

El estudio de los componentes del veneno de alacranes en el contexto de la biología molecular, la farmacología y la medicina

Lourival Domingos Possani Postay

El estudio de los venenos de alacranes en mi laboratorio se puede describir como una hélice ascendiente de diámetro paulatinamente aumentado y siempre tangencial a problemas de frontera que tienen a ver con aspectos biológicos y/o médicos.

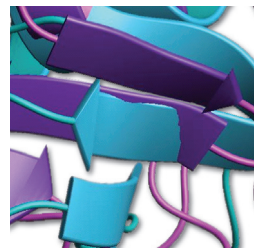
El empuje inicial de este trabajo no tuvo el alacranismo como asunto de investigación, más bien una pregunta biológica relevante: ¿cómo se da la comunicación entre células excitables que dependen de un neurotransmisor químico? Se trató nada menos que del aislamiento y caracterización del primer receptor proteínico de membrana relacionado con la neuroquímica de la comunicación celular: el receptor a la acetil-colina (Klett *et al.*, 1973). Este trabajo se realizó en la Universidad Rockefeller durante mi estancia posdoctoral, pero sentó las bases para la dirección de la investigación que seguí y que implementé gracias a la ayuda y colaboración decidida y fundamental del grupo que formamos primeramente en el Instituto de Fisiología Celular, después en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y durante los últimos 21 años aquí, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

El uso de una toxina del veneno de serpiente fue el ligando natural utilizado para la puri-

ficación del receptor a acetil-colina, y sirvió de modelo para el estudio de otros ligandos naturales que también interfieren con la comunicación celular. En México, el problema de la alta incidencia del piquete de alacrán, fenómeno conocido por el nombre de alacranismo, fue suficiente para sugerir que los estudios de la bioquímica y de la biología molecular del veneno de estos arácnidos probablemente podrían fungir como un modelo adecuado a seguir. El asunto tenía dos vertientes principales: por un lado, podría ayudar a resolver el problema de salud pública que el alacranismo representa en México, y en segundo plano, podría contribuir al entendimiento del mecanismo molecular involucrado en el proceso de desregulación de la comunicación celular que puede causar la muerte de los individuos picados.

¿Qué sustancias presentes en el veneno son responsables del mal funcionamiento de las células neuronales y musculares? ¿Cuáles son los blancos moleculares de los efectores o ligandos naturales presentes en la ponzoña del alacrán? ¿Qué se puede hacer para contrarrestar su efecto?

La investigación llevada a cabo en estos 32 años transitó por una hélice ascendiente que partió de preguntas sencillas que involucraron



inicialmente la obtención del veneno, la purificación de las toxinas (todas de naturaleza proteínica), la determinación de su estructura primaria, la identificación de los blancos moleculares de acción, la determinación de la estructura tridimensional de las toxinas y la identificación de las superficies de contacto con los receptores (mayormente canales iónicos), la síntesis química de las toxinas, la clonación de los genes que las codifican, los aspectos médicos relacionados con la aplicación de estos conocimientos y, finalmente, ahora regresa a preguntas biológicas relacionadas con la comunicación de las células, en donde los ligandos naturales y sus receptores primarios hacen contacto con segundos mensajeros, con otras proteínas y con componentes celulares diversos que son, en última instancia, los responsables de los síntomas de envenenamiento; en un concepto: la biología de sistemas de la intoxicación causada por las toxinas del alacrán. En los incisos siguientes haré un reporte resumido de los principales hallazgos de nuestro grupo, que sin duda alguna sentó precedente en la literatura mundial sobre el asunto y nos hizo conocidos en México y en el exterior; por esto considero que se hizo, y se está haciendo, biología de frontera.

El alacranismo en México

La incidencia del alacranismo en la República Mexicana es uno de los problemas de salud pública importantes del país. Ocurren por lo menos 250 000 casos de accidentes por año que requieren un esfuerzo y gran inversión del sistema de Salud Pública, tanto en atención médica (utilización de anti-venenos) como en la pérdida de muchas horas-hombres laborales debido a estos accidentes. Aunado a esto, está un número todavía grande de pérdidas humanas, estimado en unas 700 muertes anuales en los años setenta y ochenta, y en menos de 70 muertes por año de 2004 a 2006 gracias a la existencia de los anti-venenos. Hay dos compañías que los fabrican (Instituto Bio-

clón S.A. de C.V. y Laboratorios Birmex S.A. de C.V.). Los antivenenos se obtienen de la sangre de caballos hiper-inmunizados con mezclas de veneno de varias especies de alacranes peligrosos de México. Las inmunoglobulinas son separadas de la sangre y sometidas a digestión enzimática para después separar una fracción enriquecida en fragmentos F(ab)₂, libre de otras proteínas séricas. El producto se envasa y se seca al vacío, produciendo un polvo blanco liofilizado que, para su uso, es diluido en solución isotónica. El nombre comercial de uno de los productos es "Alacramyn". La aplicación de este producto en las primeros momentos después de la picadura (primeras dos horas) garantiza un pronóstico cercano al 100% de supervivencia. El número de frascos de antivenenos adquirido anualmente por el Sistema Nacional de Salud Pública es del orden de medio millón (información recabada a través de las unidades de transparencia de las secretarías de salud de doce estados y la empresa paraestatal Birmex).

La biodiversidad de alacranes en México

México cuenta con la mayor cantidad de especies (unas 220) de las 1500 existentes en el mundo. En la UNAM trabajan algunos grupos de investigadores que se ocupan de este asunto, tanto desde el punto de vista taxonómico (Instituto de Biología), como desde el punto de vista de la biología molecular y la bioquímica de los venenos (Instituto de Biotecnología) y del enfoque inmunológico (Instituto de Investigaciones Biomédicas). La trayectoria de estos grupos ha sido reconocida en México y en el extranjero. Felizmente para la salud y los aspectos médicos del alacranismo, sólo siete especies son peligrosas al humano, todas del género centruroides: *C. noxius* (Nayarit), *C. limpidus limpidus* (Guerrero, Morelos y Michoacán), *C. infamatus infamatus* (Guanajuato y Edo. de México), *C. elegans* (Jalisco), *C. limpidus tecomanus* (Colima), *C. sufusus sufusus* (Durango) y *C. sculpturatus* (Sonora).



Figura 1.

Estimulación eléctrica del telsón de un ejemplar de la especie *Centruroides limpidus limpidus*. En la placa se puede apreciar una gran cantidad de pequeñas gotas de veneno extraídas de otros ejemplares. Se observan el electrodo de contacto en donde está el cuerpo del alacrán y el estimulador (color rojo) que cierra el circuito. Las pinzas mantienen la cola de alacrán en posición adecuada para la obtención del veneno.

Aislamiento e identificación de los componentes del veneno

En los primeros años de trabajo los esfuerzos fueron enfocados a la búsqueda de las especies peligrosas, principalmente *C. noxius* y *C. l. limpidus*, la obtención de su veneno por estimulación eléctrica (figura 1) y la separación cromatográfica. Un grupo importante de estudiantes estuvo involucrado en esta primera parte del trabajo, y debo mencionar la participación pionera de los doctores Alejandro Alagón Cano, Myrna Dent y Javier Mochca-Morales. El aislamiento de los péptidos tóxicos fue seguido de un esfuerzo importante para determinar la estructura primaria de estos componentes, para lo cual se tuvo que crear la infraestructura adecuada con la adquisición de un analizador de aminoácidos y un secuenciador de proteínas. En esta fase la colaboración internacional recibida de los doctores Brian Martin y Paul Fletcher fue fundamental, y el entrenamiento del doctor Fernando Zamudio y del técnico académico Fredy Coronas. Este trabajo continúa con otras especies de alacranes provenientes de países de Sudamérica, Norte, Centro, Sudáfrica y Turquía. La lista total de estudiantes y colaboradores que contribuyeron al desarrollo de este trabajo rebasa el centenar, por lo que no se les incluye explícitamente aquí, si bien sus nombres aparecen en las publicaciones del grupo. Nuestro grupo ha estado directamente involucrado en la obtención de más de la tercera parte de todas las toxinas conocidas del veneno de alacranes en el mundo. Una revisión que incluye todas las estructuras primarias de éstas se puede consultar en Possani y Rodríguez de la Vega, 2006.

En relación a la identificación funcional de los péptidos, la interacción con el grupo italiano de los doctores Gianfranco Prestipino, Enzo Wanke y Emilio Carbone fue importante. Con este grupo describimos la primera toxina específica para canales de potasio, la noxiustoxina (Carbone *et al.*, 1982 y Possani *et al.*, 1982). La primera fase de estos estudios se realizó todavía en el Instituto de Fisiología Celular. Posteriormente, ya en el Instituto de Biotecnología, la contribución del doctor Froylán Gómez-La-

gunas en el establecimiento de los sistemas de electrofisiología fina para estudio de la función de los péptidos tóxicos fue fundamental (Olamendi-Portugal *et al.*, 1996).

La síntesis química de análogos

La determinación de la estructura primaria y la identificación de la función de estos péptidos como moduladores y bloqueadores de canales iónicos (por tanto, responsables de los eventos primarios de la intoxicación) permitió al grupo diseñar posibles secuencias de aminoácidos y producirlas por síntesis química para la obtención de una posible vacuna protectora contra los efectos del piquete del alacrán. Cientos de péptidos fueron sintetizados y ensayados para este efecto, utilizando ratones como modelo experimental. Desgraciadamente no se obtuvo la determinación exacta y síntesis de secuencias que fuesen capaces de generar anticuerpos de alta afinidad con propiedades neutralizantes. La contribución de la doctora Georgina Gurrola Briones en esta iniciativa fue fundamental, si bien varios estudiantes estuvieron involucrados en los ensayos con estos péptidos (los doctores Emma Calderón Aranda y Luís Vaca Domínguez y el maestro Timoteo Olamendi Portugal). Este trabajo se empezó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas. Varias publicaciones reportando estos datos se hicieron en esa época (Gurrola *et al.*, 1989; Vaca *et al.*, 1993; Calderón-Aranda *et al.*, 1995). La falta de éxito en la obtención de una vacuna sintética sugirió dos alternativas: por un lado, tratar de generar anticuerpos monoclonales en contra de las toxinas y, por otro, la clonación de genes que codifican para estos péptidos. La idea subyacente de este trabajo era identificar posibles epítopes de las toxinas que deberían ser sintetizados para obtener una vacuna.

Generación de anticuerpos en contra de toxinas de alacranes

Para dos de las toxinas más estudiadas por nuestro grupo, la Cn2 y la noxiustoxina, ambas del alacrán más peligroso de México, el *C.*

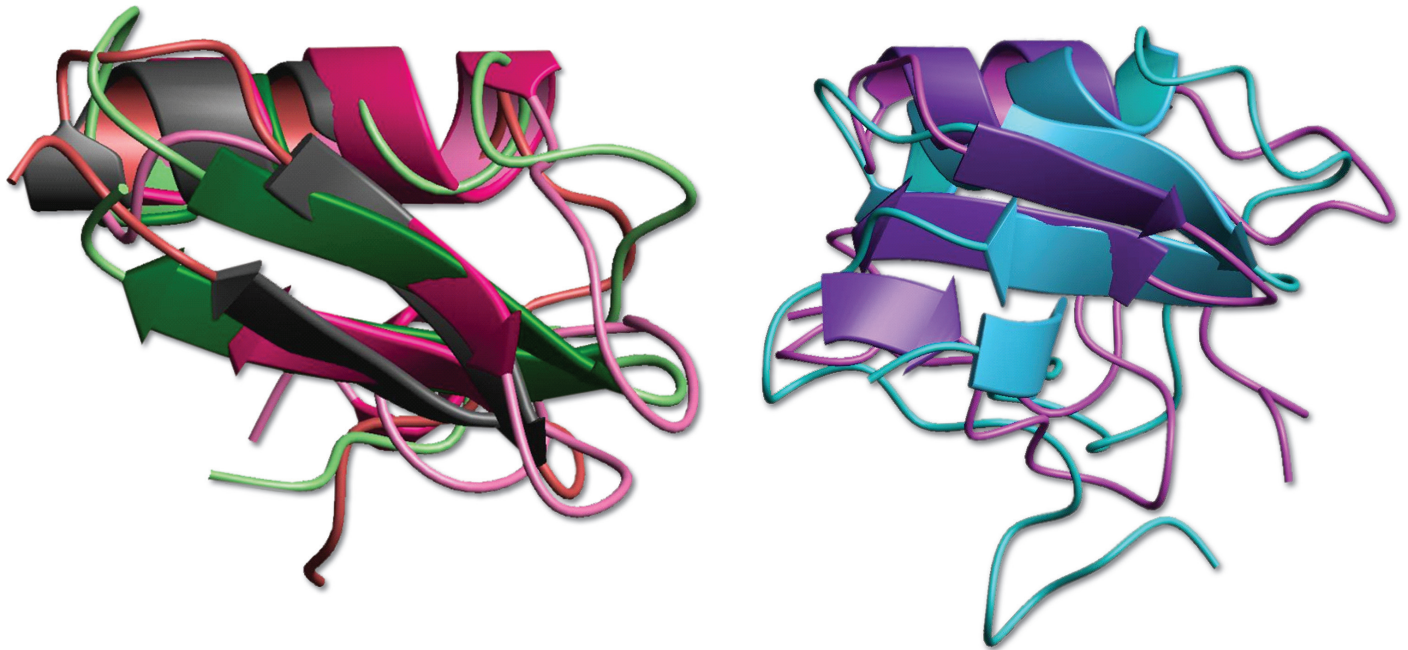


Figura 2.

Estructuras tridimensionales de toxinas del alacrán mexicano *C. noxius* determinadas por resonancia magnética nuclear. A la izquierda se muestra el modelo de la toxina específica para canales de potasio, con la noxiustoxina en verde y la ergtoxina en rosa; y a la derecha para canales de sodio con Cn2 en azul y Cn12 en morado. Nótese la conservación del patrón estructural constituido por una hélice alfa (parte superior) y el pasador beta (hacia el frente). Códigos en el Protein Data Bank: Noxiustoxina, 1sxm; Ergtoxina, 1px9; Cn2, 1cn2, y; Cn12, 1pe4. La imagen se generó con el programa MolMol.

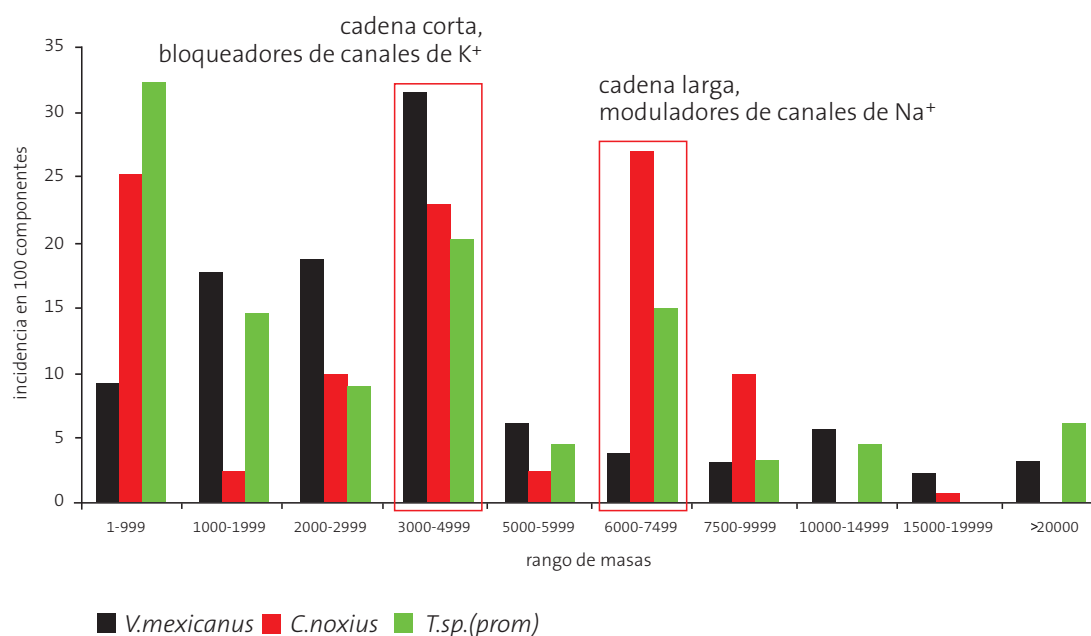


Figura 3.

Diferencias en la composición de los proteomas de venenos de alacranes. Los perfiles proteómicos de los venenos de los alacranes mexicanos *V. mexicanus* (barras negras, el veneno de estos alacranes no es tóxico a mamíferos) y *C. noxius* (barras rojas, el veneno de estos alacranes es uno de los más tóxicos para mamíferos). Con fines comparativos se muestra en verde el promedio de los perfiles proteómicos de los venenos de 5 especies de alacranes sudamericanos del género *Tityus*, la toxicidad para mamíferos de estos venenos varía entre moderada y extremadamente potente. Los marcos rojos denotan los rangos de masas en los cuales se encuentran las toxinas específicas para canales de potasio (3000-4999) o sodio (6000-7499), nótese la escasez de componentes de éste último para el veneno de *V. mexicanus*.

noxius, se obtuvieron anticuerpos monoclonales, uno de los cuales el BCF2 resultó ser neutralizante *in vivo*. La contribución del doctor Pascal Hérion en esta tarea fue muy importante. Se publicaron varios artículos referentes a esta investigación. La primera parte de este trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, mientras que su continuidad y maduración se alcanzó con trabajos realizados en el entonces Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología en Cuernavaca, actualmente Instituto de Biotecnología.

En conjunto, el uso de los péptidos sintéticos y del monoclonal BCF2 permitió obtener un modelo tridimensional de la posible interacción de la toxina Cn2 con el sitio de pegado del anticuerpo (Zamudio *et al.*, 1992 y Selisko *et al.*, 1999). Los trabajos con anticuerpos monoclonales murinos sentarían las bases para el desarrollo de un trabajo todavía más interesante, que abordaremos más adelante, y que tiene a ver con la generación de anticuerpos de cadena única, de origen humano, capaces de neutralizar el efecto nocivo de las toxinas.

La clonación de los genes que codifican para las toxinas de alacrán

Este proyecto fue desarrollado totalmente en el Instituto de Biotecnología, gracias a la colaboración del doctor Francisco Bolívar y la dedicación de la persona a quien se encargó este trabajo, el doctor Baltazar Becerril Luján, con la participación de los estudiantes doctores Consuelo García y Miguel Coronas. Se han clonado cientos de genes que codifican para componentes del veneno de alacranes. La mayor parte de los datos obtenidos todavía no han sido publicados (Becerril *et al.*, 1996 y Corona *et al.*, 2001).

En las revisiones mencionadas (véase más arriba) se reportan algunos de los genes clonados. Este trabajo nos permitió incursionar una vez más en dos vertientes del conocimiento: por un lado, utilizar toxinas recombinantes y sus mutantes para estudios de la relación estructura-función de las toxinas con sus recep-

tores y, por otro, iniciar el desarrollo de toxinas recombinantes con miras a su aplicación en la industria farmacéutica para la producción de anti-venenos. Extenso como es, el trabajo de clonación de los genes apenas está empezando, pero las perspectivas a futuro son muy grandes. Esto incluye el perfeccionamiento de los árboles filogenéticos de las toxinas de alacranes, basados en secuencias de aminoácidos, un elemento fundamental si queremos entender cómo se ha ensamblado el arsenal tóxico de estos organismos. La contribución de la doctora Blanca Inés García en la preparación de los bancos de cDNA para estos estudios, también fue importante.

Determinación de la estructura tridimensional de las toxinas

El trabajo con los péptidos sintéticos, los anticuerpos monoclonales y la clonación de los genes que codifican para las toxinas de alacrán, mostró la necesidad de obtener un conocimiento más preciso de la estructura tridimensional de tales toxinas. Esto se obtuvo gracias a una colaboración inicial con la doctora Muriel Delepierre, del Instituto Pasteur, en Francia (Lebreton *et al.*, 1994, Delepierre *et al.*, 1997, Pintar *et al.*, 1999, Frenal *et al.*, 2004 y Prochinka-Chaloufour *et al.*, 2006), pero en este momento se está realizando totalmente en México gracias a la colaboración establecida con el doctor Federico del Río del Instituto de Química de la UNAM (Del Río-Portilla *et al.*, 2004). La figura 2 representa algunos ejemplos del trabajo realizado por el grupo.

Las superficies de interacción toxina-canal iónico

El trabajo pionero del grupo de Chris Miller sobre la interacción toxina-canal iónico, utilizando mutantes de las toxinas y la clonación de los genes que codifican para un gran número de canales iónicos (potasio, sodio y calcio) y su expresión heteróloga, permitió avanzar de forma seminal en el conocimiento de la inte-

racción ligando-receptor, por lo menos para ese caso: toxina de alacrán-canales iónicos. El conocimiento de la estructura tridimensional de las toxinas del veneno de alacranes fue muy importante para el modelado de sus sitios receptores en los canales iónicos. Este ocurrió en un momento muy oportuno, pues también se consiguió resolver, por difracción de rayos X, la estructura tridimensional de varios canales de potasio, lo que, a la postre, le valió a Roderick MacKinnon la obtención del Premio Nobel en 2003 (MacKinnon, 2003). Nuestro grupo, como pionero en la caracterización de toxinas específicas para canales de potasio, ha contribuido al entendimiento de las posibles superficies de contacto de las toxinas con los canales de potasio y sodio (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003 y Rodríguez de la Vega y Possani, 2004, 2005, 2007) a través de la generación de hipótesis de trabajo que han demostrado ser precisas y útiles en cuanto a los detalles y predicción de las consecuencias de la interacción (Possani y Rodríguez de la Vega, 2006).

Análisis proteómico del veneno de alacranes

El análisis intensivo de los venenos de unas cuantas especies de alacranes —recuérdese que hay cerca de 1500 en el mundo—, así como la clonación de genes expresados en las glándulas de veneno (material usado para realizar los bancos de cDNA), indican claramente que los venenos de alacranes son mezclas bastante complejas, incluyendo ciertas familias proteínicas hiperdiversas (proteínas relacionadas inusualmente diferenciadas). De allí que, concomitantemente con el desarrollo de tecnologías de escrutinio exhaustivo, nos propusimos realizar análisis proteómicos para explorar de forma más integral la biodiversidad de moléculas presentes en los venenos de alacranes. Es por ello que adquirimos uno de los primeros equipos para espectrometría de masas en el país, financiado por un donativo del Conacyt. Gracias a esta iniciativa se pudo publicar uno de los primeros estudios proteómicos realizado

con el veneno de alacranes (Batista *et al.*, 2003) y hemos continuado produciendo información sobre la composición de media docena de alacranes de Sudamérica, México, Turquía y África (Caliskan, 2006, Batista *et al.*, 2006, 2007). En esta labor la participación del doctor Cesar Vicente Ferreira Batista ha sido importante para nuestro grupo. Véase en la figura 3 un ejemplo del trabajo que se está generando en este momento gracias a los estudios proteómicos de varios venenos de alacranes.

Obtención de fragmentos de inmunoglobulinas humanas neutralizantes

Esta infraestructura nos permitía aislar los componentes tóxicos y determinar su estructura primaria por secuenciación de Edman, clonar genes y secuenciarlos, obtener las masas moleculares exactas de los péptidos, sintetizar químicamente a los péptidos, plegarlos de manera correcta *in vitro* (aquí debo mencionar la participación importante del doctor Gerardo Corzo Burguete), y determinar su estructura por resonancia magnética nuclear. Contábamos, pues, con las herramientas necesarias para continuar profundizando todavía más en el conocimiento de la estructura y función de los péptidos tóxicos. Sin embargo, el problema de la vacuna sintética y de los anti-venenos necesitaba un empuje mayor, ya que uno de los aspectos a estudiar era el problema médico causado por el piquete de los alacranes.

La interacción de nuestro grupo con el grupo independiente que se formó bajo el liderazgo del doctor Baltazar Becerril, en especial con tres de sus colaboradores (los doctores Lidia Riaño-Umbarila, Rivelino Juárez-González y Verónica Quintero-Hernández), fue fundamental para el diseño de una librería de anticuerpos humanos y para la selección, por la técnica de despliegue en fagos filamentosos, de inmunoglobulinas humanas capaces de neutralizar algunas toxinas del veneno de alacranes (Juárez-González *et al.*, 2005, Riaño-Umbarila *et al.*, 2005, Quintero-Hernández *et al.*, 2007). Se cuenta en este momento

con un par de fragmentos de cadena única de anticuerpos humanos capaces de neutralizar, no solamente a toxinas puras, sino al veneno total (patentes en trámite). La idea es poder preparar una mezcla de estos anti-venenos de origen humano para sustituir en un futuro los F(ab)² de caballos; si bien estos últimos son bastante seguros, no dejan de ser proteína heteróloga, lo cual conlleva un riesgo potencial. El uso de proteínas de naturaleza humana sin duda es una alternativa muy atractiva.

Las proteínas no tóxicas a humanos y los antibióticos

Sin embargo, en los venenos de alacrán entre el 70 y 80% de los componentes totales no pertenecen a las familias de toxinas más comunes. Entre éstos, hemos identificado varias proteínas (algunas con acción enzimática, como fosfolipasas, hialuronidasas y lysozimas) y otros péptidos con acción antibiótica. Más aún, existe un grupo grande de componentes proteínicos que nosotros llamamos de “componentes huérfanos”, puesto que sabemos de su existencia, conocemos su estructura primaria, tenemos sus genes clonados, pero no sabemos qué función desempeñan en el veneno (Diego-García *et al.*, 2007). El primer péptido descubierto de esta naturaleza fue la hadrurina (Torres-Larios *et al.*, 1999), un antibiótico que impide el crecimiento de microorganismos. Otro péptido importante caracterizado fue la escorpina, que tiene estructura híbrida: el segmento N-terminal similar a las cecropinas (antibióticos naturales) y la porción C-terminal semejante a las toxinas que bloquean canales iónicos (Conde *et al.*, 2000). En el mismo sentido, hemos encontrado péptidos semejantes a defensinas en la hemolinfa de alacranes, que participan en la respuesta inmune innata de estos organismos (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2004).

Los trabajos enfocados en los antibióticos naturales presentes, ya sea en el veneno o hemolinfa de alacranes, están apenas empezando. Recientemente esto se amplió con el descubrimiento de péptidos con actividad biocida

en venenos de alacranes de la familia Buthidae, que son los más estudiados, pero cuya existencia no se conocía (trabajos no publicados). Esto abre una perspectiva futura interesante dentro de la farmacología y medicina. Algunos de estos componentes potencialmente pueden llegar a ser utilizados como medicamentos, de forma análoga a los péptidos bloqueadores o modificadores de la función de canales iónicos, que están siendo utilizados actualmente en ensayos clínicos como posibles modelos para el desarrollo de nuevos fármacos. De los alacranes todavía no hay algo concreto terminado, aunque hay varios candidatos; pero de otras fuentes de veneno ya está siendo utilizado en la terapia humana. El ejemplo prototípico es el ziconotide, derivado de un péptido encontrado en un caracol marino (Miljanich, 2004). Su versión comercial está disponible en el mercado estadounidense bajo la marca Prialt.

Así mismo, la mayoría de las toxinas del veneno de alacranes no son tóxicas para humanos, sino para otros organismos, principalmente artrópodos (insectos y crustáceos), y por ende son potenciales agentes insecticidas para el control de plagas y para protección de cultivos agrícolas (Selisko *et al.*, 1996 y García *et al.*, 1997). De esta forma, el asunto apenas empieza a ser explorado, pero promete mucho para futuros desarrollos biotecnológicos, así como posibles aplicaciones farmacológicas y médicas.

Biología de sistemas

Los hallazgos sólidamente confirmados hasta el momento en relación al problema del alacranismo y al conocimiento molecular de la acción de las toxinas del veneno de los alacranes, indican tres situaciones concretas: 1) las toxinas del veneno de alacranes reconocen canales iónicos situados en las membranas de células excitables (músculo y nervio) e inclusive de células no excitables (linfocitos), causando una despolarización del potencial de membrana, 2) si esta acción es impedida por el uso de anti-venenos específicos durante los primeros minutos des-

pués del accidente, todo síntoma de intoxicación se evita y 3) si el tiempo transcurrido entre el piquete y la atención médica adecuada se alarga, una serie de eventos moleculares ocurren, los cuales no se pueden revertir con el uso de los fáboterápicos existentes.

Se sabe que la evolución sistémica-clínica de un piquete de alacrán peligroso puede ocasionar una serie de reacciones secundarias adversas, algunas irreversibles y nos interesa saber por qué. Si bien sabemos con seguridad los eventos primarios de la intoxicación no conocemos qué pasa después de la despolarización de las membranas, es decir:

¿Cuáles son los mensajes internos que ocurren después del pegado de la toxina a su receptor en las células blanco?

¿Cuántos, y en su caso cuáles, receptores existen para los cuales todavía no se han identificado los componentes del veneno de alacrán que los reconocen, modificando su función?

¿Existen modificaciones de proteínas internamente en la célula afectada? ¿Cuáles son?

¿Qué pasa a nivel de los genes de estas células? ¿Hay genes que son activados o reprimidos?

En este momento nos proponemos realizar estudios que intentan responder a algunas de estas preguntas. Afortunadamente la experiencia acumulada y la infraestructura con la que contamos nos permiten abordar tales preguntas con un enfoque más integral. Basten un par de ejemplos: nuestra extensa experiencia en purificación y caracterización de proteínas nos ayudarán en la obtención de los perfiles proteómicos de células bajo el efecto de las toxinas; la comparación de éstos con los obtenidos en condiciones control nos ayudará a identificar cuáles proteínas están siendo modificadas (tanto en su expresión, como en posibles modificaciones postraduccionales), y nuestra habilidad para clonar centenares de genes a partir de mensajeros nos auxiliará para identificar cambios en la regulación de genes que estén asociados a la respuesta celular ante despolarizaciones anómalas. En conjunto, estos datos pueden ser integrados en el contexto de los circuitos de transducción de señales (u

otros procesos orgánicos relevantes) que han sido identificados, e inclusive podríamos describir algunos aún no reconocidos que serían particulares de los fenómenos asociados a la neurotoxicidad ocasionada por despolarizaciones anómalas.

De esta forma, podemos verificar, como se dijo en la parte introductoria de este capítulo, que nuestra contribución se asemeja a una hélice ascendente con amplitud variable, pero siempre en aumento, que toca problemas de frontera de las áreas de la bioquímica, biología molecular, farmacología y medicina. ●

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias a la contribución de muchos estudiantes (autores y co-autores de las 220 publicaciones de nuestro grupo) y al soporte económico recibido del Conacyt, DGAPA-UNAM, Howard Hughes Medical Institute, Comunidad Europea, Laboratorios Silanes S.A. de C.V. y su subsidiaria Instituto Bioclón S.A. de C.V.

Bibliografía

- Batista, C. V. *et al.*, "Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins", en *Proteomics*, 6, 2006.
- _____, "Proteomics of the venom from the amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins", en *J Chromatogr B*, 803, 2004.
- Becerril, B. *et al.*, "Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*", en *Biochem J*, 313, 1996.
- Calderón-Aranda, E. S., T. Olamendi-Portugal y L. D. Possani, "The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins", en *Vaccine*, 13, 1995.
- Caliskan, F. *et al.*, "Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes", en *Toxicon*, 48, 2006.
- Carbone, E. *et al.*, "Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin", en *Nature*, 296, 1982.
- Conde, R. *et al.*, "Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom", en *FEBS Lett*, 471, 2000.

- Corona, M. *et al.*, "Genes and peptides from the scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing, that recognize Na⁺ channels", en *Toxicon*, 39, 2001.
- Del Río-Portilla, F. *et al.*, "NMR solution structure of Cn12, a novel peptide from the mexican scorpion *Centruroides noxius* with a typical beta-toxin sequence but with alpha-like physiological activity", en *Eur J Biochem*, 271, 2004.
- Delepierre, M., A. Prochnicka-Chalufour y L. D. Possani, "A novel potassium channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*: A 1H NMR analysis using a nano-NMR probe", en *Biochemistry*, 36, 1997.
- Diego-García, E. *et al.*, "Wide phylogenetic distribution of scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of "orphan" components", en *Peptides*, 28, 2007.
- Frenal, K. *et al.*, "Exploring structural features of the interaction between the scorpion toxin CnErg1 and ERG K⁺ channels", en *Proteins*, 56, 2004.
- García, C. *et al.*, "Isolation, characterization and comparison of a novel crustacean toxin with a mammalian toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann", en *Comp Biochem Physiol B*, 116, 1997.
- Gurrola, G. B. *et al.*, "Synthetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this K⁺ channel blocker is located on its amino-terminal portion", en *J Neural Transm*, 77, 1989.
- Juárez-González, V. R. *et al.*, "Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2", en *J Mol Biol*, 346, 1999.
- Klett, R. P. *et al.*, "The acetylcholine receptor. I. Purification and characterization of a macromolecule isolated from *Electrophorus electricus*", en *J Biol Chem*, 248, 1973.
- Lebreton, F. *et al.*, "Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch", en *Biochemistry*, 33, 1994.
- MacKinnon, R., "Nobel lecture", en *Les Nobel Prize 2003*, Suecia, Nobel Foundation, 2004.
- Miljanich, G. P., "Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain", en *Curr Med Chem*, 11, 2004.
- Olamendi-Portugal, T. *et al.*, "A novel structural class of K⁺ channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*", en *Biochem J*, 315, 1996.
- Pintar, A., L. D. Possani y M. Delepierre, "Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels", *J Mol Biol*, 287, 1999.
- Possani, L. D. y R. C. Rodríguez de la Vega, "Scorpion venom peptides", en *Handbook of Biologically Active Peptides*, E.U.A., Academic Press, 2006.
- Prochnicka-Chalufour, A. *et al.*, "Solution structure of discrepin, a new K⁺ channel blocking peptide from the alpha-KTx15 subfamily", en *Biochemistry*, 45, 2006.
- Quintero-Hernández, V. *et al.*, "The change of the scFv into the Fab format improves the stability and *in vivo* toxin neutralization capacity of recombinant antibodies", en *Mol Immunol*, 44, 2007.
- Riaño-Umbarila, L. *et al.*, "A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom", en *FEBS J*, 272, 2005.
- Rodríguez de la Vega, R. C. *et al.*, "Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins", en *Trends Pharmacol Sci*, 24, 2003.
- _____, "Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury", en *Cell Mol Life Sci*, 61, 2004.
- Rodríguez de la Vega, R. C. y L. D. Possani, "Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels", en *Toxicon*, 43, 2004.
- _____, "Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution", en *Toxicon*, 46, 2005.
- _____, "Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels", en *Toxicon*, 49, 2007.
- Selisko, B. *et al.*, "An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann. cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants", en *Eur J Biochem*, 242, 1996.
- _____, "Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen", en *Proteins*, 37, 1999.
- Torres-Larios, A. *et al.*, "Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*", en *Eur J Biochem*, 267, 2000.
- Vaca, L. *et al.*, "Blockade of a KCa channel with synthetic peptides from noxiustoxin: a K⁺ channel blocker", en *J Membr Biol*, 134, 1993.
- Zamudio, F. *et al.*, "Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann", en *Eur J Biochem*, 204, 1992.

