sitio activo de la noxiustoxina se ha determinado que se encuentra en su porción amino terminal (Gurrola *et al.*, 1989).

La caribdotoxina es un péptido de 37 aminoácidos, aislada a partir del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus* (Giménez-Gallego *et al.*, 1988). Esta toxina muestra una alta actividad bloqueadora de canales de potasio que son activados por alta conductancia de  $Ca^{2+}$  en el músculo esquelético (Miller *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1988), neuronas (Herman y Erxleben, 1987; Reinhart *et al.*, 1989; Schneider *et al.*, 1989), riñón (Guggino *et al.*, 1987) y eritrocitos (Wolff *et al.*, 1988; Castle *et al.*, 1986) (citados por Park *et al.*, 1990).

#### 2.6.1.2.- Canales Iónicos y Mecanismo de Acción Molecular de las Toxinas de Alacrán.

Los canales de potasio y de sodio son un grupo heterogéneo de proteínas que son similares en su capacidad de permitir el paso selectivo de iones  $K^{+}$  y  $Na^{+}$  respectivamente, pero difieren en detalles de activación, inactivación y cinética del flujo iónico. Las estructuras primarias de los canales de sodio y calcio contienen cuatro fragmentos peptídicos repetidos similares en topología formando parte de un mismo polipéptido. En cambio, la estructura del canal de potasio está conformada por 4 monómeros que pueden ser iguales o diferentes (Baumann *et al.*, 1988).

La potente acción de las toxinas de alacrán está relacionada con su habilidad para unirse con alta afinidad a los canales de sodio que son voltaje dependientes en las células excitables (Couraud and Jover, 1984; Catarral, 1986).

Los canales de sodio permiten el influjo de  $Na^{+}$  que produce la fase inicial de rápida despolarización en el potencial de acción de la membrana. Estos canales tienen una compleja fisiología, la cual es alterada cuando las toxinas se unen a diferentes sitio del canal (Strichartz, 1989). Esta interrupción del flujo de iones de  $Na^{+}$  a través de los canales en fibras nerviosas y musculares, trae consigo un efecto paralizante (Caterall *et al.*, 1986).

Las arritmias respiratorias producidas por las picaduras de alacrán son debidas principalmente a la despolarización de las fibras viscerales aferentes (Freire-Maia, 1983) mientras otros efectos tales como hipertensión, salivación y arritmias, cardiacas son producidas por la liberación de acetilcolina y catecolaminas (ver revisión por Freire-Maia y Campos 1989).

Por comparación de los diversos estudios realizados sobre la unión específica de las toxinas, es evidente que existen dos clases de toxinas específicas de sodio, cada una de las cuales tiene efectos distintos sobre la corriente de sodio. (Meves *et al.*, 1989). De acuerdo con Koppenhofer y Smith (1968) y Narashashi *et al.* (1972) los efectos de los alacranes de los géneros *Leiurus* y *Buthus* producen un retardo en la inactivación de sodio; mientras que Cahalan (1975) demuestra que los alacranes del género *Centruroides* inducen la aparición de una nueva corriente de sodio. Basado en la diferencia de estos datos, Cahalan (1975) presentó la hipótesis

que los venenos de los alacranes del viejo mundo (por ejem. *Buthus*) retardan la inactivación de sodio, mientras que los alacranes del nuevo mundo (por ejem. *Centruroides*) inducen la aparición de una nueva corriente de sodio (ver por Freire-Maia y Campos, 1989).

Por otra parte, Caterall (1980) demostró que hay tres sitios receptores asociados a los canales de sodio. El sitio I, al que se unen la tetrodotoxina y la saxitoxina (otras moléculas bloqueadoras que no son de alacrán), con la inhibición del transporte iónico. El sitio II, al que se unen las toxinas liposolubles veratridina, batracotoxina, aconitina y grayano toxina. Y finalmente, el sitio III, al que se unen las toxinas de alacrán y las toxinas de anemona marina. Estas toxinas inhiben la activación del canal de sodio. Además, de acuerdo con Couraud *et al.* (1982), toxinas purificadas de alacranes originarios de africa y asia (por ejem. *Androctonus australis*, *Leiurus quinquestratus* y *Buthus occitanus*) son llamadas toxinas  $\alpha$  y se unen al sitio sitio III, mientras que toxinas purificas de alacranes norteamericanos (por ejemplo los alacranes del género *Centruroides*) son llamas toxinas  $B$  y se unen a un sitio diferentes en el canal de sodio, el sitio IV. Por último, Las toxinas purificas del alacrán sudamericano *Tityus serrulatus* tienen diferente unión al canal de sodio. La tityustoxina o TsTX (Gómez y Diniz 1966) se une al sitio III, siendo por lo tanto, una  $\alpha$  toxina; en tanto que la TsTX I (Toledo y Neves, 1976), también llamada gama toxina (Possani *et al.*, 1977) y la T1 VIII (Sapiao *et al.*, 1983), se unen a los mismos sitios receptores que las toxinas del género *Centruroides*, por lo que se les considera toxinas  $B$  (Javer *et al.*, 1980; Courad *et al.*, 1982; Barhanin *et al.*, 1982).

### 2.6.2.- Especificidad toxina-especie.

En los alacranes de la familia *Buthidae*, donde se encuentran los alacranes más tóxicos y por lo tanto también los más estudiados, se han encontrado toxinas que han demostrado ser preferentemente específicos contra mamíferos, insectos o crustáceos. (Zlotkin *et al.*, 1971; Babin *et al.*, 1974; Lester *et al.*, 1982).

En el veneno de una misma especie, se han encontrado una gran variedad de péptidos de bajo peso molecular, los cuales se han estimado en más de 20. Algunos de estos péptidos tienen actividad neurotóxica sobre una gran variedad de especies (revisión Meves, Simard and Watt, 1989).

Estas toxinas tienen regiones conservadas que son similares tanto en las toxinas de una misma especie, como en las de otras especies (ver revisión Possani, 1984), pero también contienen regiones variables, en las cuales se espera encontrar las características responsables de dar la especificidad para las diferentes especies. Darbon *et al.* (1982) encuentra que una toxina específica contra insectos de *A. australis* Hector, muestra modificación en un puente disulfuro en relación con otra toxina del mismo alacrán específica contra mamíferos. Los autores sugieren que este hecho puede introducir importantes cambios conformacionales en la molécula, lo cual puede explicar la especificidad de esta toxinas.

## 2.7.- GENETICA MOLECULAR DE LAS TOXINAS DE ALACRAN

La información generada sobre la genética de los alacranes es limitada. Sin embargo, cariotipos realizados a diferentes especies de alacranes sugieren que el número de pares de cromosomas puede no ser constante. En el caso de *Androctonus mauretanicus*, se han observado 12 pares de cromosomas ( $2n=24$ ) (Goyffon *et al.*, 1971, citado por Bougis *et al.*, 1989).

En los últimos años, con la creciente utilización de las técnicas de la biología molecular, se han realizado algunas aportaciones significativas en esta área del conocimiento. De igual manera, se espera que en un período no muy largo, se pueda lograr la comprensión de la estructura general de la organización genómica de los alacranes.

Hasta ahora, las investigaciones realizadas en el área de biología molecular relativas a alacranes, han sido pocas y se reducen a solo dos grupos de investigación. Estas investigaciones se han centrado casi exclusivamente en el aislamiento del ARN mensajero (ARNm) y su posterior clonación en forma de ADnc (ADNc) (Bougis *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1991).

El grupo de Pierre E. Bougis y colaboradores (1989) aislaron desde una biblioteca de ADNcs precursores de toxinas bloqueadoras de canales de sodio del alacrán *Androctonus australis*, siguiendo el siguiente procedimiento general:

### *Construcción de banco de ADNc.*

Un banco de ADNc, es una colección de ARNm que codifican para todas las proteínas que se expresan, en determinada célula, órgano u organismo (Sambrook *et al.*, 1989). Estos ARNm son retrotranscrito a ADN que es una molécula más estable y se clonan en un vehículo molecular apropiado. En el caso de el Bougis y colaboradores, la construcción del banco de ADNc se realizó con ARNm extraído de homogeneizado de telsons de alacrán. No se realizó la extracción del ARNm directo de las glándulas, debido a la gran dificultad técnica que implica su disección directa de los telson. La estrategia de clonación usada fue de acuerdo con el sistema de Okayama y Berg (1983) y se clonó en el plásmido pcDv-1. Se mostró que se habían clonado principalmente dos clases de transcritos, los cuales correspondían a un tamaño aproximado de 360 y 1100 pb (Bougis *et al.*, 1989).

### *Búsqueda de las clonas positivas en el banco de ADNc*

Dado que algunas toxinas de alacrán se encuentran en proporciones bajas en el veneno, también se ven poco representadas en el banco de ADNc. Por este motivo, esta baja representación constituye uno de las mayores limitantes para su búsqueda. Una forma de contrarrestar este problema, es utilizar para ser analizadas una gran cantidad de clonas (Bougis *et al.*, 1989).

La búsqueda de los precursores se realizó por hibridación con sondas de oligonucleótidos homólogos a las secuencias nucleótídicas deducidas a partir de la de aminoácidos de las toxinas AaH I, AaH II y AaH IT. Para cada experimento de búsqueda, fueron analizadas 40 000 placas del banco de ADNc.

Se analizó a las clonas positivas, determinándose que el tamaño aproximado de estos ADNc correspondía a aproximadamente 370 pb.

#### *Determinación de la secuencia nucleótídica de precursores.*

Los insertos de las clonas positivas fueron subclonados en el fago m13mp19, el cual en su fase replicativa produce cadena sencilla de ADN que era requerida para secuenciar. La secuencia nucleótídica fue determinada utilizando el método de los dideoxinucleótidos con la enzima secuensa. Se determinó la secuencia nucleótídica de un total de 11 clonas, las cuales corresponden a diferentes toxinas específicas sobre mamíferos o insectos. Se encontró también que en las toxinas de un mismo grupo eran muy parecidas las regiones que codifican para la región del péptido señal y que por el contrario, esta región variaba apreciablemente en toxinas de distinto grupo. En la figura 5, se muestra la secuencia nucleótídica del ADNc del ARNm que codifica para la toxina AaH II.

#### *Análisis con Souther Blot*

Este análisis consiste en la transferencia de ADN a una membrana de nitrocelulosa o nylon en la cual queda covalentemente pegado, se hibrida con alguna sonda radioactiva y finalmente se obtiene una autorradiografía (Sambrook *et al.*, 1989).

Bougis y colaboradores digirieron el ADN genómico de alacrán *A. australis* con enzimas de restricción y lo hibridaron usando como sonda el ADNc del precursor para la toxina AaH II. Los resultados de este experimento indican, según estos autores, que existe una sola copia del gen que codifica para la toxina específica de mamífero el cual tiene un tamaño mínimo de 2800 pb.

#### *Experimentos de expresión.*

Al realizar la clonación de los ADNc, se utilizó un plásmido con un sistema de expresión eucariótico conteniendo un origen de replicación del virus SV40. Estos plásmidos de expresión se usaron para transformar células Cos-7 de riñón de mono. Los resultados indican que la clona que se utilizó que contenía el ADNc de la toxina AaH II, efectivamente expresa la toxina AaH II en su forma activa (Bougis *et al.*, 1989).

Por otra parte, recientemente Park y colaboradores (1991) expresaron como una proteína de fusión en *E. coli* al gene que codifica para la carybdotoxina, una toxina bloqueadora de canales de potasio(ver sección 2.6.1.2.), del alacrán *Leiurus quinquestratus*. La toxina recombinante fue oxidada para formar puentes disulfuro y tratada para formar piroglutamico en el extremo N terminal, modificaciones que son necesarias para hacerla funcional.

La caribdotoxina recombinante resultó ser idéntica que la toxina nativa, con respecto a su movilidad electroforetica, composición de aminoácidos y modificación en el extremo N terminal. De igual manera, demostró un comportamiento similar en su actividad bloqueadora y cinética de disociación con respecto a canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^+$  en un sistema de ensayo (Park *et al.*, 1991).

Hasta la fecha, no se ha reportado la secuencia de ninguna región genómica que codifique para las toxinas de alacrán.

	15		30		45
<u>ATG AAT TAC TTG GTT ATG ATT AGT TTG GCA CTT CTT TTC GTG ACA</u>					
Met Asn Tyr Leu Val Met Ile Ser Leu Ala Leu Leu Phe Val Thr					
	60		75		90
<u>GGT GTA GAG AGT GTA AAA GAC GGT TAT ATT GTC GAC GAT GTA AAC</u>					
Gly Val Glu Ser Val Lys Asp Gly Tyr Ile Val Asp Asp Val Asn					
	105		120		135
<u>TGC ACA TAC TTT TGT GGT AGA AAT GCA TAC TGC AAC GAC GAA TGT</u>					
Cys Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Ala Tyr Cys Asn Glu Glu Cys					
	150		165		180
<u>ACC AAG TTG AAA GGT GAG AGT GGT TAT TGC CAA TGG GCA AGT CCA</u>					
Thr Lys Leu Lys Gly Glu Ser Gly Tyr Cys Gln Trp Ala Ser Pro					
	195		210		225
<u>TAT GGA AAC GCC TGC TAT TGC TAT AAA TTG CCC GAT CAT GTA CGT</u>					
Tyr Gly Asn Ala Cys Tyr Cys Tyr Lys Leu Pro Asp His Val Arg					
	240		255		270
<u>ACT AAA GGA CCA GGA AGA TGC CAT GGC CGA TAA ATTATATAAGATGG</u>					
Thr Lys Gly Pro Gly Arg Cys His Gly Arg					
	280	290	300	310	320
AATGTATCCT AAGTATCAAT <u>GTAAATAAA</u> TATAATTAAA AAATTA AAAA					
330 340 348					
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAA					

**FIGURA 5.-** Secuencia nucleotídica del ADNc del ARNm que codifica para la toxina AaH II. La secuencia del péptido señal que codificaría para 19 aminoácidos, es mostrada remarcada y subrayada. La secuencia que codificaría para la toxina II.9.2.2. madura, se muestra doblemente subrayada, mientras que la de la posible señal de poliadenilación, se muestra subrayada (modificado de Bougiss et al., 1989).

### 3.-ANTECEDENTES

#### 3.1. PARTE DE BIOQUIMICA

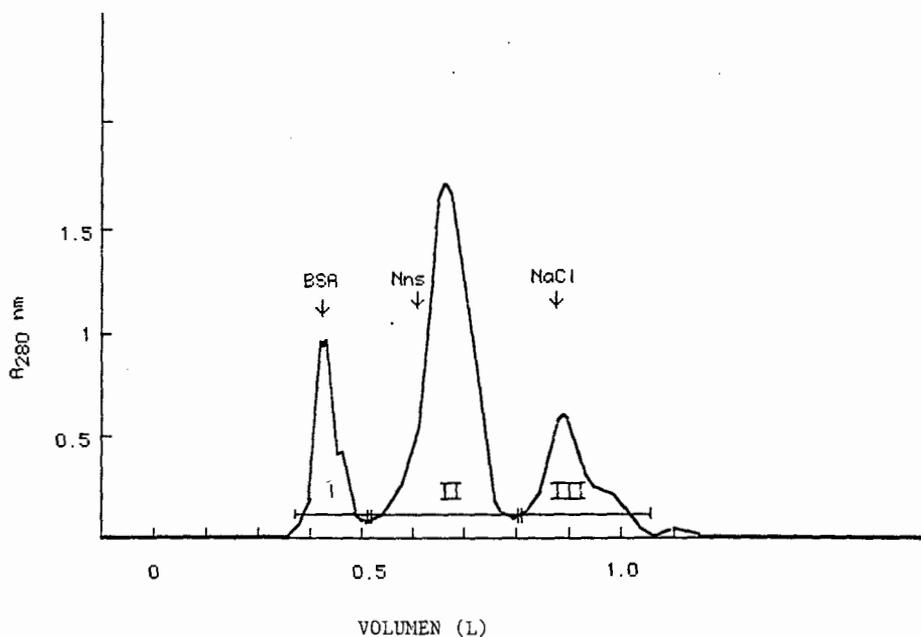
El grupo del Dr. Lourival Posanni del Departamento de Bioquímica del Instituto de Biotecnología de la UNAM ha sido pionero en el país en la determinación de la estructura química de las toxinas del alacrán y en la síntesis de péptidos en fase sólida (ver revisión Posanni 1984). Este grupo ha aislado y caracterizado una gran variedad de toxinas de alacranes de los géneros *Tityus* y *Centruroides*, y en especial, del alacrán *C. noxius*.

##### 3.1.- Extracción y purificación del veneno de *Centruroides noxius*.

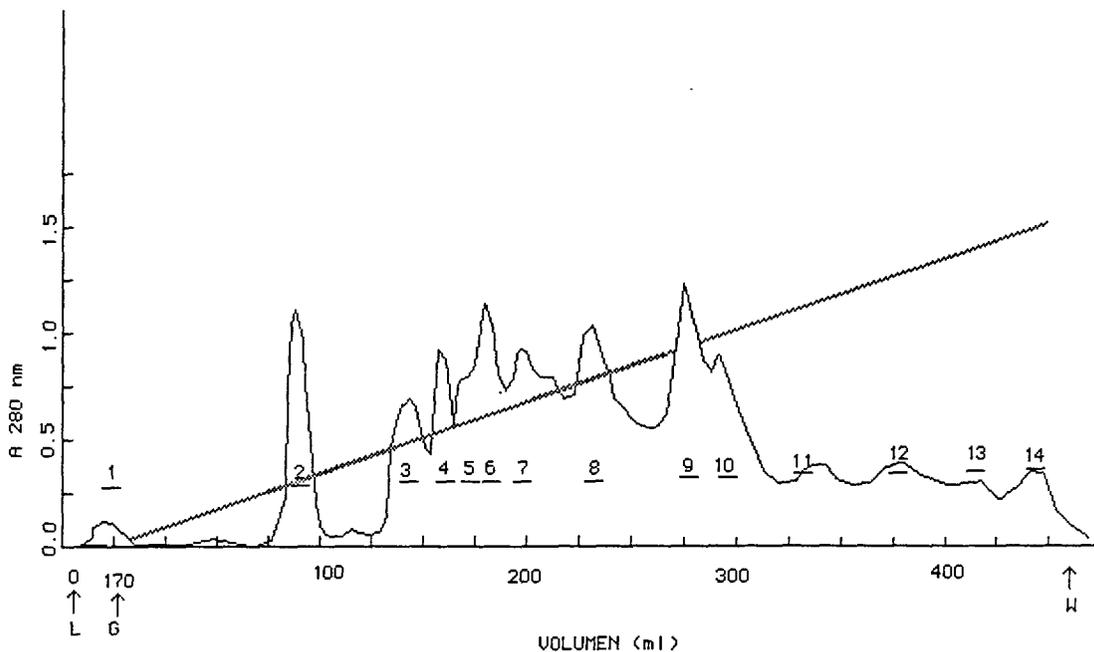
El sistema mediante el cual se logró aislar en forma pura la toxina II. 9.2.2 y otras toxinas relacionadas de este alacrán es el siguiente:

El veneno es resuspendido y centrifugado para remover restos celulares. Después es separado por cromatografía en una columna de Sephadex G-50. Esta cromatografía da 3 fracciones de las cuales la fracción II constituye el 63% del veneno recuperado y es letal para ratones (figura 6). Puesto que las toxinas son polipéptidos básicos, una resina de intercambio cationico, como la CM-celulosa, es adecuada para el segundo paso de purificación. La separación de la fracción II por esta resina da por lo menos 14 fracciones, de las cuales 8 son tóxicas para mamíferos y 2 para crustáceos (figura 7A).

De estas fracciones, la II.9.2 fue la que resultó ser la más abundante. Esta fracción fue recromatografiada en una columna similar de CM celulosa, de la cual se obtuvieron las fracciones II.9.2 y II.9.3. (figura 7B), las cuales debido a la baja resolución lograda, fueron colectadas bajo la denominación de toxina II.9 y cromatografiadas en una columna Bio Rex 70 (figura 7C). Por este procedimiento la toxina II.9.2.2 se obtiene en forma puras las toxinas II.9.2.1 y II.9.2.2 (Possani *et al.*, 1981d) II.10.1, II.10.2 y II. 11 (Possani *et al.*, 1982).



**FIGURA 6.-** Separación del veneno soluble de *C. noxius* la cromatografía se realizó en una columna de 2.9 por 170 cm de sephadex G-50, se equilibró con 0.02 M de acetato de amonio, p H 4.7, fue cargada con 6.3 ml de veneno soluble conteniendo 500 unidades de absorbancia a 280 nm y eluido con el mismo buffer con un flujo de 50 ml/hr. Las fracciones I, II y III contienen aproximadamente 17, 63 y 20 %, respectivamente, del material recobrado. BSA (suero de albúmina de bovino, peso molecular 66,200), N.n.s. (una toxina de *Naja naja siamensis*, peso molecular 8000), y NaCl fueron aplicadas separadamente como marcadores de peso molecular (tomado de revisión Possani, 1984).



**FIGURA 7A.-** La fracción II se separo en una columna CM-32 (0.9 X 27 cm) equilibrada con 0.2 M de acetato de amonio, pH 4.7. Fue cargada con 95 mg (peso seco) o 116.6 unidades de absorbancia (a 280 nm). Tomado de revisión Possani 1984.

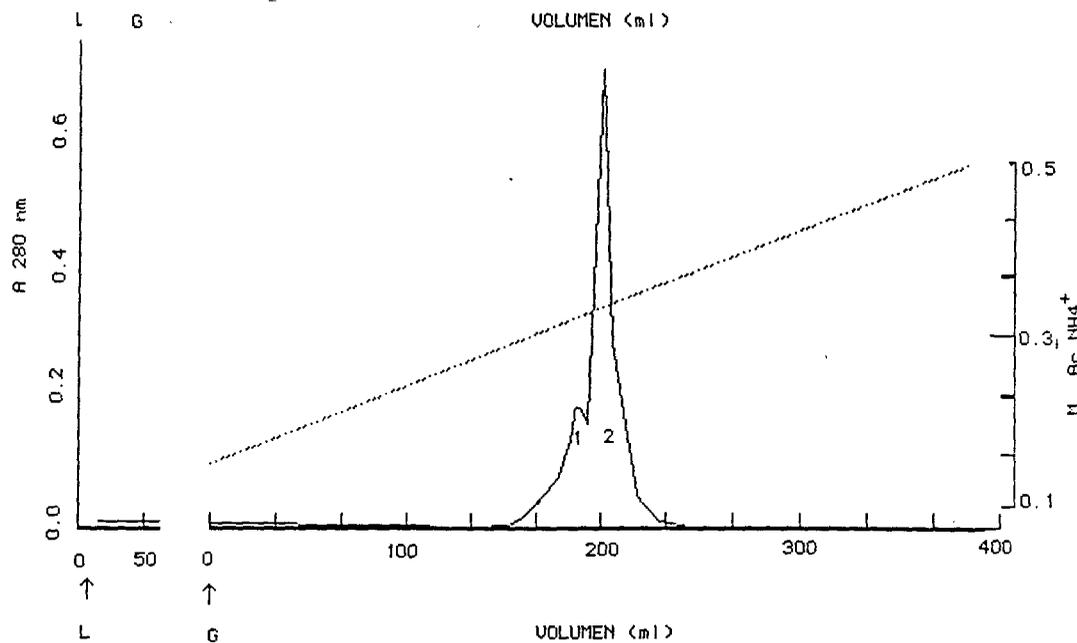
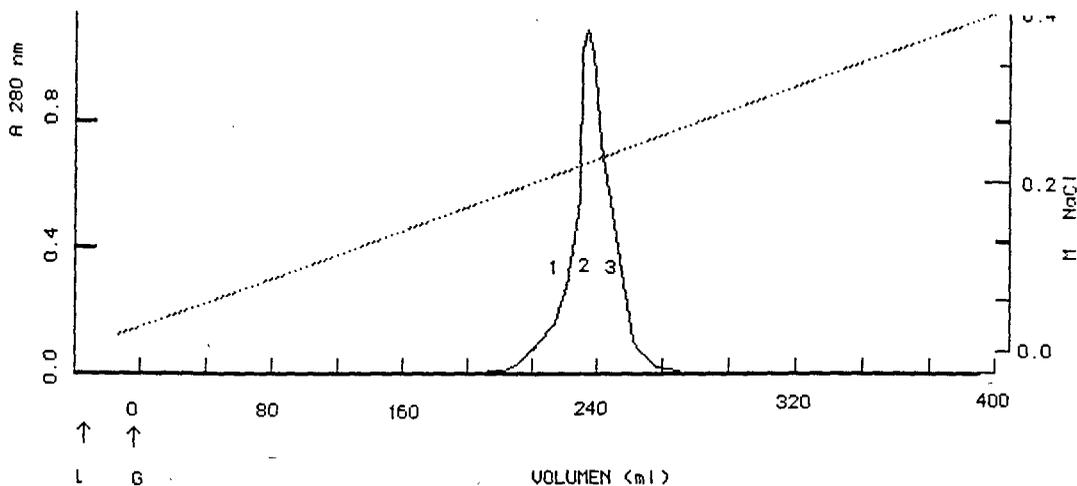


FIGURA 7B.- Los componentes tóxicos de la fracción II.9 fueron mezclados, dializados y recromatografiados en una columna CM celulosa bajo las mismas condiciones descritas en 7A. Se cargaron 27.8 mg de proteínasa en 75.5 ml.

FIGURA 7C.- Un total de 26.6 mg de proteína de los componentes II.9.2 mas II.9.2 en 75 ml se cromatografiaron en una columna Biorex 70 (0.9 X 9.9 cm). Un gradiente lineal de concentración de buffer (acetato de amonio, pH 6.5) de 0.09 a 0.5 M, fue aplicado a un flujo de 24 ml/hr y se colectaron fracciones de 2.2 ml. Dos principales componentes tóxicos se obtuvieron, II-9.2.1 y II.9.2.2 (Tomado de Possani, 1984).

### 3.2.- Determinación estructura primaria, toxina II. 9.2.2.

El procedimiento de secuenciación de esta toxina siguió los mismos pasos generales que comprende el procedimiento para cualquier proteína (ver sección 2.5.1). La secuencia del extremo amino fue la primera en determinarse y se realizó por degradación automática de Edman (Possani *et al* 1981a). Para la determinación de la secuencia en la región carboxilo, la proteína se redujo y carboximetiló utilizando ácido iodoacético para realizar la alquilación. Después el péptido se digirió con la proteasa V<sub>8</sub> de *Staphylococcus aureus* obteniéndose de esta forma una serie de péptidos que se purificaron por HPLC y se colectaron para determinar su secuencia de aminoácidos por medio de degradación automática de Edman. De estos péptidos secuenciados, se obtuvo el que correspondía a la secuencia del carboxilo terminal. (ver secuencia completa en figura 10).

### 3.2.-PARTE DE BIOLOGIA MOLECULAR

El Doctor Baltazar Becerril Luján, investigador asociado del Dr. Francisco Bolívar Zapata, ha establecido un trabajo de investigación en colaboración con el Dr. Lourival D. Possani, cuyo principal objetivo es el aislamiento de genes que codifican para toxinas de alacrán.

Dado que se conocía la secuencia de aminoácidos de varias toxinas, la estrategia general de la investigación consistió:

- 1) La construcción de un banco de ADNc.
- 2) El diseño de oligonucleótidos en base a la secuencia aminoácida de las toxinas (empezando con la II 9.2.2).
- 3) Utilización de estos oligonucleótidos para la búsqueda de los ADNc que corresponden a los ARMm de las toxinas en el banco.
- 4) Secuenciación de estos ADNc.
- 5) Uso de estos ADNc para la caracterización de los genes que codifican para las toxinas de alacrán.

### DATOS NO PUBLICADOS

#### 3.2.1- Construcción de banco de ADNc de *C. noxi*s

Uno de los primeros pasos que se dieron en este proyecto fue la construcción de un banco de ADNc del alacrán *C. noxi*us. Este banco de DNAc se construyó siguiendo el protocolo descrito en ADNc Synthesis System Plus de Amersham (ver figura 8). Para su elaboración se extrajo el ARN total de un homogeneizado de

aproximadamente 800 glándulas venenosas de alacranes de la especie *Centruroides noxius*. De allí se purificó el ARN mensajero poli A con oligo dT pegado a un soporte que en este caso fue papel y se retrotranscribió a ADN de cadena sencilla, al cual se le polimerizó su cadena complementaria. Enseguida, mediante una serie de manipulaciones enzimáticas (ver figura 9) se ligó estos ADNc a los brazos del fago lambda gt 11, para después empacarse con las proteínas propias del fago, obteniéndose de esta manera una población de partículas fágicas infectantes.

Estos fagos recombinantes se amplifican al infectar un cultivo de *E. coli*. De esta manera se obtiene amplificada toda una colección de las diversas secuencias de ADN complementarios a ARNm que se transcriben en las glándulas venenosas del alacrán, entre ellas, todas las posibles toxinas de esta especie.

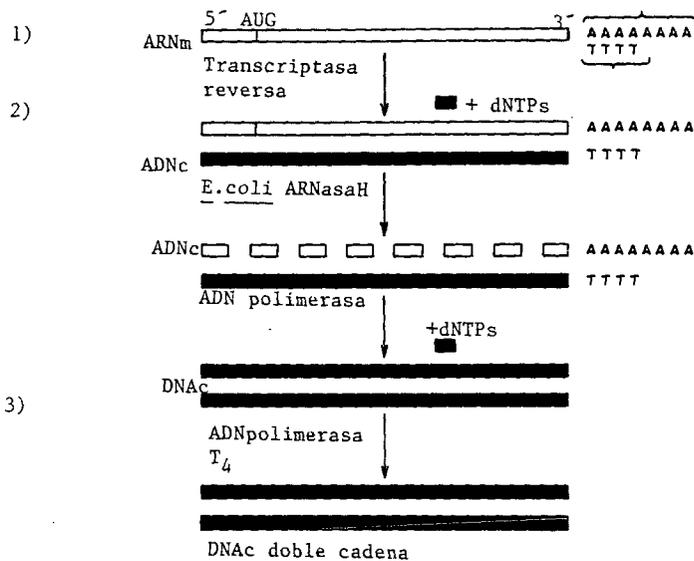
### 3.2.2.- Aislamiento de clonas positivas

Se llama sonda, a aquella secuencia de nucleótidos conocida que se puede marcar radioactivamente y que nos sirve para identificar otra secuencia de ADN homóloga a ella, en este caso, entre una población de ADN complementarios.

En base a la información que se obtuvo de la secuencia de aminoácidos de las toxinas hasta ahora identificadas, se planeó el diseño de secuencias de oligonucleótidos para la elaboración de sondas. Su diseño se basó en la selección de una región de la secuencia peptídica, que sea codificada por el conjunto de tripletes menos redundante. Se sintetizan todos los posibles 21ameros que codifiquen para dicha región y se marcan radioactivamente en su extremo 5' para poder ser usados como detectores.

De esta manera se diseñaron y sintetizaron 2 mezclas de oligonucleótidos que contenían todas las posibles secuencias de ADN que codificarían para un conjunto de 7 residuos contiguos correspondientes a la región 42-48 de la secuencia de aminoácidos de la toxina II-9.2.2.de *Centruroides noxius* (Ver figura 10).

Con estos oligonucleótidos, se probó un conjunto de condiciones de prehibridización, hibridización y lavado de filtros, hasta encontrar las mas adecuadas para la generación de señales de hibridización específica. El rastreo de una alícuota equivalente a  $10^4$  placas del banco de ADNc, permitió detectar 9 señales positivas. Se eluyeron estas placas, se determinó el título de fagos presentes en el eluado y se plaquearon a baja densidad (200 placas/caja de 90 mm), con el objeto de efectuar un segundo rastreo. En este segundo rastreo, solamente 2 de las 9 señales volvieron a dar una clara señal positiva. De la cajas correspondientes a las señales positivas del segundo rastreo, se eluyeron algunas placas y se volvieron a sembrar efectuándose un tercer rastreo. De este último, se escogieron aquellas cajas en las que el 100% de las placas fueron positivas. De esta forma se obtuvieron 2 clonas puras a las que se denominaron Cn111 y Cn121.



**FIGURA # 8.- Síntesis de ADNc de doble cadena. Sistema de síntesis de ADNc de Amersham.**

- 1) La primera hebra de ADNc es sintetizada usando transcriptasa reversa y oligo dT como primer (primer).
- 2) La ARNasa H de *E. coli* es usada para cortar el ARN en el híbrido ARN-ADN. Entonces la ADN polimerasa reemplaza eficientemente la cadena de ARN utilizando los trozos de ARN cortado como primer.
- 3) La actividad exonucleasa 3'→5' de la ADN polimerasa T<sub>4</sub> es usada para remover algún extremo OH sobresaliente de la primera cadena de ADNc en su extremo 3'.

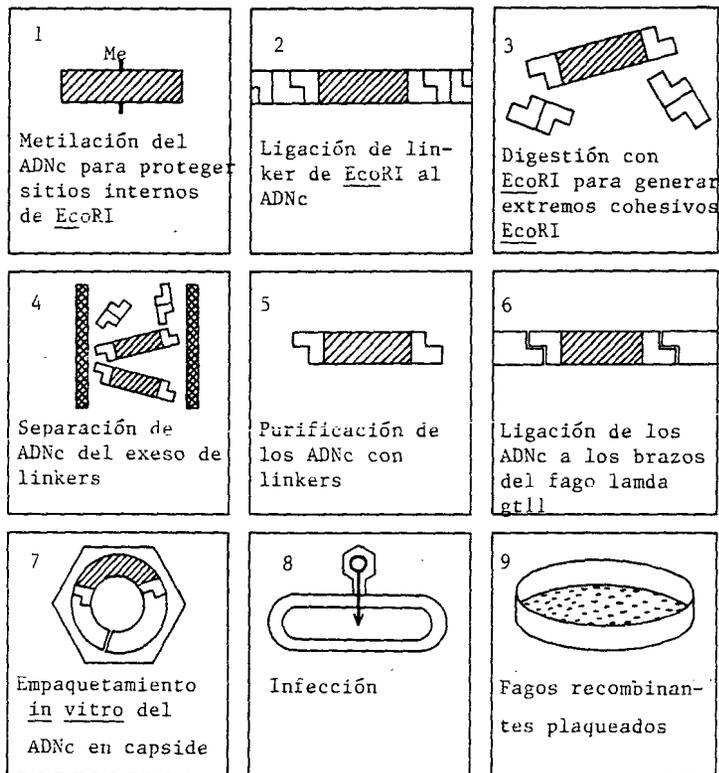


FIGURA # 9.- Clonación de los ADNc en el fago lambda gt11.

# A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15  
 Lis-Glu-Gly-Tyr-Leu-Val-Asp-Lys-Asn-Thr-Gly-Cys-Lys Tyr-GLU-  
16 17 18 19 19 20 21 22 23 24 25 26 27 25 26  
 Cys-Leu-Lis-Leu-Gly-Asp-Asn-Asp-Tyr-Cys-Leu-Arg-Glu-Cys-Lis-  
27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41  
 Arg- Glu-Cis- Lis-Gln-Gln-Gli-Tyr-Lis-Gli-Ala-Gli-Gli-Tyr-Cis  
42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56  
 Tyr-Ala-Phe- Ala-Cys-Trp-Cys-Trp-His-Leu-Tyr-Glu-Gln-Ala-Ile-  
57 58 59 60 61 62 63 64 65 66  
 Val-Trp-Pro-Leu-Pro-Asn-Lis-Arg-Cys- Ser.

# B

Css III	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNNDYCLRECKQQYKSSGGYCYA	F	ACWCEALPHD
CSE I	KDGYLVEK TGCKKTCYKLGENDFCNRECKWKHIGGSYGYCYG	F	GCYCEGLPDS
CSE v2	KEGYLVNKSTGCKYGCCLKLGENEGCDKECKAKNQGGSYGYCYA	F	ACWCEGLPES
CSE v3	KEGYLVKKS DGCKYGCCLKLGENEGCDTECKAKNQGGSYGYCYA	F	ACWCEGLPES
Css II	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNNDYCLRECKQQYKSSGGYCYA	F	ACWCTHLYEQ
Cn-II.9.2	KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDNNDYCLRECKQQYKAGGGYCYA	<b>F</b>	<b>ACWCTHLYEQ</b>
Cn II-14	KDGYLVDA KGCKKNCYKLGKNDYCNRECRMKHRGGSYGYCYG	F	GCYCEGLSDS

# C

42   43   44   45   46   47   48  
Tir--Ala--Phe--Ala--Cis--Trp--Cis  
 5 TAT<sub>c</sub> GCN   TTT<sub>c</sub> GCN   TGT<sub>c</sub> TGG TGT<sub>c</sub> 3'

**FIGURA 10.- A) Secuencia completa de la toxina II-9.2.2 de *Centruroides noxius*, remarcandose la zona que se eligió para el diseño de la sonda. B) Con fines comparativos se muestran las secuencias N terminales de otras 6 toxinas de alacranes del género *Centruroides*. Note las diferencias con la toxina II-14 del mismo alacrán y la mayor semejanza con la toxina Css II de *Centruroides suffusus suffusus*. C) Diseño de la mezcla de oligonucleótidos sintético utilizado para las pruebas de hibridación para la búsqueda de la toxina II-9.2.2.**

Posteriormente se hizo una caracterización física de los insertos presentes en estos fagos mediante digestiones con diferentes endonucleasas de restricción. A partir de esta caracterización se determinó que las clonas Cn111 y Cn121, portaban insertos de aproximadamente 250 y 415 pares de bases respectivamente.

Para saber que tan similares eran estas clonas en su secuencia nucleotídica, se realizó una hibridización de tipo Southern, utilizando como detector el inserto de la clona Cn111 marcado con <sup>32</sup>P. La hibridización y los lavados se efectuaron en condiciones altamente estrictas. Las señales fueron muy similares por lo que se determinó que estas dos clonas deberían de tener regiones similares en su secuencia nucleotídica (trabajo correspondiente a la tesis de Doctorado de Vázquez R. A.).

Posteriormente en otra serie de experimentos análogos, utilizando la clona Cn111 se pudo aislar y caracterizar otra clona denominada C2, la cual porta un fragmento de 373 pb (trabajo correspondiente a la tesis de Maestría de García R. C).

### 3.2.3.- Secuenciación de clonas positivas

Inicialmente, se procedió a determinar la secuencia nucleotídica de los insertos de las clonas Cn111 y Cn121. Para ello se decidió subclonar dichos insertos en el fago M13 (mp18 y mp19) para obtener cadena sencilla (forma más común de secuenciar). Un hecho notable en los resultados fue que la transfección fue exitosa solamente en el caso de la subclonación del inserto proveniente de la clona Cn111, por lo cual solo este pudo ser secuenciada con este sistema.

Debido a esta dificultad para subclonar el inserto de la clona Cn121 en M13, se decidió tratar de secuenciarla directamente en doble cadena, para lo cual se tuvo necesidad de probar diversas variantes metodológicas. Los ADNs utilizados para la secuencia fueron, el inserto purificado de la clona Cn121, el fago completo y el inserto amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Finalmente, el inserto de esta clona se pudo secuenciar en doble cadena usando como templado un producto de PCR (trabajo correspondiente a la tesis de Doctorado de Vázquez R. A.).

Cuando tiempo después se intentó secuenciar la clona C2, teniendo en cuenta las dificultades de subclonar en M13, se subclonó en un plásmido con un origen de replicación de fago f1 (fásmido) llamado pBLUES SCRIPT KS. El ADN usado como templado fue todo el plásmido recombinante del cual se obtuvo la secuencia en doble cadena (trabajo correspondiente a la tesis de Maestría de García R. C).

Al analizar los resultados de la secuencias nucleotídicas de los insertos de la clonas Cn111 y Cn121 se constató que tenían los sitios blanco de los oligonucleótidos que se utilizaron para su búsqueda.

### 3.2.4.- Análisis de las secuencias

#### *Cn111*

De la secuencia nucleotídica, se dedujo la de aminoácidos y se comparó con las reportadas para las toxinas de *C. noxius* y otros alacranes del género *Centruroides*. La secuencia de aminoácidos de la clona Cn111, es similar tanto a la toxina II-9.2.2. como a la II-14.

Por otro lado, fue notable que la clona Cn111, es altamente similar a la variante 3 de *Centruroides sculpturatus* (CsEv3), de la cual se conoce la estructura tridimensional (ver figura 11). Por lo que respecta al extremo amino terminal, la secuencia mostró que en caso de que esta forme parte de una toxina funcional, no estaría completa ya que empieza en el equivalente a la Cys 25 de las toxinas funcionales.

En cuanto a las características del mensajero a partir del cual se obtuvo el inserto de la clona Cn111 (231 pb), se pudo deducir que en el extremo 3' se encuentran las características típicas de los mensajeros eucariotes, es decir, después del codón de terminación (en este caso TAA), se encontró una región que no se traduce la cual contiene 2 posibles señales de poliadenilación y un poli A.

#### *Cn121*

La secuencia de la clona Cn121 (416 pb) muestra una región hacia el extremo 5', que no correspondería a la de un péptido señal típico. Además, en la región que correspondería al amino terminal, presenta una secuencia que codificaría para 7 aminoácidos altamente conservados en las toxinas bloqueadoras de canales de sodio. Como contraste, a partir del final de esta región y hasta la secuencia que correspondería a la Cys 25, este ADNc presenta una zona de alrededor de 60 pb que no codificaría para ninguna región de alguna toxina conocida. A partir de la Cys 25 hacia el extremo 3', la secuencia es similar a la de la clona Cn111 y a los ADNc de otras toxinas conocidas, entre ellas, la toxina II-9.2.2. (ver comparación, figura 11).

Esta clona fue aislada usando como sonda el inserto de la 111, por lo que se esperaba, por una parte, que tuviese un gran parecido con ella. Por otra parte, como también ya se mencionó, como la Cn111 muestra un gran parecido con la variante 3 de *Centruroides sculpturatus*, se usó como sonda para tratar de encontrar esta toxina u otra similar en *Centruroides noxius*. Los fundamentos para esta búsqueda particular fueron dos: a) por un lado era teóricamente viable encontrar la toxina variante 3 o una semejante de *Centruroides sculpturatus* en *Centruroides noxius* debido a la cercanía geográfica y filogenética de estas dos especies (ver sección 2.2) y b) había un gran interés del grupo por encontrar esta toxina o una similar, para aprovechar el complejo estudio de cristalografía que realizó Fontecilla y colaboradores para determinar la estructura tridimensional de la variante 3, la cual es una de las dos únicas que se conocen (ver sección 2.5.2).

Los resultados de la secuencia de esta clona mostraron su correspondiente poli A en su extremo 3', y a diferencias de las otras clonas, se tiene una clara región hidrofóbica correspondiente al péptido señal. Además este ADNc tiene un tamaño de 368 pb que es un tamaño similar a los otros ADNc de toxinas de alacrán reportados (Fontecilla Camps *et al*, 1989), por lo que está dentro de lo esperado para un precursor completo de una toxina funcional. Mas aún, tal y como se esperaba, la secuencia de C2 es muy semejante a la de la var 3, existiendo solo 6 diferencias en la secuencia total de aminoácidos (ver figura 12).

Podemos decir, como resumen de estos antecedentes, que al comenzar los trabajos de esta tesis, ya se había determinado la secuencia de aminoácidos de varias toxinas del alacrán *C. noxius*, entre ellas la toxina II-9.2.2. Así mismo en nuestro grupo de trabajo, se contaba con un banco de ADNc de *C. noxius* y se había determinado la secuencia nucleotídica del ADNc de dos clonas, una completa (Cn121) y otra incompleta (Cn111). Posteriormente, en otros trabajos del grupo, se determinó la secuencia completa de la clona C<sub>2</sub>.

Cn121      KEGYLVSNSRNYLLGSSLCIRYRSLGFFPIAGNRYLQPVLLGKNQG  
 II-9.2.2   KEGYLV-D-KN--TG---C-KYECL-----KLGDNDY

Cn121      CDNECKAKNQGSYGYCYAFACWCEGLPESAPTYPLPNKSCS  
 II.9.2.2   CLRECKQOGYKGAGGYCYAFACWTHLYEQAIPWPLPNKRCS

**FIGURA II.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos (deducida de la de nucleótidos) de la Cn121, con la secuencia de la toxina II-9.2.2. Se muestran subrayados los aminoácidos comunes entre las dos secuencias y se marca un espacio en los aminoácidos no presentes en la toxina II-9.2.2, en relación con la Cn121. Obsérvese que hay 21 aminoácidos (63 pb) menos en la secuencia de la toxina II-9.2.2.



#### 4.- OBJETIVO

*Implementación de un método general para la caracterización de los genes que codifican para las toxinas del veneno del alacrán Centruroides noxius Hoffmann, tomando como modelo el ADNc de la clona Cn121.*

#### 5.-HIPOTESIS

*Dado que se tiene la secuencia nucleotídica del ADNc de la clona Cn121, el cual fue generado a partir de un ARNm relacionado con el que codifica para la toxina II-9.2.2; si se usa esta secuencia como sonda podremos buscar en el genoma del alacrán la región que codifica para el gen que transcribe el ARNm de la Cn 121 y posiblemente los genes de otras toxinas relacionadas entre ellas la de la II.9.2.2.*

## 6.-MATERIAL Y METODOS.

### 6.1.- EXTRACCION DEL ADN GENOMICO.

El primer paso metodológico a seguir para cumplir el objetivo de mi tesis, consistió en la extracción del ADN genómico del alacrán.

El compromiso en este caso era tanto de orden cuantitativo como cualitativo. Cuantitativo porque se necesitaba sacar un buen rendimiento para obtener el ADN suficiente para futuros experimentos y cualitativo porque este ADN debería de salir lo más íntegro posible (sin estar degradado) y además debería de estar lo suficientemente limpio para permitir ser digerido posteriormente con enzimas de restricción.

El procedimiento experimental fue el siguiente:

- 1).- Se Preparó la solución de extracción de ADN genómico:  
0.1 M EDTA (Etilendinitrilotetracetato disodico), 0.05M de Tris (Trihidroximetilaminometano) pH 8.0, conteniendo 0.5% SDS (Dodecilsulfato de sodio) y 100 µg/ml de proteinasa K.
- 2).- Se tomaron 3 tubos para centrifuga (volumen 30 ml) y a cada uno se le agregó 25 ml de la solución de extracción de ADN genómico.
- 3).- Los alacranes vivos fueron congelados en nitrógeno líquido y se mantuvieron a baja temperatura.
- 4).- En un mortero se molieron 3 grs de alacranes enteros, los cuales se pulverizaron lo más finamente posible y se agregaron por partes equivalentes a los 3 tubos que contenían la solución de extracción de ADN genómico.
- 5).- Se pusieron a incubar los tubos a 55°C con agitación durante 4 hrs.
- 6).- Se Centrifugó a 8 000 rpm a 4°C durante 30 minutos (rotor JM 13).
- 7).- Al centrifugado se le extrajo una capa de lípidos que se formó en la superficie y el sobrenadante se pasó a otros 3 tubos (de 30 ml de volumen).
- 8).- A cada tubo, en relación al sobrenadante extraído, se le agregó un volumen de fenol (aprox. 20 ml) y se agitó durante 15 min.
- 9).- Se volvió a centrifugar a 8 000 rpm a 20°C durante 15 minutos.

- 10).- Se decantó el sobrenadante y se repitió la extracción con fenol 2 veces más ( se pueden dar mas extracciones según se juzgue conveniente en base a la capa blancuzca de desechos que va quedando en la interfase).
- 11).- Se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 1/10 de Acetato de sodio pH 5.2.
- 12).- Finalmente, se resuspendió el ADN precipitado en 1.5 ml de TE (Tris-EDTA).

En experimentos con estas condiciones, se varió la cantidad de gramos de cuerpo alacrán usados en la extracción (2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 grs) con el fin de establecer la relación adecuada de gramos de alacrán en la mezcla de extracción.

## 6.2.- PURIFICACION Y DIGESTION DEL ADN GENOMICO

### PURIFICACION

Puesto que después de la extracción del ADN genómico este presentó el pegado de un pigmento, se procedió a purificarlo con un procedimiento cromatográfico. Se utilizó una columna de agarosa para filtración molecular pretendiendo así separar el ADN del colorante mediante sus diferencias en el peso. De esta manera se esperaba saldrían primero las moléculas mas grandes y pesadas como el ADN y se retrasarían las mas pequeñas y menos pesadas como sería el colorante.

Para estos experimentos se utilizó una columna de 28 cm de altura, 1 cm de diámetro y 10 ml de capacidad, la cual se empaco con Bio-Gel A-50m malla 100-200 (Bio Rad Richmond Calif.) y se equilibró con 5 volúmenes del buffer agarosa A 50 que contiene: Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM y NaCl .5M. Se cargó la columna con una muestra de aproximadamente 100 µg de ADN en un volumen de 300 µl y se colectó el eluado en alícuotas de 500µl.

En estos experimentos se varió además la cantidad de NaCl en el buffer de equilibrio (0.3 M, 0.5 M y 0.75 M.) Se esperaba que al aumentar la fuerza ionica del buffer hubiese menos atracción electrostatica entre el colorante y el ADN.

Después de la purificación en columna se dio un tratamiento de limpieza adicional con un volumen de fenol-cloroforno isoamilico ( 2 veces) y finalmente con un volumen de cloróformo.

### CUANTIFICACION DEL ADN Y VALORACION DE PUREZA .

Se utilizaron 3 diferentes procedimientos: examen electroforético espectrofotometrico y biológico.

### Examen espectrofotométrico

Puesto que el pico máximo de absorbancia de los ácidos nucleicos es a 260 nm, y para la mayoría de las proteínas es de 280 nm, la relación de las lecturas de una muestra de ADN a éstas longitudes de onda nos indica la proporción en que una muestra de ADN esta asociada con proteínas (Sambrook *et al*, 1989).

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- 1).- Se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l de la solución del ADN y se le agregó 995  $\mu$ l de agua destilada.
- 2).- Se tomó la lectura de la densidad óptica a 260 y 280 nm.
- 3).- Se determinó la concentración del ADN con la lectura de su densidad óptica a 260nm, tomando en cuenta la relación de que 1 unidad de densidad óptica es igual a 50 $\mu$ g/ $\mu$ l de ADN.

1 U. D.O -----	50	g/	1	ADN
X fracción de D.O-----	X	g/	1	ADN

Una vez obtenido este valor, se divide entre los  $\mu$ l que se tom aron de la solución de ADN (en este caso 5) para obtener la concentración de ADN por  $\mu$ l de ADN de la solución. Finalmente se multiplica por los  $\mu$ l totales de la solución para obtener la concentración total de ADN por muestra.

- 4) Una medida de la pureza del ADN con respecto a las proteínas, se obtiene con la relación de las lecturas a 260nm/280nm. La relación ideal corresponde al valor de 2, pero en la práctica con un ADN genómico sin una purificación exhaustiva, el valor de esta relación puede ser menor.

### Examen electroforético

Dado a que la cuantificación del ADN por espectrofotometría no es del todo exacta debido a que además se cuantifica ARN, también cuantificamos y evaluamos pureza de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La muestra se diluye en alícuotas de varias proporciones que se corren junto con un ADN patrón de concentración conocida en un gel de agarosa y se tiñen con bromuro de etidio. El gel teñido se ve con una lámpara de luz ultravioleta la cual hace fluorecer a las moléculas de ADN.

La concentración se evalúa en base a lo amplio y fluorescente de las bandas de ADN en relación al patrón; en tanto que lo definido de la banda, nos proporciona información acerca de lo puro que puede estar un ADN.

## Examen biológico

Este se realizó con enzimas de restricción. El hecho de que las enzimas corten bien un ADN es indicativo de que éste presenta un aceptable grado de limpieza. Este examen del ADN es el que más importancia reviste para nuestro interés.

### DIGESTIONES.

Una vez ya con el ADN genómico limpio, se procedió a su digestión con diferentes enzimas de restricción. Se utilizaron las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *Hind III*, solas y en combinación, poniéndose en cada ensayo de digestión alrededor de 10 µg de ADN. Para las digestiones con *EcoRI* se utilizó el buffer H y para las demás digestiones el buffer B de la compañía Boehringer (Alemania).

Se prepararon las digestiones según la fórmula general de la siguiente mezcla de reacción:

7 µl agua  
10 µl sol. ADN (aprox. 10µg)  
2 µl buffer H ó B  
1 µl enzima. 10 unidades (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI/Bam/Hi*, *Eco/HindIII*,  
*HindIII/BamHI*)

-----  
20µl total se probaron tiempos de incubación desde 8-48 hrs.

### 6.3.- SOUTHERN BLOT

Este proceso es llamada así en honor de E.M. Southern quién desarrolló inicialmente esta técnica (Southern, 1975). Consta de 4 pasos principales: corrimiento electroforético, transferencia, hibridación, y autorradiografía.

#### CORRIMIENTO ELECTROFORETICO

Para lograr mayor separación de los fragmentos de ADN digeridos se aplicó un gel de agarosa blando (.7%) largo (25 cm. de longitud) y a poca velocidad de corrimiento (50- 60 V).

#### TRANSFERENCIA

Para efectuar la hibridación de un ADN, antes es necesario desnaturalizarlo, para que las cadenas sencillas puedan hibridar con la sonda. Además puesto que la hibridación no la realizamos directamente en el gel, fue necesario transferirlo a un soporte fijo y flexible como una membrana de nitrocelulosa o nylon.

A continuación se describe el procedimiento descrito por Denise Pollard-Knight (1990) con el que obtuvimos mejores resultados:

- 1) Después de la electroforesis, sumergir el gel (basta con que se cubra) en la solución de despurinación (250 mM HCl) en un recipiente adecuado y agitar

por 15 minutos. El colorante azul de bromofenol con el que se corrió la muestra se torna amarillo en este paso.

- 2) Lavar 3 veces con agua destilada.
- 3) Agregar al recipiente con el gel la solución de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) y agitar hasta que el colorante de bromofenol se haya tornado de nuevo a color azul(en aproximadamente 5 minutos), y entonces agitar por 15 minutos más.
- 4) Lavar 3 veces con agua destilada.
- 5) Agregar la solución de neutralización ( 1.5 M NaCl,0.5 M tris HCl pH 7.5) hasta cubrir el gel. Agitar por 15 minutos.
- 6) Reemplazar la solución de neutralización y agregar nuevamente solución fresca. Agitar por 15 minutos.
- 7) Enjuagar con SSC 20X (0.3 M Citrato de sodio, NaCl 3.0 M).
- 8) En un recipiente rectangular de unos 15 cm de ancho, 25 cm de largo y 4 cm de alto; agregar aproximadamente 500 ml de SSC 20X. Colocar un vidrio u otro objeto de superficie plana a manera de plataforma de soporte sobre el recipiente.
- 9) Cortar dos rectángulos de papel filtro (por ejemplo de Watman 3 MM) y uno de la membrana de nitrocelulosa o nylon del tamaño de las medidas del gel.
- 10) La membrana debe dejarse saturar en la solución SSC 20X por lo menos 10 minutos. Los filtros se humedecen en la misma solución.
- 11) Colocar sobre la tira de papel filtro los anteriores elementos en el siguiente orden: una pieza de papel filtro, gel, membrana, la otra pieza de papel filtro. Durante este procedimiento se debe cuidar no dejar burbujas entre una y otra capa.
- 12) Poner sobre el último filtro, una pila de unos 15 cm de papel absorbente y colocar un objeto pesado sobre ella.
- 13) Dejar por lo menos durante 4 hrs. Durante este tiempo el ADN desnaturalizado pasa por capilaridad hacia la membrana en la cual se retiene.
- 14) después de la transferencia teñir el gel con bromuro de etidio y observarlo con luz ultravioleta (UV) para verificar que la transferencia se llevó a cabo.

- 15) Finalmente, se fija covalentemente el ADN sobre la membrana utilizando horneado con vacío a 85°C durante 2 hrs o de preferencia fijado en un horno de luz UV durante 24 segundos para nitrocelulosa o 12 segundos para nylon. En el caso de la fijación con luz UV, se debe de humedecer ligeramente la membrana colocándola en un filtro mojado con SSC 20X y colocar hacia arriba el lado de la membrana que estuvo en contacto con el gel.

## HIBRIDACION

El ADN desnaturalizado es puesto a hibridar con la sonda detectora la cual es marcada radiactivamente. En nuestros experimentos se utilizó como templado ADN genómico y como sonda detectora el ADNc de la clona Cn121. Este procedimiento, a la vez lo podemos dividir en los siguientes pasos: marcaje de sonda, prehibridación e hibridación.

### Marcaje radiactivo

Para el marcaje radiactivo utilizamos dos técnicas, Nick traslation o traslape de muesca y *Random primer extension* o extension por pegado al azar de oligonucleótidos (primers).

En la primera técnica se aprovecha la capacidad de la ADN polimerasa I de *E. coli* para eliminar nucleótidos del extremo 5'-P, y reemplazarlos por nucleótidos radiactivos en el extremo 3'-OH de una mella o muesca hecha previamente por una ADNasa en el ADN templado de la soda.

La técnica del *Random primer extension* fue la que mejor resultado nos dio y por lo tanto la que más utilizamos. Su principio se basa en el pegado al azar de una mezcla de oligonucleotidos de 6 bases (hexameros) al ADN templado de la sonda. La enzima Klenow toma como *primer* a estos hexameros y va incorporando desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) en la cadena complementaria del templado. De estos dNTPs la desoxicitocina trifosfatada (dCTP) está marcada radiactivamente con P<sup>32</sup>. En nuestros experimentos usamos los reactivos de la compañía Dupond (Boston Ma.). La formula general de la mezcla de reacción es la siguiente:

Agua.....	2	μl	
ADN* (sonda) .....	5	μl	(30 ng)
Buffer.....	4	μl	
Mezcla nucleótidos.....	4	μl	
-dCTP <sup>32</sup> P.....	4	μl	(40 μC)
Klenow.....	1	μl	
	20	μl	total.

\* Es muy importante hervir el ADN para desnaturalizarlo y conservarlo en hielo hasta que se le agrega la enzima.

Se incuba esta mezcla de reacción a temperatura ambiente 3 hrs-8hrs. Se para la reacción agregando 4 µl de EDTA .25 M .

### *Prehibridación*

Este procedimiento es para bloquear sitios inespecíficos con ADN heterologo (Denhardt, D.T., 1966). El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- 1) Se mete la membrana con el ADN fijado en una bolsa de plástico y se sella.
- 2) Se hace un corte en una de las esquinas de la bolsa y se introduce suficiente solución SSC 6X para lavar la membrana.
- 3) Se tira la solución de SSC 6X y se introduce por el mismo orificio la solución de hibridación, que se preparó según la formula:

Denhardt's*	.....	5X
SSC	.....	5X
ADN TTS**	.....	100 µg/ml
formamida	.....	50%

\* Polivinilpirrolidona, ficol y albumina 2% c/u = Denhardt's 100X

\*\* ADN de timo de ternera sonicado.

La prehibridación se deja por lo menos 2 hr. En nuestro caso se dejó de 2-8 hrs. a 42°C.

### *Hibridación*

Se saca la solución de prehibridación de la bolsa y se le agrega la de hibridación que a su vez tiene la formula: (Denhardt, D.T., 1966)

Denhardt's	.....	1X
SSC	.....	5X
SDS	.....	0.1 %
DNA TTS	.....	100 µg/ml
Formamida	.....	50%

La hibridación se puede dejar por lo menos durante 2 hrs. Nosotros realizamos las hibridaciones por lo menos durante 4 hrs a 42°C.

Después de la hibridación se lavan las membranas con la solución de lavado ( SSC 6x, 1% SDS y 10%  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ). En esta lavada se variaron tanto la temperatura (de temperatura ambiente a 65°C), como la concentración de sal (de SSC 6x se bajo hasta SSC 1x).

#### *Autorradiografía*

La membrana que se lavó es puesta en un casete con una película sensible a una temperatura de - 70°C por un tiempo que varia principalmente en base a la cantidad de marca radiactividad detectada después de los lavados. Finalmente, la película sensible es revelada, obteniendo de esta manera un negativo que nos muestra si hay hibridación, donde la hubo y con que grado de homología de la sonda con respecto al ADN templado.

#### **6.4.- EXPERIMENTOS CON PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)**

Este método resultó de enorme utilidad para la realización de nuestros objetivos. De manera general, la amplificación de un determinado ADN blanco se realiza en tres tiempos. Estos tiempos se repiten en varios ciclos, lográndose en cada uno de ellos una amplificación exponencial de la secuencia blanco (ver esquema en siguiente página).

**TIEMPO 1.-** Desnaturalización. Se somete el ADN a altas temperaturas para abrir la cadena duplex.

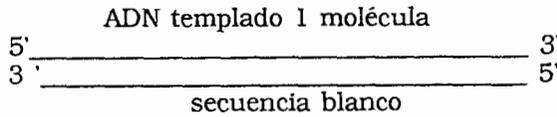
En nuestros experimentos, la temperatura en esta fase fue de 92°C -93°C y el tiempo de 1 a 1.30 min. Ambas variantes dependen de que tan complejamente este estructurado el ADN templado que se utilice.

**TIEMPO 2.-** Alineamiento. Dos oligonucleótidos, cada uno específico de la secuencia blanco, se alinean a estas regiones en las cadenas separadas.

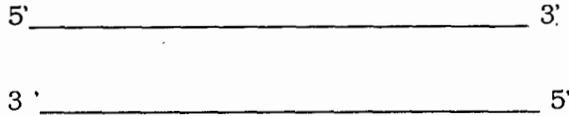
La temperatura en esta fase depende principalmente de la  $T_m$  (temperatura media de fusión) de los oligonucleótidos utilizados y de la especificidad que se requiera en cada experimento. Nosotros utilizamos desde 50°C a 60°C y tiempos de 1-1.30 min.

**TIEMPO 3.-** Extensión. Una enzima termoestable como puede ser la Taq o Vent ADN polimerasas (esta última con actividad correctora exonucleasa 3'-5') toman a los oligonucleótidos como primers y los extienden tomando como templado a la secuencia blanco.

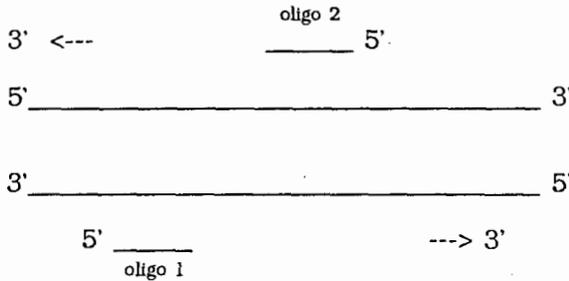
En esta fase utilizamos en todos los experimentos 70°C y un tiempo de 3 min.



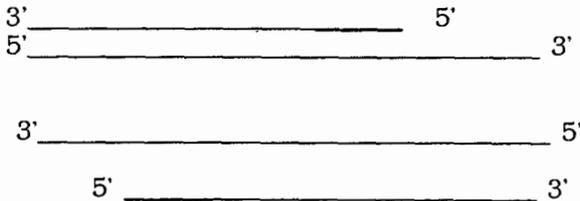
**ciclo 1. tiempo 1. Desnaturalización.**



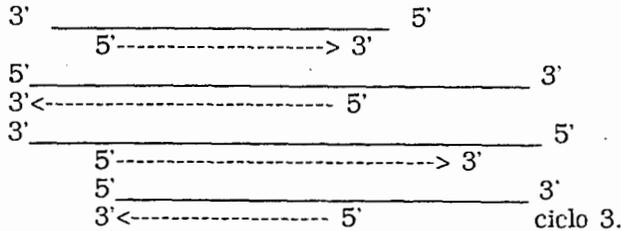
**tiempo 2. Alineamiento**



**tiempo 3. Extensión**



**ciclo 1. producto: 2 moléculas de ADN blanco copiadas.**



**ciclo 2. producto: 4 moléculas de ADN blanco copiadas**

ciclo 3.

A continuación, presento las estrategias y condiciones particulares de los diferentes PCRs realizados en los cuales se utilizaron reactivos de la compañía Perkin Elmer Cetus (Norwalk CT).

### 1) PCR PARA AMPLIFICAR LA REGION GENOMICA CORRESPONDIENTE AL ADNc DE LA CLONA 121 (PCRs N-C GENOMICO)

En base a la secuencia conocida del ADNc del ARN de la clona Cn121, nos propusimos buscar y amplificar la región genómica que la transcribe. Para ello diseñamos dos oligonucleótidos que denominamos C (carboxilo) y N (amino) por corresponder a los extremos del ARN que codificarían para regiones situados en estos extremos en un polipéptido. En la figura 13, se muestran la secuencia de estos oligonucleótidos y la región a la cual corresponden dentro del ADNc de la Cn121.

Los experimentos realizados para obtener la región genómica de la Cn121 (PCRs N-C GENOMICO) se realizaron en dos grupos. En un grupo se manejó como variante la cantidad de ADN templado (PCR N-C GENOMICO 50) y en el otro la temperatura de alineación de los oligonucleótidos (PCR N-C GENOMICO 55).

#### A) PCR N-C GENOMICO 50.

En este PCR inicial para tratar de amplificar la región genómica de la Cn 121, se utilizó como variante la cantidad de ADN templado. Se puso en un caso .5 µg y en otro 10 veces mas (5 µg). A continuación se presenta el protocolo seguido.

1) Primeramente se calculó la  $T_m$  para los oligonucleótidos para poder determinar la temperatura de alineación que podíamos emplear mediante la formula:

$T_m = 81.5 - 16.6 \log (M) + 0.41 (\% \text{ G-C}) - 500/n$  (Sambrook *et al.*, 1989).  
Molecular Cloning: a laboratory

Donde: 81.5, 16.6 y 0.41 son constantes.

M = La molaridad de las sales del Buffer (para el buffer Perkin Elmer Cetus = 0.05 M)

(% G-C) = Porcentaje de guaninas y citocinas en el oligo.

n = Tamaño de la sonda.

El cálculo de la  $T_m$  para el oligo N fue de 50°C y para el C de 52°C.

Extremo 5' = 45 pb

Lys Glu Gly Tyr Leu Val Ser Asn Ser Arg Asn Tyr Leu Leu Gly<sup>32</sup>  
AAA GAA GGT TAT CTG GTA AGC

46

66

Ser Ser Leu Cys Ile Arg Tyr Arg Ser Leu Gly Phe Phe Pro Ile<sup>135</sup>

Ala Gly Asn Arg Tyr Leu Gln Pro Val Leu Leu Gli Lys Asn Gln<sup>160</sup>

Gly Cys Asp Asn Glu Cys Lys Ala Lys Asn Gln Gly Gly Ser Tyr<sup>225</sup>

Gly Tir Cys Tyr Ala Phe Ala Cys Trp Cys Glu Gly Leu Pro Glu<sup>270</sup>

Ser Ala Pro Thr Tyr Pro Leu Pro Asn Lys Ser Cys Ser Lys Lys<sup>315</sup>

TAA TGGCAACGAG TGTTTATTGT CTACCAACAG AAATATTGTA ACGCTTCTTA <sup>366</sup>

257

ATTGCAGTT Extremo 3' = 39 pb tamaño total ADNc = 416 pb.

377

K E G Y L V S

Lys Glu Gly Tyr Leu Val Ser

AAA GAA GGT TAT CTG GTA AGC OLIGO N (directo)

AAC TGC AAT TAA GAA GCG TTA OLIGO C (inverso)

**FIGURA # 13.-** Diseño de los oligonucleótidos C y N (21 meros) utilizados para la amplificación de la región genómica del ADNc de la clona Cn121. Se muestra la secuencia de aminoácidos (inferida de la de nucleótidos, aún no publicada) de la zona que correspondería a la región codificadora del ADNc de la clona Cn121. La región correspondiente al extremo 5'es de 45 pb y la del extremo 3' de 39 pb (no mostradas). La secuencia nucleotídica de la región que correspondería al amino terminal utilizada para el diseño del oligonucleótido N y la secuencia correspondiente al oligonucleótido C, hacia el extremo 3', se muestran remarcadas y doblemente subrayadas. El oligonucleótido N, abarca de la posición 46-66; el oligonucleótido C inverso, de la 357-377. El tamaño total del ADNc es de 416 pb; mientras que la región que abarca desde el inicio del oligo N al final del C, es de 332 pb.

## 2) Se preparó las mezclas de reacción para los dos PCR

Mezcla de reacción I		Volumen
Concentración		
Agua .....	68.0 $\mu$ l	
Buffer de reacción (10X) .....	10.0 $\mu$ l	
Mezcla dNTP .....	16.0 $\mu$ l ..	1.25 mM c/u
Oligo N .....	1.5 $\mu$ l ..	225 ng
Oligo C .....	1.5 $\mu$ l ..	225 ng
ADN templado genómico* .....	2.0 $\mu$ l ..	500 ng
Taq polimerasa .....	1.0 $\mu$ l ..	5 U
	-----	
	100 $\mu$ l	

\*En la mezcla de reacción II solo se modifica la cantidad de ADN genómico a 5  $\mu$ g.

## 3) Se corrió el PCR con las siguientes condiciones:

Tiempo 1.- Desnaturalización. 92°C. 1 minuto.

Tiempo 2.- Alineamiento. 50°C. 1.30 minutos.

Tiempo 3.- Extensión. 70°C. 3 minutos.

En los demás experimentos, las mezclas de reacción solo varían en las concentraciones de oligonucleótidos y ADN templados. En las condiciones de corrido, se conservan igual los tiempos 1 y 3; mientras que en el alineamiento, el tiempo pasa en todos a 1 minuto y varía la temperatura.

## B) PCR N-C GENOMICO 55

En este experimento se realizó con 5  $\mu$ g de ADN templado y se varió la temperatura de alineación de 50°C del experimento anterior, a 55°C.

## 2) PCR PARA AMPLIFICAR EL ADNc DE LA CLONA Cn121 (PCR N-C BANCO)

Este experimento se realizó con dos propósitos principales. Por una parte se quiso amplificar la misma región que se amplificó en el ADN genómico para ver la diferencias que pudieran existir entre el ARN mensajero y la región genómica de la Cn121. De esta manera, se podría encontrar información sobre la posible existencia de intrones dentro de la versión genómica. Por otro lado, como se uso un oligo (N) que tiene una región altamente conservada, se podrían amplificar los ADNc de otros genes parecidos que tuvieran los mismos extremos que la Cn121 o, versiones que pudieran existir de la misma Cn121 en diferentes etapas de procesamiento. Se utilizaron 210 ng de ADN del banco y se corrió el PCR con 50°C de temperatura de alineación. Las demás condiciones se conservaron igual que en los anteriores experimentos. La estrategia y modelo predictivo de este PCR se muestra en la figura 21 (página 62).

## 7.-RESULTADOS

### 7.1.- EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ADN GENOMICO

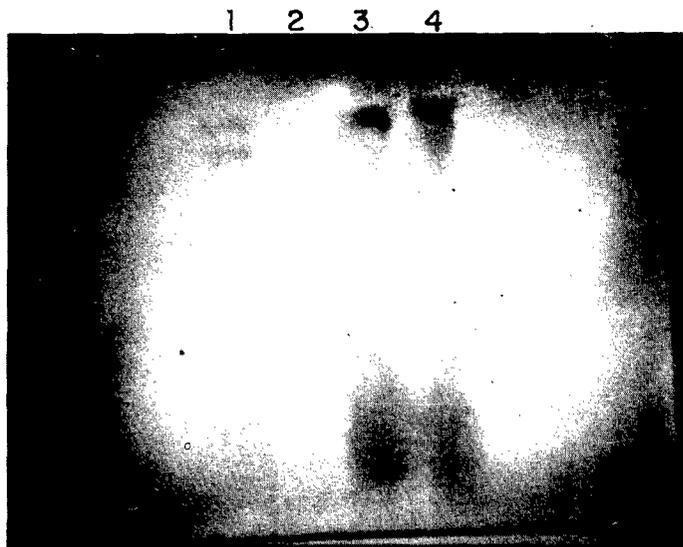
Se realizaron varios experimentos según el protocolo descrito con 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 g de alacrán. Se observó que el ADN estaba integro en 2.5 y 5 grs. En cambio con 7.5 y 10 grs se observó que el ADN se degradaba. (ver figura 14)

El ADN así extraído mostró un anormal color rojizo y no se logró digerir. Esta coloración es al parecer causada por un carbohidrato de la cutícula de alacrán de bajo peso molecular y positivamente cargado, el cual al interaccionar fuertemente con el ADN, impide el acceso de las enzimas de restricción. Después de realizarle repetidas extracciones fenol-cloroformo sin lograr quitarle este pigmento rojizo, se decidió utilizar una columna de agarosa para filtración molecular; pretendiendo así separar el ADN del pigmento mediante sus diferencias en el peso. De esta manera, se esperaba saldrían primero las moléculas mas grandes y pesadas como el ADN y se retrasarían las mas pequeñas y menos pesadas como el colorante.

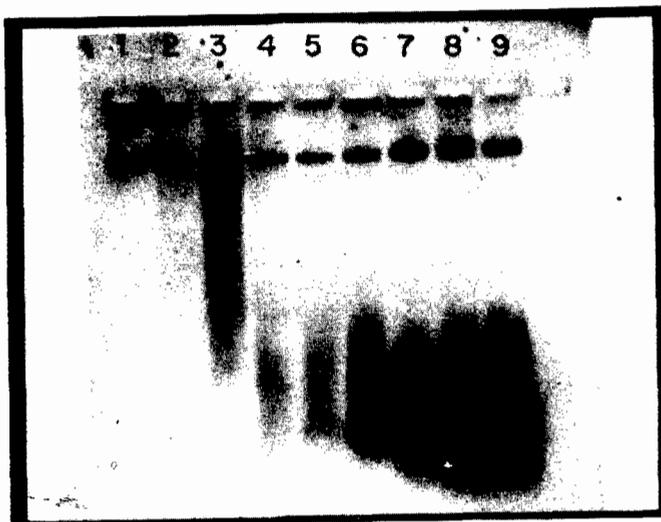
Al realizar este experimento, se colectaron fracciones de 500  $\mu$ l. Los ácidos nucleicos, salieron desde la alícuota 7 hasta la 10, es decir, a partir de 3.5 hasta 5 ml de buffer eluido. El colorante empezó a salir a partir de la fracción 15 (a los 7 ml de buffer eluido). Mediante el examen electroforético se comprobó que en la muestra 7 se encontraba exclusivamente ADN, y en la 8 y la 9 aparecía y se incrementaba respectivamente, la presencia de ARN. El rendimiento promedio obtenido fue de alrededor de 30  $\mu$ g de ADN genómico limpio por gramo de cuerpo de alacrán.

Se observó un mayor incremento en el rendimiento de ADN en los experimentos en los cuales se incrementó la concentración de NaCl a 0.75 M con respecto de .5 M del buffer normal.

La pureza de este ADN se corroboró tanto por un examen electroforético, en donde se muestra una banda definida de alto peso molecular (ver figura 15), como por su digestión con enzimas de restricción. La relación de densidad óptica del ADN genómico pasado por la columna a las lecturas de 260/280 nm fue de 1.4, este valor lo podemos considerar como aceptable considerando que se trata de ADN genómico de eucariote, sin una purificación exhaustiva.



**FIGURA # 14.- ADN genómico del alacrán *C. noxius* extraído de diferentes cantidades de cuerpo de alacrán. Se emplearon en todos los ensayos cantidades semejantes de la mezcla de extracción (descrita en el texto). En el carril 1, con 2.5 g; en el carril 2, 5.0 g; en el carril 3, 7.5 g y en el carril 4, 10.0 g. Obsérvese en los carriles 1 y 2 el ADN íntegro en forma de una banda definida en la parte superior y en los carriles 3 y 4 el ADN degradado en forma de un barrido a lo largo del carril. El ADN genómico no degradado, debido a su unión a un pigmento, no fue capaz de ser digerido con enzimas de restricción.**



**FIGURA # 15.-** Fracciones de una alícuota de 10  $\mu\text{g}$  ADN genómico pasada a través de una columna de agarosa para filtración molecular para separar el ADN del pigmento (condiciones descritas en el texto). Se colectaron 14 fracciones de 500  $\mu\text{l}$ , en las primeras 6 fracciones colectadas no aparecen ácidos nucleicos. En el carril 1, se observa la muestra correspondiente a la fracción 7, en donde aparecen los ácidos nucleicos de más alto peso molecular. En esta alícuota y en la 8 (carril 2) solo está presente el ADN genómico más íntegro, el cual se observa como una banda definida en la parte superior. En el carril 3, como contraste, se observa una muestra de ADN genómico que resultó degradado. Del carril 3- 8, se presentan las correspondientes alícuotas 9-14. Notese como a partir de la alícuota 9 (carril 3) aparece y se incrementa la cantidad de ARN, el cual aparece en forma de una mancha en la parte inferior de los carriles. Este ADN genómico purificado fue capaz de ser digerido con diferentes enzimas de restricción.

## 7.2.-DIGESTIONES DEL ADN GENOMICO

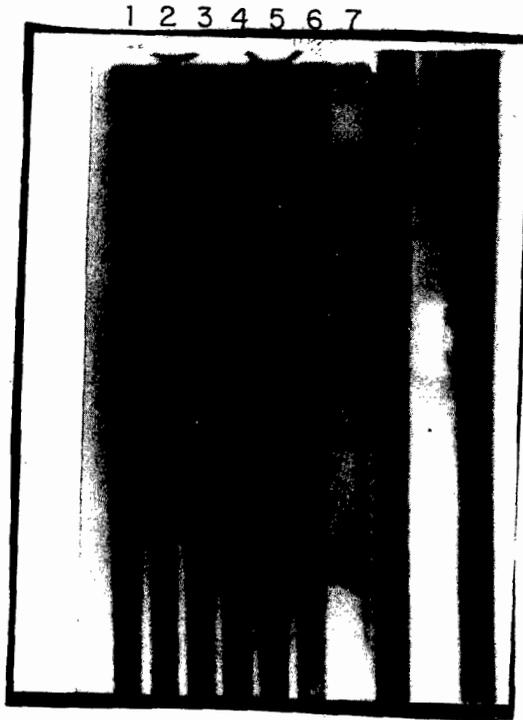
EL ADN genómico pasado por la columna demostró digerirse en una forma satisfactoria en 24 hrs de incubación con todas las enzimas probadas (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI/BamHI* y *EcoRI/HindIII*) Ver figura 16.

## 7.3.- SOUTHERN ADN GENOMICO DIGERIDO.

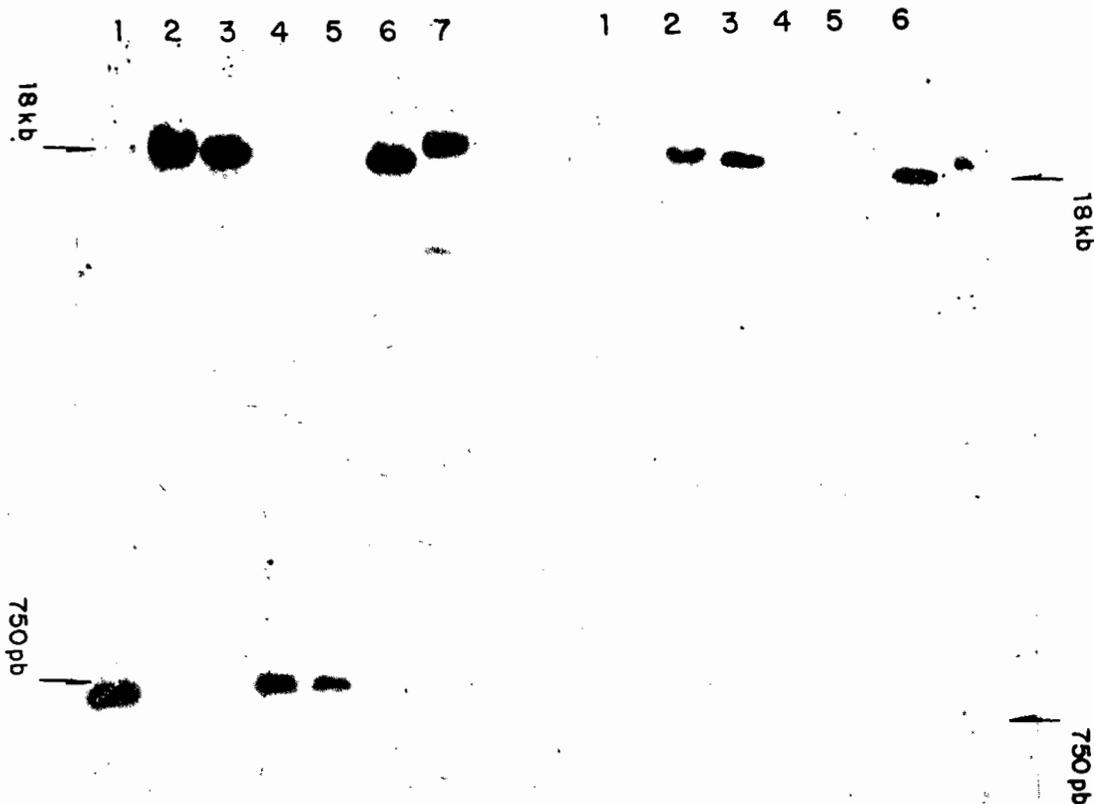
Las autorradiografías realizadas con la hibridación de la clona Cn121 con el ADN genómico, con el fin de obtener alguna información acerca del tamaño y número probable de copias del gen de la Cn121, dieron los siguientes resultados:

Cuando la membrana hibridada se lava a temperatura ambiente durante 10 minutos (SSC 6X, formamida 50%), en la digestión con *EcoRI* se observa una banda fuertemente marcada de aproximadamente 750 pb y otra más tenue de alrededor de 18 kb. En cambio, en las digestiones con *BamHI* y *HindIII* se nota una banda muy marcada de 18 kb, pero no la de 750 pb. En las digestiones combinadas *EcoRI/BamHI*, *EcoRI/HindIII*, se observa que se conserva la banda de alrededor de 750 pb y desaparece la banda de 18 kb. Además en estas digestiones se observan cuando menos 2 bandas más tenues entre los 15 y 17 kb (ver figura # 17A ).

Por otro lado, se observó que si a esta membrana se le da un lavado incrementando la temperatura a 55°C, las bandas tenues continúan, pero si se llega a 65°C, estas bandas desaparecen y solo queda en *EcoRI*, *EcoRI/BamHI* y *EcoRI/HindIII* la banda de alrededor de 750 pb y en *BamHI* y *HindIII* la banda de aproximadamente 18 kb (ver figura 17B).



**FIGURA # 16** .- Digestiones totales de ADN genómico del alacrán *C. noxius*. En cada muestra se digirieron 10  $\mu$ g de ADN genómico con 10 unidades de enzima. En el carril 1, se muestra la digestión con la enzima *EcoRI*; en el carril 2, *BamHI*; carril 3, *HindIII*; carril 4, *EcoRI/BamHI*; en el carril 5, *EcoRI/HindIII*; en el carril 6, *BamHI/HindIII* y en el carril 7, el marcador de peso molecular lambda *HindIII/EcoRI*.



**FIGURA 17A - Southern.** Autorradiografía de la hibridación del ADN genómico digerido, con la sonda del ADNc de la clona Cn 121. La hibridación se realizó a una temperatura de 42°C durante 8 horas, mientras que el lavado se llevo a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos. En el carril 1, se muestra la digestión con la enzima *EcoRI*; en el carril 2, *BamHI*; carril 3, *HindIII*; carril 4, *EcoRI/BamHI*; en el carril 5, *EcoRI/HindIII*; en el carril 6, *BamHI/HindIII* y en el carril 7, el marcador de peso molecular lambda *HindIII/EcoRI*.

**FIGURA 17B.-** Autorradiografía de la misma membrana hibridada presentada en 17A. El lavado de la membrana fue realizado en condiciones de mayor astringencia (65°C durante 10 minutos). Ver interpretación en el texto.

## 7.4.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

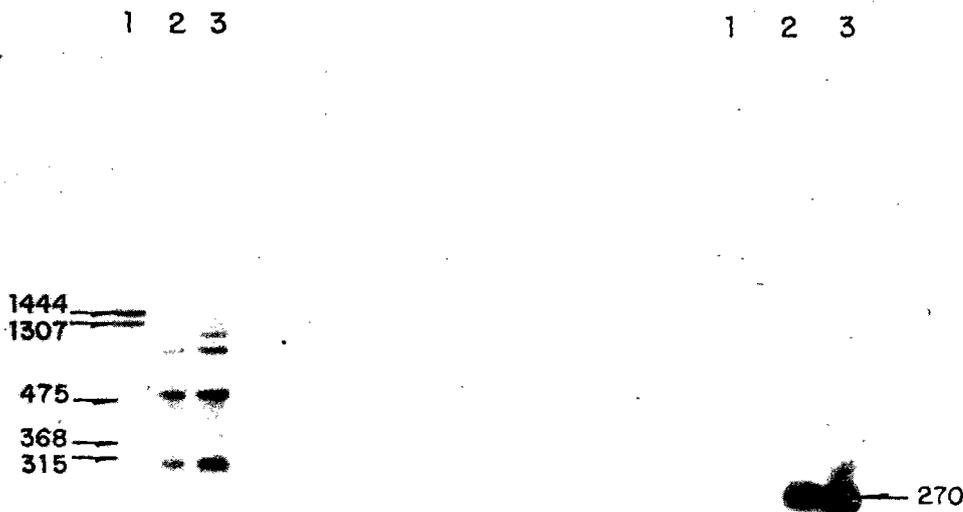
### A) PCR N-C GENOMICO 50

Para determinar el efecto de la concentración de templado, se realizaron dos ensayos con diferentes concentraciones de ADN genómico sin digerir (0.5 y 5  $\mu\text{g}$ ). La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando como *primers* los oligonucleótidos N y C.

Los resultados muestran, en ambos casos (ver figura 18A), la amplificación de fragmentos (visualizados en bandas en el gel) que abarcan desde los 270 a los 1400 pb. De éstas bandas, la de menor tamaño (de alrededor de 270 pb), es la que se encuentra en mayor concentración. Resulta además claramente notoria, una mayor concentración de los fragmentos amplificados en el PCR realizado con 5  $\mu\text{g}$  de templado (aproximadamente 14  $\mu\text{g}$  de producto total), en relación con el que se realizó con 0.5  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{g}$  de producto total).

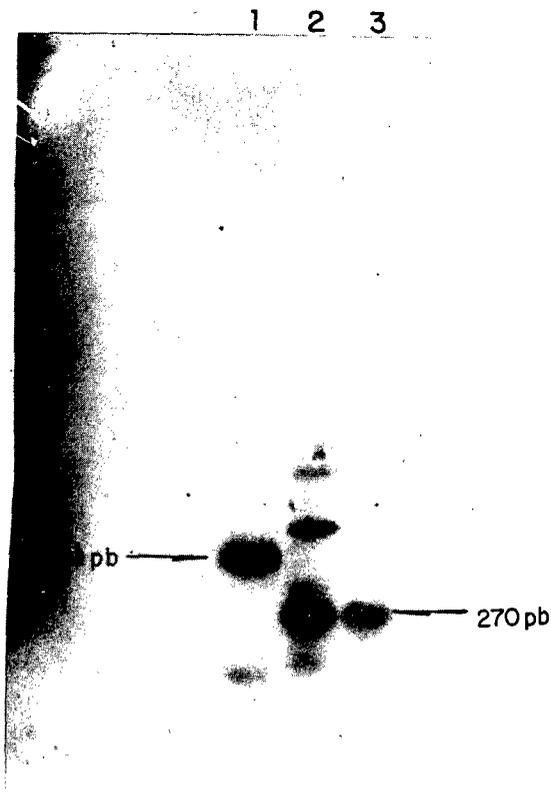
La hibridación realizada a los productos de estos PCR usando como sonda el ADNc de la clona Cn121 muestra (ver figura 18B), que a alta astringencia (lavado 10 minutos 50°C, SSC 6X, 50% formamida), solo hibridan la banda de alrededor de 270 pb y otra mas de 330 pb. Estos resultados parecen indicar que solo los fragmentos genómicos amplificados que aparecen en estas dos bandas, son los que comparten mayor homología con el ADNc de la Cn121 y que los demás fragmentos presentes en las bandas de mayor tamaño, fueron amplificados inespecíficamente o comparten poca homología con el ADNc de la Cn121.

En otros experimentos de PCR realizados con estas mismas condiciones, pero tomando como templado ADN genómico digerido (*EcoRI*), se demostró que se amplifican menos fragmentos de forma inespecífica, en relación a cuando se toma como templado ADN genómico sin digerir (Figura 19).



**FIGURA 18A.- PCR N-C GENOMICO 50.** PCR realizado con los oligonucleótidos N y C a 50°C de alineamiento. Se tomó como variable la concentración de templado, realizándose dos ensayos con 0.5 y 5 µg de ADN genómico sin digerir. En el carril 1, se observa el marcador pBR 322 *TaqI*; en los carriles 2 y 3 se presentan los productos de la amplificación (5 de 100 µl) con 0.5 y 5 µg de ADN genómico respectivamente. Nótese como se observa una mayor amplificación de las bandas en el ensayo con 5 µg de ADN genómico, en relación con el que se realizó con 0.5 µg. Obsérvese que la banda de menor tamaño (alrededor de 270 pb), es la de mayor concentración.

**FIGURA 18B.- Southern** realizado con los productos del PCR N-C GENOMICO 50. El gel se transfirió, hibridó (utilizando como sonda del ADNc Cn121) y se lavó a alta astringencia (10 minutos, 50°C, SSC 6X, 50% formamida). En el carril 1, no se observa que hibrida el marcador pBR 322 *TaqI*; en los carriles 2 y 3, se observa que hibridan específicamente con la sonda las 2 primeras bandas de alrededor de 270 y 330 pb.



**FIGURA 19.-** Efecto del empleo de ADN genómico digerido como templado en la amplificación de bandas por PCR. En el carril 1, se observa un fragmento de PCR de 500 pb usado como control y como marcador de peso molecular. En el carril 2, se muestra 5 de 100  $\mu$ l del volumen del PCR realizado con 5  $\mu$ g de ADN genómico digerido. En el carril 3, como comparación, se muestra el producto del PCR N-C GENOMICO 55 (mostrado en la figura 20, carril 3). Nótese que en este PCR se amplifican menos bandas inespecíficas que cuando se utiliza ADN genómico sin digerir.

## B) PCR GENOMICO N-C 55

En esta amplificación se tomó como variable la temperatura de alineación de los oligonucleótidos, pasando de 50°C del PCR N-C GENOMICO 50, a 55°C en este experimento. Se conservó, al igual que el experimento anterior, la cantidad de ADN genómico templado; realizando un ensayo con 0.5 µg y otro con 5 µg de ADN genómico sin digerir. La temperatura de alineamiento en que se realizó este PCR fue cercana a la Tm de los oligonucleótidos, por lo que se esperaba incrementar la especificidad de la amplificación.

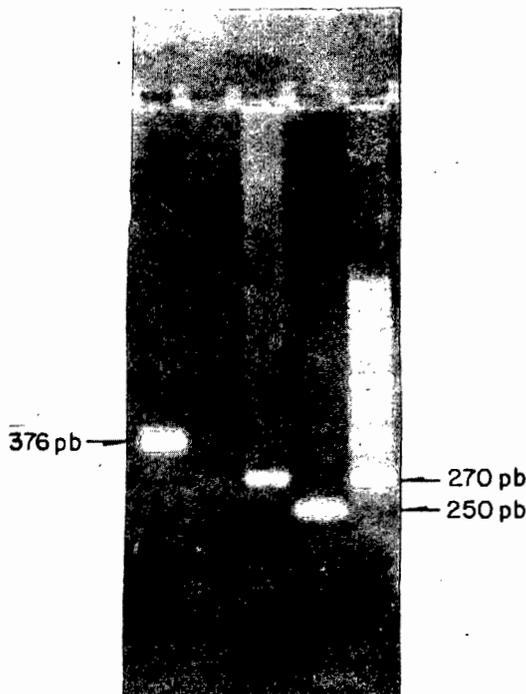
En este PCR se obtuvo como resultado la amplificación de una sola banda visible de alrededor de 270 pb la cual corresponde con el tamaño de la banda de mayor concentración del PCR realizado a 50°C. Con mas claridad en el experimento anterior, resulto notorio que la amplificación realizada con 5 µg de ADN genómico sin digerir, es apreciablemente mayor, en relación con la que se realizó con 0.5 µg (ver Figura 20). De esta manera, en el ensayo con 0.5 µg de ADN genómico templado sin digerir, se obtuvieron alrededor de 0.15 µg del producto específico amplificado, en tanto que con 5 µg se obtienen cerca de 1.5 µg. Por lo tanto, resulta evidente, que aunque a esta temperatura de alineamiento se amplifican más específicamente las regiones genómicas de mayor homología con el ADNc de la clona Cn121, también se obtiene menos producto amplificado.

Una alícuota (10 de 100 µl) del PCR realizado con 5 µg de templado, se reamplificó con una temperatura de alineamiento de 50°C. En esta reamplificación, se logró observar además de la banda de 270 pb, una banda mas tenue de alrededor de 330 pb. El producto total de este PCR fue superior a 10 µg, por lo que se mostró, que si bien en un PCR realizado a 55°C se obtiene un producto específico, pero en poca concentración; si se realiza una reamplificación a 50°C, se puede obtener una concentración varias veces mayor ( de 1.5 µg a 10 µg).

Es importante señalar, que los fragmentos genómicos de esta banda de alrededor de 330 pb, corresponden en tamaño a la región del ADNc de la clona Cn121 que comprende desde las secuencias de los oligonucleótidos N al C (ver figura 13 y 21 y 22A). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la banda de 330 pb parece ser la versión genómica del ADNc de la Cn121, la cual cuando menos en esta región amplificada, tendría un tamaño similar a su transcrito.

La mayor intensidad de la banda de 270 pb se puede explicar asumiendo la existencia de varias versiones de genes que comparten las secuencias de los oligos N y C y un tamaño similar. Estos genes tendrían, entre las secuencias de ambos oligonucleótidos, alrededor de 60 pb menos que el ADNc de la clona Cn121. Así mismo, estos genes (como lo demuestran las autorradiografías), tendrían en esta zona una región de apreciable homología con el ADNc de la Cn121.

1 2 3 4 5



**FIGURA 20.- PCR N-C GENOMICO 55.-** Efecto de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos sobre la especificidad y cantidad del producto amplificado. Experimento realizado con los oligos N y C utilizando como templado ADN genómico sin digerir. En este PCR la temperatura de alineamiento de los oligos fue de 55°C, a diferencia del PCR N-C GENOMICO 50, en el cual esta temperatura fue de 50°C (figura 18A). En los carriles 1 y 4 se observan dos fragmentos amplificados de PCR usados como marcadores, de 376 y 250 pb respectivamente. En los carriles 2 y 3, se observan 10 de 100  $\mu$ l del volumen total de los ensayos realizados con 0.5  $\mu$ g (carril 2) y 5  $\mu$ g (carril 3) de ADN genómico templado. En el carril 5, se muestra como comparación (control), una alícuota (5 de 100  $\mu$ l) del producto del PCR N-C 50.

Obsérvese las diferencias en la amplificación de bandas entre el PCR C-N GENOMICO 50, en donde se ven múltiples bandas, en contraste con el PCR N-C GENOMICO 55, en donde solo se observa una banda de alrededor de 270 pb. (cuando se reamplifica el producto de este PCR, puede apreciarse una banda más de alrededor de 330 pb. Figura 22A). Puesto que con excepción de las bandas de alrededor de 270 y 330 pb del PCR C-N GENOMICO 50, las demás bandas resultaron inespecíficas (ver figura 18B) y dado que en este PCR realizado a 55°C, solo se amplifican las bandas específicas de 270 y 330 pb (ver figura 22B), es claro el efecto de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos en la especificidad de los productos amplificados. Así mismo, se puede notar que al elevar la temperatura de alineamiento, hay en general una menor concentración de los fragmentos amplificados. En este experimento, fue evidente una mayor concentración de los fragmentos amplificados utilizando 5  $\mu$ g de templado (1.5  $\mu$ g de producto), en relación a cuando se uso 0.5  $\mu$ g (0.15  $\mu$ g de producto).

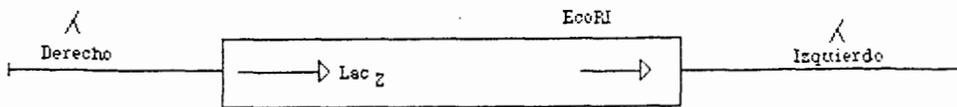
## PCR N-C BANCO

Este PCR se realizó a 50°C de alineamiento, con los mismos oligonucleótidos usados para amplificar la región genómica de la Cn121, pero en vez de usar como templado ADN genómico, se usó el banco de ADNc de *C. noxius*. Con este PCR se pretendía amplificar un fragmento de 332 pb que teóricamente tendría que amplificarse con estos oligos en el ADNc de la Cn121 (ver figura 13 y modelo predictivo en figura 21). De esta forma, al comparar este fragmento con las bandas de alrededor de 270 y 330 pb obtenidos en los anteriores PCRs, se esperaba encontrar información que corroborara los datos obtenidos.

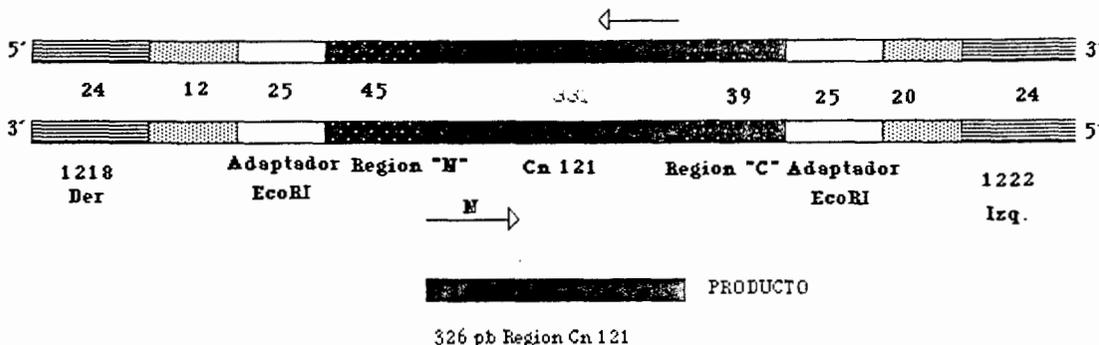
En este PCR se obtuvo como resultado una banda fuertemente amplificada de alrededor de 270 pb y otra mas tenue de alrededor de 330 pb, es decir, se obtuvo un producto similar a el obtenido en la reamplificación del PCR realizado a 55°C de alineamiento (ver figura 20). Por lo tanto, se presume que la banda de alrededor de 330 pb de este PCR corresponde, como se esperaba, a la región amplificada desde las secuencias de los oligo N al C del ADNc de la Cn121. De igual manera, en la banda de mayor concentración de alrededor de 270 pb, al parecer se amplificaron fragmentos de otros ADNc que contienen las secuencias de los oligos N y C, pero tienen alrededor de 60 pb menos que el ADNc de la clona Cn121. Estos fragmentos de ADNc amplificados, corresponden en tamaño e intensidad con las regiones genómicas presentes en la banda de alrededor de 270 pb de los PCR realizados con ADN genómico como templado.

Puesto que los tamaños de las bandas de alrededor de 270 y 330 pb, son similares tanto en los PCRs realizados con ADN genómico de cuerpo de alacrán, como en los realizados con ADNc del banco; se deduce que tanto el gen de la Cn121, como los demás genes amplificados, se transcriben en productos de tamaños similares a sus regiones genómicas y por lo tanto, esto sugiere fuertemente que no existen intrones cuando menos en la región que abarca desde las secuencias de los oligonucleótidos N al C (los cuales comprenden toda la región codificable del gen que expresa a las toxinas maduras).

Hibridaciones realizadas a los productos de este PCR y de los PCR N-C GENOMICO (50 y 55), muestran en ambos casos, que las bandas de alrededor de 270 y 330 pb hibridan fuertemente tanto con la sonda de la clona Cn121, como con la Cn111 (figuras 19B y 21B). En estos experimentos es notorio, que aunque la banda de alrededor de 270 pb se encuentra en una concentración mucho mayor que la de 330 pb; en las autorradiografías se observa que con ésta última se obtiene una señal proporcionalmente mayor. Esto evidencia una mayor homología de la banda de alrededor de 330, con respecto a la de 270, con la clona Cn121 y Cn111.

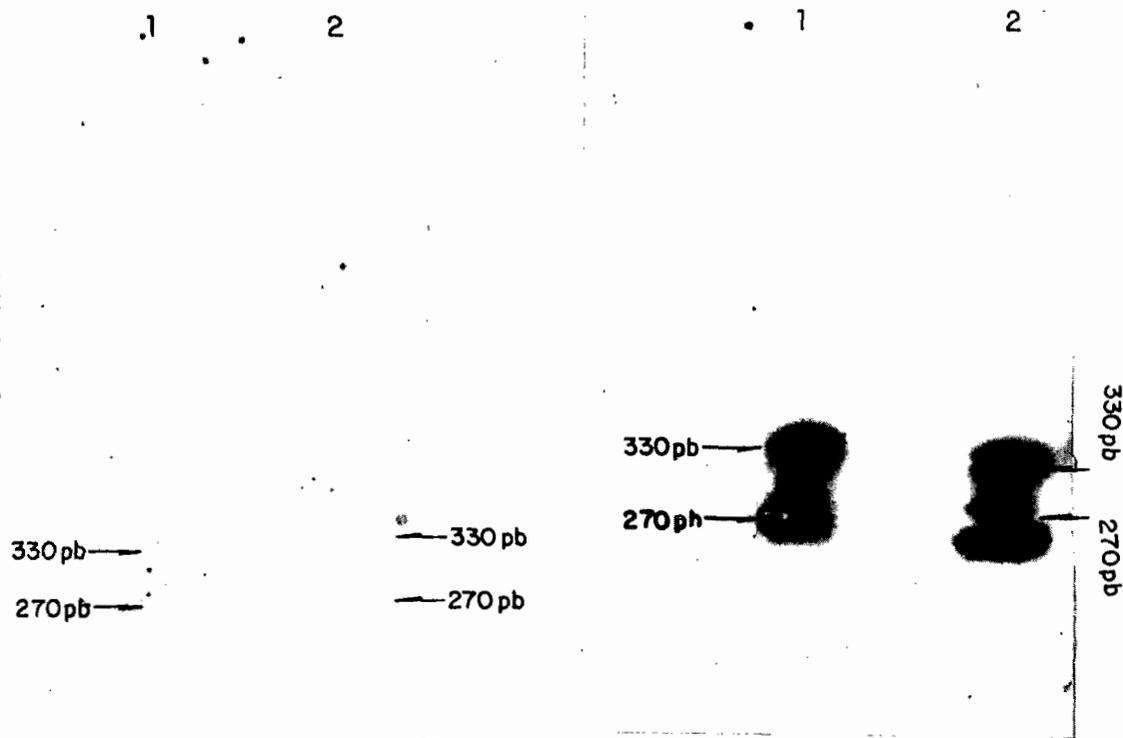


### ORIENTACION EN SENTIDO DE LAC Z



**FIGURA 21.-** Modelo predictivo para el PCR N-C Banco diseñado para amplificar la región que va de la secuencia del oligonucleótido N al C del ADNc de la clona Cn121. En este PCR también se espera que se amplifiquen todas las regiones de los ADNc del banco que contengan las secuencias de los oligonucleótidos N y C. En la parte superior se muestra un esquema de la región del fago lambda g11. Entre los brazos derecho e izquierdo del fago, se encuadra la región que codifica para el gen de la  $\beta$  galactosidasa ( $LacZ$ ), dentro de la secuencia de este gen, se encuentra el sitio de EcoRI en donde se clonaron los insertos de ADNc del banco.

En la parte inferior se presenta un modelo de la región del fago lambda g11 con un inserto clonado (en este caso el ADNc de la clona Cn121). La región oscura de la parte central del esquema representa el inserto clonado; dentro de esta región, las partes con puntos blancos a ambos extremos, simbolizan las regiones que codificarían para las regiones amino (N) y carboxilo (C) de la cadena polipeptídica de una posible toxina. A ambos extremos de la región oscura (inserto), se representa (en blanco) la zona que correspondería a la secuencia del adaptador con un sitio de EcoRI (25 pb). A los extremos del esquema, se representa con rayas las secuencias usadas para el diseño de los oligonucleótidos universales 1218 Derecho y 1222 izquierdo (24 pb) y con puntos, la zona del gen de  $\beta$  galactosidasa (12 pb) que hay entre el adaptador y la secuencia de los oligonucleótidos (estos oligonucleótidos universales se utilizan para amplificar cualquier inserto clonado en el fago lambda g11). Las flechas muestran las secuencias de los oligonucleótidos denominados N y C de 21 pb (que empiezan a partir de los extremos de las regiones N y C, respectivamente) usados para la búsqueda y amplificación del ADNc de la clona Cn121 y genes relacionados. En este PCR se espera amplificar para el ADNc de la Cn 121, un producto de 332 pb, puesto que es esta la distancia comprendida entre las secuencias de ambos oligonucleótidos.



**FIGURA 22A.-** PCR realizado con los oligos N y C utilizando como templado los ADNc del banco de *C. noxius* (PCR N-C BANCO). En este PCR se utilizó una temperatura de alineamiento de 50°C y condiciones similares a los anteriores PCRs. En el carril 1, se observa el producto de una reamplificación del PCR N-C GENOMICO 55; en el carril 2, se muestra el PCR N-C BANCO. Obsérvese como muestran un patrón de bandas similar los PCRs realizados con los oligos N y C, cuando se usa como templado ADN genómico (carril 1) y cuando se utiliza como templado el banco de ADNc (carril 2).

**FIGURA 22B.-** Southern de los productos de PCR presentados en 22A. La hibridación se realizó usando como sonda el ADNc de la clona Cn111. Se muestra que hay hibridación a alta astringencia (10 minutos, 55°C, SSC 6X, 50% formamida) de las dos bandas de alrededor de 270 y 330 de los PCR N-C GENOMICO (carril 1) y PCR N-C BANCO (carril 2).

## 8.-DISCUSION

A continuación se discutirá los resultados de los experimentos realizados:

### Extracción.purificación y digestión del ADN genómico

En la extracción del ADN genómico se experimentó variando la concentración de gramos de alacrán para 30 ml del buffer de extracción que incluía una concentración de proteinasa K de 500 µg/ml. El hecho de que a concentraciones menores de 5 grs de cuerpo de alacrán el ADN mostrara estar integro y a concentraciones mayores a esta cantidad mostrara estar degradado, sugiere que a concentraciones mayores de 5 grs la cantidad de ADNasas presentes en la mezcla de extracción, es mayor que la cantidad de proteinasa K que las degradase; de esta manera, las ADNasas no digeridas serían las causantes de la degradación del ADN.

Durante la purificación del ADN genómico en la columna de agarosa para filtración molecular se observó que a concentraciones de NaCl de 0.75 M el rendimiento del ADN recuperado es mayor que el que se obtiene con la concentración de .5 M del buffer agarosa A 50 del protocolo normal.

El modelo teórico que seguimos para realizar este experimento, el cual a su vez explicaría estos resultados, se basa en la hipótesis de que el pigmento observado que se pega al ADN e impide su digestión, es un carbohidrato de bajo peso molecular y de carga positiva. Este pigmento interactuaría con las cargas negativas del ADN estableciendo una fuerte unión electrostática, lo cual a su vez impediría el acceso de las enzimas de restricción. Si se somete a estas dos moléculas unidas, a la influencia de una alta fuerza iónica, las interacciones electrostáticas bajan y entonces es posible su separación por diferencias en su tamaño y peso molecular. Esto podría explicar porque a una mayor concentración iónica del buffer, resultó una mayor cantidad de ADN limpio recuperado.

### Southern

Los resultados de los Southerns realizados con el ADN genómico digerido con enzimas de restricción como templado y como sonda el ADNc de la clona Cn121, indican que el gen de la Cn121 se encuentra en un fragmento de 18 kb cuando el ADN genómico se digiere con *BamHI* ó *HindIII*. De este fragmento de 18 kb, por cortes internos de *EcoRI*, se libera un fragmento de aproximadamente 750 pb; el cual parece contener, total o en su mayor parte, el gen de la Cn121.

En base a estos datos, podemos sugerir tres hipótesis para intentar explicar la organización genómica del gen de la Cn121, las cuales no pretenden en forma alguna ser conclusivas.

1) El gen de la Cn121 se encontraría incluido dentro del fragmento de 18 kb como se deduce de las digestiones de *Bam*HI y *Hind*III, en donde solo se observa un fragmento principal de 18 kb. Cuando se corta con *Eco*RI, se libera un fragmento interno de 750 pb, como lo sugieren las digestiones combinadas *Eco*RI/*Bam*HI y *Eco*RI/*Hind*III, en donde se observa que se eliminó el fragmento de 18 kb y aparecen la banda de alrededor de 750 pb. Este fragmento de  $\pm$  750 pb contendría el gen de la Cn121 completo, por lo tanto, este gen tendría un tamaño menor a 750 pb. (y un tamaño no menor a 416 pb, ya que es este el tamaño del ARNm). De ser esto cierto, la presencia de la banda tenue de alrededor de 18 kb con *Eco*RI, podría sugerir que la Sonda de la Cn121 hibridó con genes parecidos pero no iguales al gen de la Cn121, lo cual a la vez sería una posible evidencia de la existencia de una familia de genes de toxinas, los cuales se encontrarían en una misma región del genoma y tendrían secuencias muy similares (carril 1, figura 17A).

2) Una segunda posibilidad para tratar de explicar los resultados de estas hibridaciones, parte también de la base de que el gen de la Cn121 se encuentra en el fragmento de 18 kb, y de que de este fragmento de 18 kb se libera con *Eco*RI un fragmento de 750 pb, solo que este no contendría completo al gen de la Cn121 pero sí la mayor parte de él. Esto también podría explicar el hecho de que en las digestiones combinadas *Eco*RI/*Bam*HI y *Eco*RI/*Hind*III, se observe la eliminación de la banda de 18 kb y la aparición de dos bandas tenues por arriba de 15 kb (figura 17A carril 4), junto con la banda fuerte de  $\pm$  750 pb. Las bandas tenues contendrían una parte minoritaria del gen en alguno de sus extremos, lo que va de acuerdo con su poca intensidad mostrada en relación con la banda de  $\pm$  750 pb. En esta hipótesis, el gen de la Cn 121 puede tener un tamaño menor o superior a 750 pb.

Los resultados observados (por el número e intensidad de las bandas de hibridación) en las tres hipótesis nos permiten suponer: 1) la existencia de una sola copia en el genoma del alacrán *Centruroides noxius* para el gen de la Cn121. 2) En el caso de que el gen de la Cn 121 estuviese en varias copias, éstas estarían repetidas una detrás de otra, en unidades regulares (tamdem).

Por otra parte, en experimentos semejantes realizados por el grupo de Pierre E. Bugis y colaboradores (1989) utilizando como sonda el ADNc de la toxina Aa II del alacrán norteafricano *Androctonus australis* Hector, se llega a la conclusión de que el gen de este alacrán tiene un tamaño mínimo de 2800 pb y se presenta en copia única en el genoma del alacrán. Tomando en cuenta la similitud de las diferentes toxinas de alacrán, estos datos podrían favorecer la hipótesis de que el gen de la Cn121 tuviese un tamaño superior a 750 pb.

## PCRs

PCR N-C GENOMICO para la amplificación de la región genómica del ADNc de la clona Cn121.

En este PCR se esperaba, en caso de no haber intrones, amplificar un fragmento del tamaño que correspondería a la región del ADNc de la Cn121 que va del oligo N al C (332 pb). En caso de existir intrones en esta región, se esperaba un tamaño mayor. Los resultados mostraron una banda intensa de alrededor de 270 pb y otra mas tenue de alrededor de 330 pb, cabiendo la posibilidad de que en ambas bandas estén amplificados mas de un fragmento del mismo tamaño o muy similares. Estos resultados sugieren:

1.- La región genómica entre las secuencias de los oligonucleótidos N y C, se transcribe como un producto de tamaño similar al del ADNc de la clona Cn121, lo cual podría ser, en primera instancia, indicativo de que en este gen no se encuentran intrones. Sin embargo, considerando que la Cn121 tiene una secuencia adicional de 63 pb a partir de la secuencia conservada que codificaría para el amino terminal, y que posiblemente esta no sea codificante, no se puede considerar de manera estricta que en la región genómica amplificada de este gen no existan intrones, aunque se transcriba en un ADNc de tamaño similar.

2.- Los Southern en los cuales se hibridó el producto de este PCR con el inserto de la clona Cn121, demuestran que las dos bandas amplificadas son homólogas con la Cn121. Esto corrobora la afirmación de que se logró amplificar específicamente la región genómica de este gen.

3.- La banda intensa de 270 pb puede corresponder a la amplificación de varios genes de tamaño igual o muy semejante (diferentes al de la Cn121). Esto explicaría la diferencia tan grande en la amplificación de una banda con respecto a la otra.

4.- Si bien el ADNc de la clona Cn121 tiene un tamaño de 332 pb entre las secuencias de los oligonucleótidos N y C, la mayoría de los ADNc reportados tienen alrededor de 265 pb en esta misma región, es decir, alrededor de 60 pb menos que la Cn121. De esta manera, al parecer la banda de alrededor de 270 pb observada en estos PCRs corresponde a las regiones genómicas de genes que comparten las secuencias de los oligonucleótidos N y C, pero tienen alrededor de 60 pb menos que la Cn121 en esta región.

PCR N-C BANCO para amplificar la región del ADNc de la Cn121 que va del oligo C al N.

En este PCR se esperaba amplificar un fragmento de 332 pb que es el que correspondería por secuencia desde la región que codifica al oligo N al C. Los resultados de este PCR muestran una banda intensa de alrededor de 270 pb y otra banda mas tenue de alrededor de 330 pb, es decir, presenta un patrón similar al observado en la amplificación de la región genómica con estos mismos oligonucleótidos.

El análisis de estos resultados nos permite sugerir las siguientes hipótesis para tratar de explicar estos resultados.

- 1.- El hecho de que con los mismos oligonucleótidos se amplifique una banda similar al PCR genómico de alrededor de 330 pb, corrobora la idea de que se amplificó en el PCR N-C GENOMICO la región genómica de la Cn121.
- 2.- Como en el PCR N-C GENOMICO, en este PCR también se amplificó una banda intensa de alrededor de 270 pb. Esta banda puede corresponder a fragmentos amplificados de los ADNc de toxinas codificadas por los genes amplificados en el PCR N-C GENOMICO.
- 3.- Dado que en este PCR realizado con el banco de ADNc se amplifican las dos bandas de alrededor de 330 y 270 pb obtenidas en el PCR realizado con ADN genómico, es evidente que las regiones genómicas de ambos grupos de genes se transcriben en ADNc de tamaños similares.
- 4.- Por lo tanto, dado que el ADNc de la clona Cn121, tiene a partir de la secuencia que correspondería al amino terminal, alrededor de 60 pb más que otros ADNc conocidos de toxinas bloqueadoras de canales de sodio y puesto que son alrededor de 60 pb las que hay de diferencia entre las dos bandas amplificadas (270 y 330 pb), al parecer en la banda de 270 pb de este PCR, se encuentran las versiones de ADNc transcritos de los genes que codifican para la mayoría de las toxinas bloqueadoras de canales de sodio. Además, puesto que las versiones genómicas y de ADNc son de tamaño similar, al parecer no se encuentran intrones en estos genes, cuando menos en las regiones que comprenden desde las secuencias de los oligonucleótidos N al C, es decir, la zona que comprende toda la región codificante.

Las respuestas conclusivas para resolver todas las hipótesis planteadas en esta discusión, probablemente serán dadas al determinarse la secuencia nucleotídica de estos fragmentos amplificados. Los experimentos realizados durante estos PCR, sientan las bases para su determinación en próximos experimentos.

## **9.-CONCLUSIONES.**

**Las conclusiones de esta tesis las podemos enumerar de la siguiente manera:**

**1).- Se montó una metodología para la extracción y purificación del ADN genómico de alacrán. Durante estos experimentos resultó claro que en la extracción del ADN genómico es importante establecer una relación adecuada entre las ADNasas presentes en los tejido y la concentración de proteasas en la mezcla de extracción. Así mismo, en los ensayos de digestión se encontró que el ADN genómico de alacrán no se puede digerir directamente después de la extracción por la presencia de un pigmento fuertemente unido a el ADN. Este pigmento puede ser separado del ADN por una columna de filtración molecular. Durante la purificación del ADN por esta columna, se determinó la importancia que tiene para la separación del ADN y el colorante la fuerza iónica del buffer de elución.**

**2) Los southern realizados para caracterizar la región genómica del gen Cn121 sugieren que este gen se encuentra casi, o totalmente incluido, dentro de un fragmento de alrededor 750 pb.**

**3).- Por experimentos de PCR, se logró amplificar la región genómica que codifica para el transcrito de la Cn121. Estos experimentos sugieren, que el gen de la Cn121 al parecer se encuentra en copia unica en el genóma del alacrán *C. noxius*.**

**4).- Se amplificaron las regiones genómicas y sus transcritos de ADNc, de genes que tienen a partir de la secuencia que codificaría para su extremo amino terminal, alrededor de 60 pb menos que el gen de la Cn 121. Entre estos genes, probablemente se encuentran la mayoría de los que codifican para toxinas bloqueadoras de canales de sodio. Además, puesto que el tamaño de la región genómica amplificada es similar al del ADNc, al parecer estos genes no tienen intrones cuando menos en sus regiones codificantes.**

**5) Finalmente, los datos obtenidos sugieren que los genes que codifican para las toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de sodio forman una familia multigénica.**

## 10.-BIBLIOGRAFIA

- Babin**, D.R., D.D.Watt, S.M.Goos and R.V. Meejnec (1974). Amino acid sequences of neurotoxin protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. Arch. Biochem. Biophys. 164, 694-706.
- Balozet**, L. (1971). Scorpionism in the old word. In *Venomous Animals and Their venoms*, Vol. III, W. Bucherl and E. E. Buckley (Eds) Academic Press, New York, pp. 349-371.
- Baumann**, A., Grupe A., Ackermann A. & Pongs O. (1988). Structure of the voltage-dependent potassium channel is highly conserved from *Drosophyla* to vertebrate central nervous systems. The Embo Journal Vol.7, No. 8: 2457-2463.
- Bucherl**, W. (1978). Venoms of Titynae A. Systematics, Distribution Biology, Venomous apparatus, etc. of *Titynae* Venom Collection Toxicity Human accidents and Treatment of Stings. In S. Bettini (Ed.), *Arthropod Venoms*, Spriger Verlag, Berlin, pp. 371-379.
- Bougis**, P.E. Rochat, H. and Smith L.A. (1989a). Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. J. Biol.Chem. 264: 19259-19265.
- Bougis**, P.E.; H.Rochat, and Smith L.A (1989b). Scorpion venom neurotoxins: cloning and expression. In *Natural Toxins*. Pergamon press. Edited by Charlotte L. Ownby. Great Britain. PP.94-101.
- Caterall**, W.A.; 1986. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. Annu. Rev. Biochem., 55, 953-985.
- Carbone**, E.; Pestipino, G.; Wanke, E.; Possani, L.d. & Maelicke A. (1982). Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. Nature. 296: 9091.
- Couraud** ,F., & Jover E.,(1984) in *Handbook of Natural Toxins* (Tu, A.T.,Ed.) Vol.2, pp 659-678, Marcel Dekker, New York.
- Denhardt**, D. T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23: 641.
- Dent**, M.A.; Possani, L.D.; Ramirez, G.M. and Fletcher Jr, P.L. (1980). *Toxicon* vol. 18 pp 343-350. Pergamon Press LTD 1980, England.
- Diaz Najera**, A (1964) Alacranes de la republica Mexicana: Identificación de ejemplares colectados en 235 localidades. Rev. Inst. Salubr. Enfer. trop.

(Mex) XXIV: 15-30.

- El Ayeb, M.** and H. Rochat.(1985). Polymorphism and quantitative variations of toxins in the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Toxicon*, 23, 755-760.
- Ennik, F.** (1972). A short review of scorpion biology, management of stings and control. *California Vector Views*. 19: 69-80.
- Ewing, H. E.**(1928). The scorpions of the western part of the United States with notes on those occurring in northern Mexico. *Proc. U.S.*, 73: 1-24.
- Fontecilla-Camps, J.C.**, Almassy, R.J. Suddath, F.L., Watt, D.D. & Bugg, Ch.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.
- Fontecilla-Camps, J.C.**; Habersetzer-Rochat C. & Rochat H. (1988). Orthorhombic cristal and tree-dimensional structure of the poten toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:7443-7447.
- Freire-Maia, L.** and Campos J.A. (1989). Pathophysiology and Treatment of scorpion poisoning. In *Natural Toxins*. Pergamon press. Edited by Charlotte L. Ownby. Great Britain. PP. 139-159.
- Goyffon, M.**, Chovet, G. Deloince , R. and Vachon, M. (1971). Etude du caryotypes de quelques scorpion Buthides. *Arachnologorum Congressus Internationales V*, 23-27.
- Goyffon , M.**, and Kovoov J. (1978). Chactoid venoms. In *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 48, *Arthropod Venoms*, S. Bettini (Ed.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 395-418.
- Granier, C.**; J. Novotny; J. C. Fontecilla-Camps; P. Fourquet; M. El Ayeb; E. Bahraovi. (1989). The antigenic structure of a scorpion toxin. *Mol. Immunol.* 26(6):503-13.
- Gurrola, G.B.**; R. Molinar-Rode; M. Sitges; A. Bayon and L.D. Possani (1989). Sintetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this K<sup>+</sup> chanel blocker is located on its amino-terminal portion. *J. Neural Transm.* 77:11-20.
- Hoffmann, C.C.** (1932). *Monografías para la Entomología Médica de México.*

Monografía Num. 2. Los Escorpiones de México. Segunda parte. Buthidae  
An. Inst. Biol. 3: 243361.

- Hagag**, M., Tu, A. T., and 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.
- Hassan**, F. (1984). Production of scorpion antivenin. In A. Tu (Ed.) Handbook of Natural Toxin, vol. 2, Marcel Dekker, New York, pp. 577-605.
- Jover**, E., Martin-Moutat, Courard F. and Rochat, A. (1980) Biochemistry 19, 463-467.
- Keegan**, H.L. (1980). Scorpions of Medical Importance. University Press of Missisipi.
- Kopeyan**, C. ; G. Martinez; S. Lissitzky; F. Miranda and H. Rochat. (1974). Disulfure Bonds of toxin II of scorpion *Androctonus australis* Hector. Eur. J. Biochem., 47, 483-489.
- **Koppenhofer**, E. and H. Schmidt (1968). Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. Experientia (Basel), 24, 41-42.
- Lester**, D.; P. Lazarovici; M. Pelhate and E. Zlotkin. (1982). Purification, characterization and action of two insect toxins from the venom of scorpion *Buthacus judaicus*. Biochem Biophys. Acta, 701, 370381.
- Lazarovicini**, P., Yanai, P., Pelhate, M., and Zlotkin, E. (1982a). Insect toxic components from the venom of a chactoid scorpion, *Scorpio maurus palmatus* (scorpionidae). J. Biol. Chem. 257:8397-8404.
- Magalhaes**, O. C. (1946). Escorpionismo. IV Memoria Monografias Inst. Oswaldo Cruz. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, pp 1-220.
- Mazzotti**, L. and A. Bravo Becherelle. (1961). Escorpionismo en la Republica Mexicana. Revista del Inst. Salud Enfermedades Tropicales 21, 3-19.
- Meves**, Simard, M., and Watt, D. 1989. Tetrodotoxin Saxitoxin and the Molecular Biology of the Sodium Channel. Ed. N.Y. Acad. Sci. Vol. 479. pp 113-132.
- Miranda**, F.; C. Kopeyan; H. Rochat; C. Rochat and S. Lissitzky. 1970. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis* Hector,

*Buthus occitanustunetanus*, *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* Eur. J. Biochem. 16, 514-523.

- Muma**, M. H. (1967) Scorpions, Whip Scorpions and Wind Scorpions of Florida. Volume 4 in the series Arthropods of Florida. Florida Dept of Agriculture pp. 1-28.
- Narahashi**, T.B., I. Shapiro, T. Deguchi, M. Scuka and C.M. Wang (1972). Effects of scorpion venom on squid axon membranes. Am. J. Physiol., 222, 850-857.
- Park**, C., Hausdorff, S., and Miller C. Design, synthesis, and functional expression of a gene for charybdotoxin, a peptide blocker of K<sup>+</sup> channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 88, pp. 2046-2050.
- Pollar Knigh**, D. 1990. Current methods in nonradioactive acid labeling and detection. Techniques vol 2, No 3 pp 113-132.
- Possani** L. D., Dent, R.A., Martin M. B. Maelicke, A. and Svendsen I.B. (1981a). The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the mexican scorpion *Centruroides noxius* Hofman. Carlsberg Res. Commun. 46, 207-214.
- Possani** L.D., Martin, M.B., Svendsen I.B. (1982). The primary structure of Noxiustoxin: A K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Carlsberg res, Commun. 47, 285-289.
- Possani**, L. D. (1984). Structure of scorpion toxin. In A. Tu (Ed.), Handbook of Natural Toxins, vol.2 Marcel Dekker, New York pp 513 -550.
- Rochat**, H.; P. Bernard and F. Coraud. (1979). Scorpion toxin: chemistry and mode of action. In B. Ceccarelli and F. Clementi (Ed.), Advances in Cito-pharmacology, vol 3, Raven, New York, pp. 325-334.
- Rusell**, F. E. (1967). Comparative Pharmacology of some animal toxins. Fed. Proc., 26, 1206-1224.
- Sambrook**, J, Fritsch E., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.
- Sampieri**, F. And Habersetzer-Rochat, C. (1978). Biochim. Biophys. Acta 535, 100-109.
- Shulov**, A, (1955). On the poison scorpion in Israel. Harefuah 49: 1-3.

- Sampieri, F.** And Habersetzer-Rochat, C. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 535, 100-109.
- Shulov, A.** (1955). On the poison scorpion in Israel. *Harefuah* 49: 1-3.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stahnke, H. L.** (1956). *Scorpions. Revised edition. Poisonous Animals Research Laboratory Arizona State College. Tempe Arizona* pp 36.
- Waterman, J. A.** 1957. Some notes on scorpion poisoning in Trinidad. - *Caribbean Med. J.*,19, 113-128.
- Whittemore, F.W.** and Keegan, H. L. (1963). Medically important scorpions in the Pacific area. In *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region. A collection of papers based on a symposium in the public health and medical science division at the Tenth Pacific Science Congress.* H. L. Keegan and W. V. Macfarlane, eds. Pergamon Press New York, pp. 107-109.
- Zotkin, E.;** H. Rochat; C. Kopeyan; F. Miranda; and S. Lissizki. 1971. Purification and properties of the insect toxin from venom of scorpion *Androctonus australis* Hector. *Biochimie*, 53, 1073-1078.