



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

**Síntesis química y predicción de estructura secundaria de
Cn29, un péptido aislado del veneno del alacrán *Centruroides
noxius***

**Tesis para obtener el título de
Licenciado en Biología**

Presenta:

Rey Luis Mendoza Luis

Directora: Dra. Georgina Gurrola Briones

Marzo de 2019



Índice

1. Introducción

- 1.1 Los escorpiones
- 1.2 Diversidad y escorpionismo
- 1.3 Venenos de escorpión
- 1.4 Péptidos unidos por enlaces disulfuro
 - 1.4.1 Toxinas de canales de Sodio
 - 1.4.2 Toxinas de canales de Potasio
 - 1.4.3 Toxinas de canales de Cloro y Calcio
- 1.5 Potencial biotecnológico de péptidos del veneno de escorpión
- 1.6 Síntesis de péptidos en fase solida
 - 1.6.1 Soporte sólido para SPSS
 - 1.6.2 Acoplamiento

2. Justificación

3. Hipótesis

4. Objetivos del trabajo

- 4.1 Objetivo general
- 4.2 Objetivos particulares

5. Material y métodos

- 5.1 Síntesis química a partir de F-moc aminoácidos
- 5.2 F-moc aminoácidos
- 5.3 Incorporación del primer aminoácido a la resina
- 5.4 Funcionalización de la resina
- 5.5 Acoplamientos
- 5.6 Desprotección del grupo F-moc
- 5.7 Monitoreo de acoplamiento y desprotección
 - 5.7.1 Prueba de Kaiser
 - 5.7.2 Prueba de TNBS
- 5.8 Desanclaje del péptido de la resina
- 5.9 Plegamiento *in vitro*
- 5.10 Purificación por Cromatografía líquida de alta eficacia fase reversa

- 5.10.1 Escala preparativa
- 5.10.2 Escala analítica
- 5.11 Cuantificación
- 5.12 Espectrometría de masas y secuencia
- 5.13 Prueba de Co-elución
- 5.14 Determinación de enlaces disulfuro
 - 5.14.1 Digestión con Tripsina
 - 5.14.2 Digestión con Termolisina
- 5.15 Predicción *in silico* de estructura secundaria y accesibilidad al solvente de Cn29
- 5.16 Modelos de estructura terciaria de Cn29

6. Resultados

- 6.1 Eficiencia de síntesis de péptido crudo
- 6.2 Plegamiento y purificación
- 6.3 Prueba de Co-elución
- 6.4 Determinación de enlaces disulfuro
- 6.5 Predicción *in silico* de estructura secundaria y accesibilidad al solvente de Cn29
 - 6.5.1 Predicción de estructura secundaria
 - 6.5.2 Predicción de accesibilidad al solvente
- 6.6 Modelos Tridimensionales de Cn29
- 6.7 Estructura terciaria de Cn29 resulta por resonancia magnética nuclear

7. Discusión

8. Conclusiones

9. Bibliografía

Resumen

El veneno de los escorpiones está compuesto principalmente de péptidos responsables de la actividad tóxica y proteínas con diversas actividades enzimáticas. Estos péptidos, se han empleado como herramientas farmacológicas en el estudio de canales iónicos, y alguno de ellos se han considerado como candidatos para el desarrollo de agentes terapéuticos. El objetivo principal de este trabajo fue la síntesis química de un péptido aislado del veneno del escorpión *Centruroides noxius*, nombrado Cn29, de 27 residuos de aminoácidos, 6 correspondientes a Cisteína, que forman 3 enlaces disulfuro, y masa molecular de 2,821.25 Da. La síntesis se realizó mediante la metodología síntesis de péptidos en fase sólida F-moc. Después de obtener el péptido crudo, se realizó el plegamiento *in vitro*, y se purificó por cromatografía líquida de alta eficacia fase reversa, la masa molecular fue comprobada por espectrometría de masas por electrospray. La identidad estructural del péptido sintético con el nativo se comprobó mediante una prueba de co-elución. Para determinar los enlaces disulfuro, Cn29 se digirió con Tripsina y Termolisina, los fragmentos resultantes se analizaron por secuencia de aminoácidos por degradación de Edman y espectrometría de masas, determinando un patrón de enlaces: Cys1-Cys5, Cys2-4, Cys3-Cys6. Finalmente se realizó una predicción *in silico* de estructura secundaria, accesibilidad al solvente y estructura terciaria por medio del servidor I-TASSER.

1. Introducción

1.1 Los escorpiones

Los escorpiones constituyen un orden de artrópodos de la clase Arachnida, reconocibles fácilmente por su característico plan corporal, su aparición data del periodo silúrico, hace aproximadamente 430 millones de años (Jeyaprakash & Hoy, 2009), indicando que fueron los primeros artrópodos en ocupar la superficie terrestre.

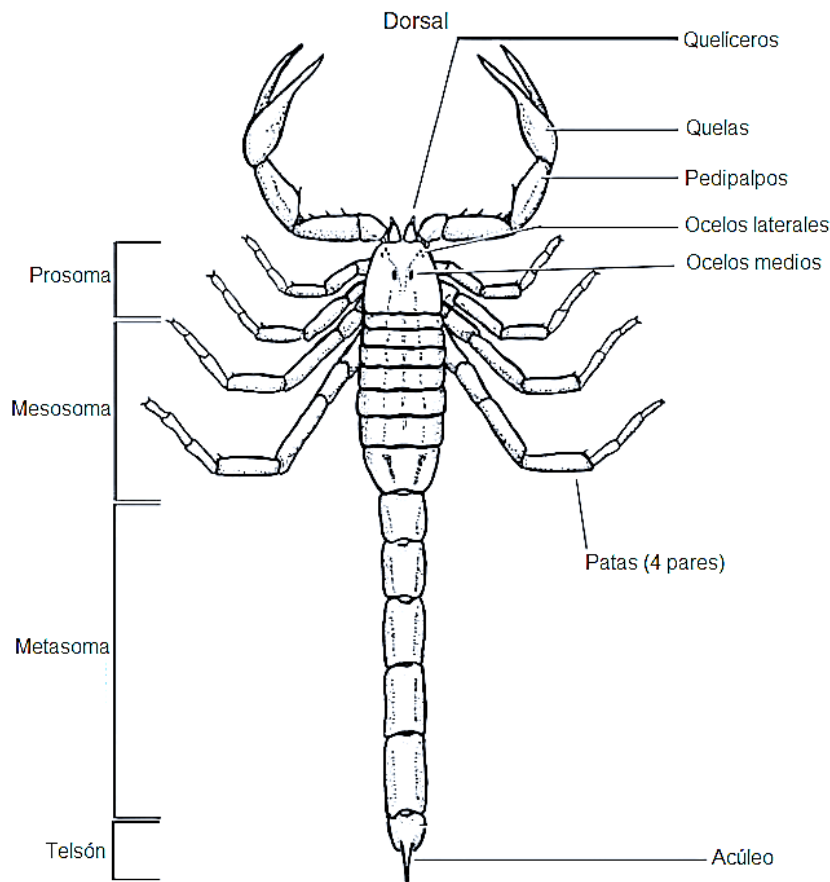


Figura 1. Vista dorsal de la morfología de un escorpión, modificada de Resh & Cardé, 2009.

Su cuerpo está dividido en cuatro regiones: el prosoma, soportado por cuatro pares de patas, un par de quelíceros para desgarrar las presas, y un par de pedipalpos con función prensil y sensorial, el mesosoma conformado por siete segmentos, el metasoma o cola por cinco, y terminando por el telson, que contiene un par de glándulas productoras de veneno rodeadas de una capa muscular que al contraerse permiten la inoculación del veneno mediante el aguijón o acúleo (Resh & Cardé, 2009).

1.2 Diversidad y escorpionismo

Los escorpiones están presentes en todos los continentes, con excepción de la Antártida, concentrándose principalmente en regiones tropicales y subtropicales, las cuales presentan también altos índices de escorpionismo: intoxicación humana por la picadura de escorpiones tóxicos (Borjes, Miranda & Pascale, 2012), que generalmente produce dolor, adormecimiento e inflamación de la zona afectada, e incluso puede provocar la muerte en algunos casos.

Los escorpiones son el quinto orden de arácnidos más diverso, de acuerdo a la Universidad de Noruega, 2,354 especies han sido descritas hasta la fecha (Ntnu.no, 2018), las cuales están clasificadas en 163 géneros y 20 familias (Prendini & Wheeler, 2005), sin embargo el número de especies de importancia médica es alrededor de 30 (Chippaux, 2012), casi en su totalidad pertenecientes a la familia Buthidae, que engloba 1,053 especies clasificadas en 92 géneros (Suranse et al., 2017), siendo los de mayor importancia medica *Androctonus*, *Buthus* y *Leiurus* en África del Norte y Medio Oriente, *Parabuthus* en Sudáfrica, *Mesobuthus* en Asia, mientras que en Norteamérica y Sudamérica *Centruroides* y *Tityus* respectivamente (Caliskan et al., 2013), siendo la única excepción *Hemiscorpius lepturus* en Irán, perteneciente a la familia Hemiscorpiidae (Pipelzadeh, 2007).

En México el género *Centruroides* está representado por 45 especies (Santibáñez-López et al., 2015), de las cuales 14 han sido catalogadas como peligrosas para humanos, aunque de acuerdo a su grado de toxicidad las 7 principales son *Centruroides villegasi*, *C. hirsutipalpus*, *C. elegans*, *C. tecomanus*, *C. infamatus*, *C. suffusus* y *C. noxius*, siendo este último el más tóxico, con una LD₅₀ de 2.50 µg por 20g de peso de ratón (Riaño-Umbarila et al., 2017), pudiendo su picadura ser letal si no es tratada a tiempo con el antiveneno.

1.3 Veneno de escorpión

El veneno de los escorpiones es una mezcla de compuestos biológicamente activos, principalmente péptidos y proteínas, enzimas de alto peso molecular (hialuronidasas, fosfolipasas, y proteasas), y otros componentes como, aminoácidos libres, lípidos, mucopolisacáridos, sales inorgánicas y componentes heterocíclicos (Santibáñez-López & Possani, 2015).

Los péptidos presentes en el veneno de escorpión han sido divididos en péptidos ricos en cisteína con puentes disulfuro, en inglés disulfide-bridged peptides (DBPs) y péptidos sin puentes disulfuro, non-disulfide-bridged-peptides (NDBPs) (Zeng et al., 2005); los DBPs constituyen el grupo más estudiado principalmente por su importancia médica como neurotoxinas, ya que son los responsables de los síntomas de envenenamiento que ocurren después de la picadura de un escorpión, debido a su interacción sobre los canales iónicos de la membrana de células excitables y no excitables modificando así su permeabilidad (Quintero et al., 2013). Mientras que los NDBPs representan un grupo menor de péptidos compuestos de 13 a 56 residuos de aminoácidos, que han sido identificados y caracterizado funcionalmente recientemente, a los que se ha asignado funciones principalmente de defensa, como antimicrobiana y antiviral (Almaaytah & Albalas, 2014).

1.4 Péptidos unidos por enlaces disulfuro

La mayoría de estos péptidos, normalmente también reciben el nombre de “toxinas”, y pertenecen a una clase estructural construida alrededor de una estructura conocida como motivo CS- α/β , (alfa/beta estabilizado por cisteínas) que consiste de una α -hélice unida por enlaces disulfuro a una hoja- β de doble o triple hebra (Rodríguez de la Vega et al., 2013; Mouhat et al., 2004), y tienen actividad principalmente en canales iónicos de Na^+ y K^+ , o modulan la actividad de canales de Ca^{++} sensibles a rianodina; La clasificación general está basada en cuatro criterios diferentes: el canal iónico involucrado, el receptor específico al que la toxina se une, su estructura tridimensional, y el tipo de respuesta inducida sobre el receptor (Ver revisión, Quintero et al., 2013).

1.4.1 Toxinas de canales de Sodio

Las toxinas que actúan sobre los canales iónicos de sodio son las más relevantes por sus efectos en mamíferos, incluidos los humanos, compuestas de 61-76 residuos de aminoácidos, las cuales se encuentran unidas por cuatro puentes disulfuro (Possani et al., 1999). Se han dividido en α -toxinas (α -NaScTxs), las cuales se unen al sitio tres en la superficie extracelular del canal inhibiendo el rápido proceso de inactivación (Couraud et al., 1982; Meves et al., 1986), y las β -toxinas (β -NaScTxs), las cuales se unen al sitio cuatro del receptor y cambian el umbral de activación del canal a potenciales de membrana más negativos (Ver revisión Rodríguez de la Vega & Possani, 2007; Weinberger et al., 2010).

1.4.2 Toxinas de canales de Potasio

Estas toxinas son de menor tamaño que las NaScTxs, con una longitud de 23 a 45 residuos de aminoácidos, las de mayor longitud presentan de 50-75 residuos de aminoácidos, y forman tres o cuatro puentes disulfuro. De acuerdo a su secuencia primaria y el emparejamiento de cisteínas se dividen en 7 familias α -, β -, γ -, κ -, λ -, ϵ - y δ -KTx (Tytgat et al., 1999; Rodríguez de la Vega & Possani, 2004; Cremones et al., 2016, Chen et al., 2013). Estas toxinas interactúan con diferentes subtipos de canales como: Kv1, Kv3, Kv4, Kv7, Kv11 y K_{Ca} . Los motivos estructurales principales en estos péptidos son dos, el principal es el motivo común $CS\alpha/\beta$, y el segundo $CS\alpha/\alpha$ que consiste de dos α -hélice cortas conectadas por un giro beta, característico de las κ -KTx. (Ver revisión Jiménez-Vargas, Possani & Ramírez, 2017).

1.4.3 Toxinas de canales de Cloro y Calcio

El primer péptido descrito en afectar los canales de cloro fue la Clorotoxina, aislada del escorpión *Leiurus quinquestriatus*, un péptido de 36 aminoácidos con cuatro enlaces disulfuro (Debin et al., 1993), desde entonces se han descrito y clasificado en esta familia otras toxinas que presentan un alto grado de similitud con la misma, en cuanto a residuos de aminoácidos y enlaces disulfuro (Rjeibi et al., 2011, Diego et al., 2014).

Las calcinas son una familia de péptidos de escorpión que se unen con alta afinidad a los receptores de rianodina (RyRs) e incrementan la liberación de Ca^{++} de las vesículas del retículo sarcoplásmico por la inducción de estados de subconductancia, las imperatoxinas aisladas del escorpión *Pandinus imperator* (IpTxi y IpTxa) de 15 kDa y 3.7 kDa respectivamente fueron las primeras descritas en tener actividad sobre estos receptores (Valdivia et al., 1992). Las toxinas de esta familia presentan un plegamiento conocido como ICK (inhibitor cystine knot) que les confiere una estructura globular y altamente compacta, además de ser capaces de atravesar la membrana celular (Xiao et al., 2016).

1.5 Potencial biotecnológico de péptidos del veneno de escorpión

Por su actividad biológica los DBPs además de constituir una herramienta farmacológica en el estudio de los canales iónicos por su alta potencia y selectividad, se han considerado como candidatos para el desarrollo de drogas con aplicaciones terapéuticas que involucren canales iónicos, como las canalopatías, condición que se ha asociado al cáncer (Kozlov et al., 2017), mientras que los NDBPs han resultado desplegar actividad antibacteriana, antifúngica, citolítica, antiviral, antimalarial (Almaaytah & Albalas, 2014), lo que representa un alto potencial biotecnológico para estas moléculas.

Una de las toxinas de escorpión más interesante respecto al desarrollo de terapéuticos es la Clorotoxina, utilizada primero como una herramienta farmacológica en el estudio de las corrientes de Cloruro de células epiteliales, y posteriormente utilizando clínicamente en el tratamiento de glioblastoma por sus efectos anti-angiogénicos (Cohen-Inbar & Zaroor, 2016), además del desarrollo de un bioconjugado con el compuesto fluorescente Cianina 5.5 para demarcar células cancerosas circundantes de las normales, incrementando la posibilidad en procedimientos quirúrgicos de remover las cancerosas sin dañar el tejido sano, que ha sido aprobado por la FDA (Veisheh et al., 2007, Zambelli et al., 2016). Recientemente se ha descrito RK1, un péptido de solo 14 aminoácidos y un puente disulfuro, aislado del escorpión *Buthus occitanus tunetanus*, muestra actividad antitumoral ya que inhibe la migración y proliferación de células de glioma y melanoma, además de inhibir la neoangiogénesis, sin presentar toxicidad in vitro e in vivo (Khamessi

et al., 2018), abriendo perspectivas a péptidos cortos aislados del veneno de escorpiones para el tratamiento del cáncer.

Las enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T como lo es la esclerosis múltiple, la diabetes tipo 1, artritis reumatoide también podrían ser tratadas a partir de péptidos del veneno de escorpión; un péptido con este potencial es la toxina Vm24 aislada del escorpión *Vaejovis mexicanus*, un péptido de 36 aminoácidos que inhibe los canales Kv1.3 de linfocitos humanos, su aplicación a concentraciones picomolares inhibe la proliferación y la señalización por calcio de células T humanas in vitro, sin efectos colaterales significantes que involucran inmunosupresión general (Varga et al., 2012).

Aunque la diversidad de péptidos con potencial biotecnológico es muy amplia, el número de fármacos bajo esta línea es aún muy reducido, ya que los principales obstáculos en el desarrollo de medicamentos de esta naturaleza son los costos de producción, desconocimiento de los efectos citotóxicos, incluso la administración también puede resultar dificultosa, por lo que algunos solo han sido considerados para ser administrados tópicamente.

1.6 Síntesis de péptidos en fase sólida

En 1963 Bruce Merrifield introdujo la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) de sus siglas en inglés Solid Phase Peptide Synthesis, sintetizando el tetrapéptido leucilalanilglicilalanina (Merrifield, 1963), por lo que recibió el premio Nobel de química en 1984. En la actualidad ésta técnica sigue siendo la manera más sencilla para la producción de péptidos en el laboratorio. El método se basa en el anclaje del aminoácido C-terminal mediante su grupo carboxilo a una molécula enlazante que se encuentra unida a un soporte sólido insoluble o resina, después la cadena peptídica es elongada linealmente en dirección C-terminal → N-terminal (contrario a como sucede naturalmente en el ribosoma), mediante el acoplamiento secuencial de aminoácidos.

El grupo α -amino de cada aminoácido usado durante la síntesis tiene un grupo protector que se remueve fácilmente bajo condiciones suaves que preservan la integridad del péptido y evitan la epimerización, así se permite la adición del siguiente aminoácido con su grupo carboxilo activado y protegido en el α -amino. Mientras que la cadena lateral de ciertos grupos funcionales de aminoácidos también debe protegerse mediante grupos protectores para evitar que ocurran reacciones indeseadas, estos deben ser estables en las condiciones de reacción utilizadas durante la elongación del péptido. El proceso de desprotección-acoplamiento se repite hasta llegar a la secuencia deseada, y en una etapa final el péptido se libera de la resina y junto con los grupos protectores de las cadenas laterales.

Al estar el péptido unido a un soporte sólido se emplean excesos de reactivos que junto con los productos secundarios de la reacción se eliminan mediante procesos sencillos de lavado y filtrado, evitando así pérdidas mecánicas de péptido, ya que el soporte sólido al que se une permanece en el reactor de síntesis durante todo el proceso, lo que permite obtener buenos rendimientos.

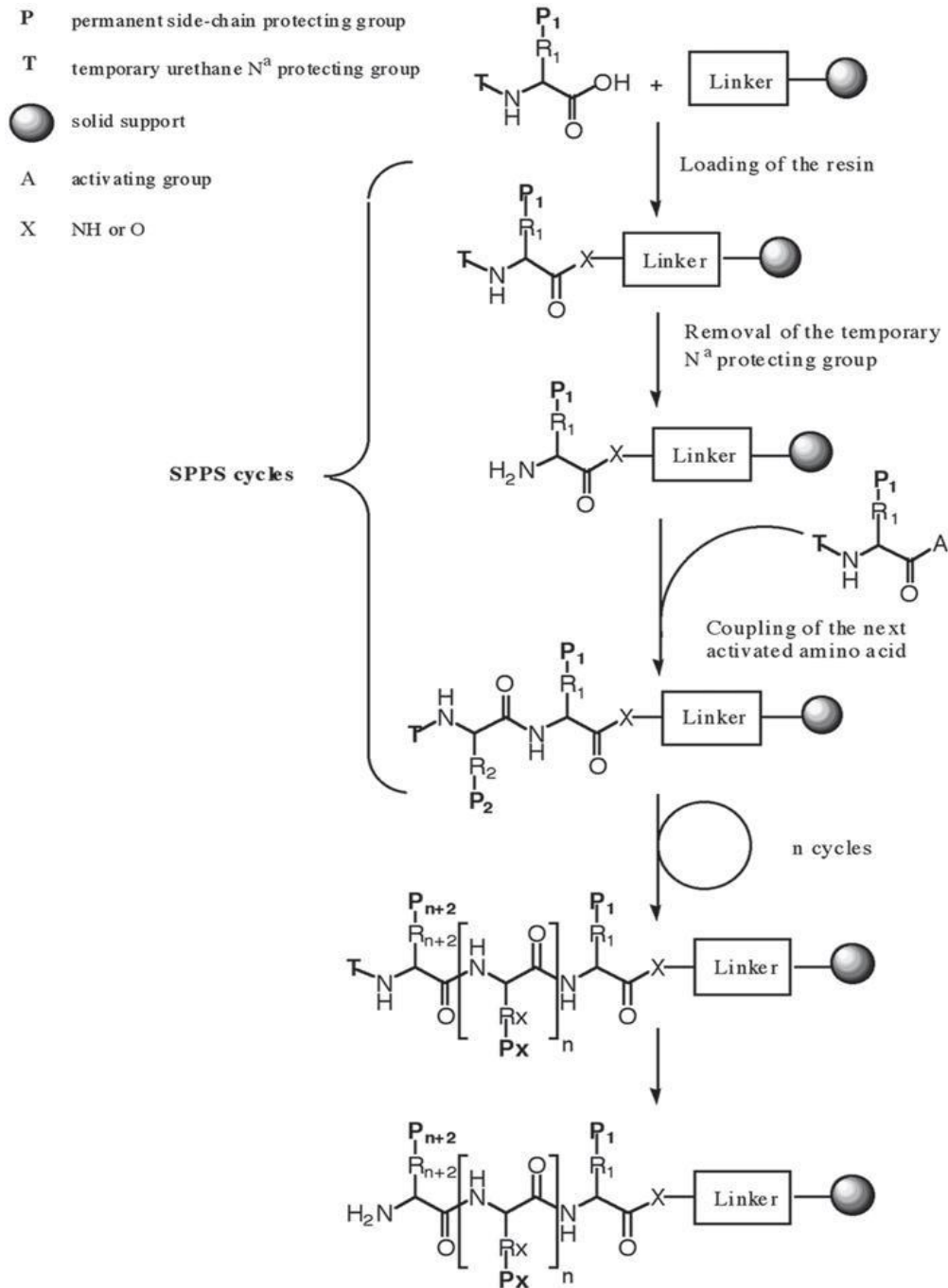



Figura 2. Principios de síntesis de péptidos en fase sólida, **P1**-Grupo protector de cadena lateral, **T**-Grupo protector grupo α-amino,  soporte sólido (resina), **X**- NH o O. Primero se esquematiza la unión del primer aminoácido a la resina, seguido de la desprotección del grupo protector α-amino, luego el acoplamiento del aminoácido entrante ya activado, repetición de n-ciclos de desprotección y acoplamiento hasta terminar de elongar la cadena peptídica (Amblard et al., 2006).

En la síntesis en fase sólida son utilizadas dos estrategias principales: Boc/Bzl y Fmoc/tBu denominados así por los grupos protectores α -amino y de la cadena respectivamente. La estrategia tertbutoxicarbonilo (Boc) se basa en el grado de labilidad ácida del grupo protector, que es eliminado con ácidos de fuerza moderada, como ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano (DCM), lo que implica que los protectores de tipo bencilo (Bzl) que protegen las cadenas laterales deben ser estables en estas condiciones, mientras que la eliminación de estos últimos y la separación del péptido del soporte sólido requiere de tratamientos ácidos más fuertes como el fluoruro de hidrógeno anhidro (HF) (Amblard, 2006). Debido a que el HF es un ácido extremadamente fuerte, puede alterar la integridad de la secuencia peptídica, y necesita de espacios físicos especiales para su manipulación, se desarrolló una estrategia más suave basada en el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (F-moc), este grupo se elimina con bases de fuerza moderada, habitualmente 20-25% de piperidina en dimetilformamida (DMF), esta ventaja permite el uso de protectores de tipo t-butilo (tBu) que son lábiles en presencia de ácidos como el TFA, de esta manera se pueden eliminar los grupos protectores mediante dos estrategias químicas diferentes, permitiendo el uso de condiciones ácidas más débiles para la liberación final.

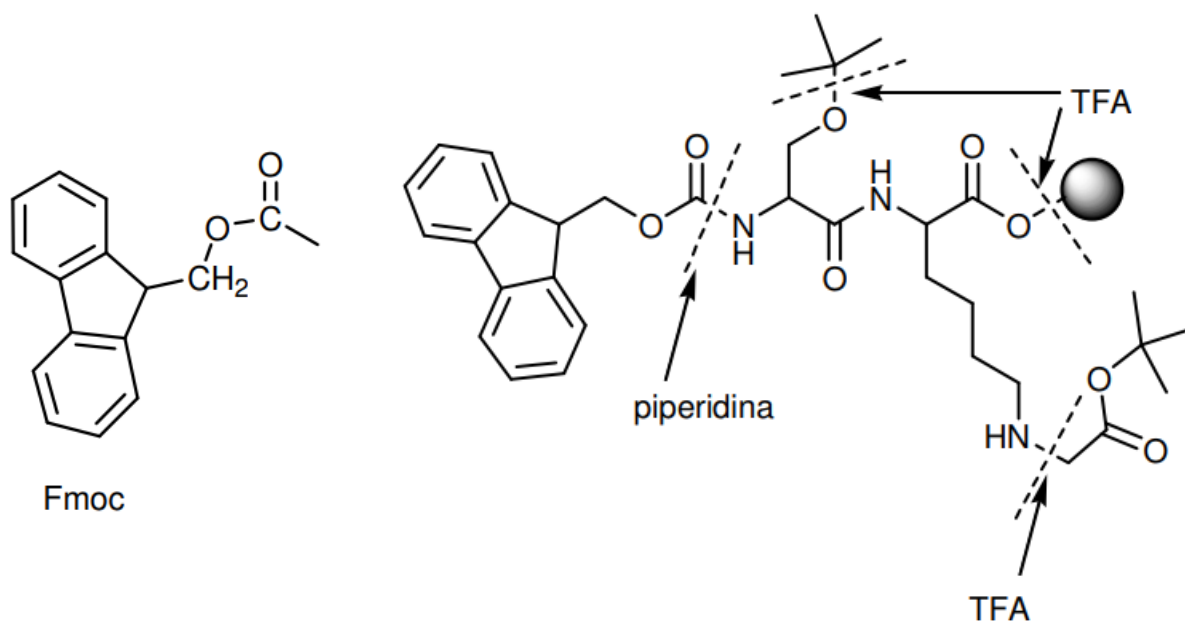


Figura 3. Del lado izquierdo estructura del Grupo F-moc, lado derecho, esquema general de la estrategia Fmoc/tBu en SPPS.

1.6.1 Soporte sólido para SPPS

Una exitosa SPPS depende de la elección del soporte sólido, del “linker” o espaciador entre el soporte sólido y el péptido sintetizado, de los aminoácidos protegidos apropiadamente, de la metodología de acoplamiento, y del protocolo para la ruptura del péptido del soporte sólido (Guy & Fields, 1997).

La resina y el “linker” más adecuado dependen del péptido que se desea obtener, una resina con un “linker” que tiene un grupo hidroxilo es utilizada para producir un péptido con extremo C-terminal ácido, o una resina con un grupo amina para producir un péptido con el extremo carboxilo amidado. El soporte sólido usado durante la síntesis química debe ser inerte en las condiciones empleadas, mecánicamente estable e insoluble en los disolventes empleados, además de aumentar su volumen en contacto con estos. Materiales como el poliestireno entrecruzado con divinilbenceno, y polietilenglicol (PEG) garantizan estas propiedades. Generalmente las resinas o soportes sólidos presentan un diámetro de alrededor de 50 μm y una sustitución entre 0.5 a 0.8 mmol/g, y para péptidos de tamaño superior a 25 residuos, suelen usarse resinas con un grado de sustitución menor, de aproximadamente 0.1-0.3 mmol/g. (Czarnik, 1998).

1.6.2 Acoplamiento

El acoplamiento corresponde a la formación del enlace peptídico entre dos aminoácidos adyacentes. Involucra dos pasos, la activación del grupo α -carboxilo del aminoácido entrante, y el ataque nucleofílico del grupo amino del aminoácido unido a la resina sobre el grupo carboxílico activado del aminoácido entrante. (Verlander M, 2001).

Para la activación del grupo carboxilo del aminoácido entrante se usan distintos reactivos de acoplamiento. Los primeros usados fueron las carbodiimidias, como la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), así como también la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) En la actualidad se usan reactivos que minimizan la formación de subproductos no deseados y que reducen los tiempos de reacción, entre los cuales mayoría son sales de fosfonio o uronio, que, en presencia de una base, como lo es la N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA), pueden activar grupo carboxilo del aminoácido entrante .

Las sales de uronio más usadas, son el hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio (HBTU) y el tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio (TBTU), además de aditivos como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) que aceleran la reacción y evitan la racemización del aminoácido entrante (Stawikowski & Fields, 2012).

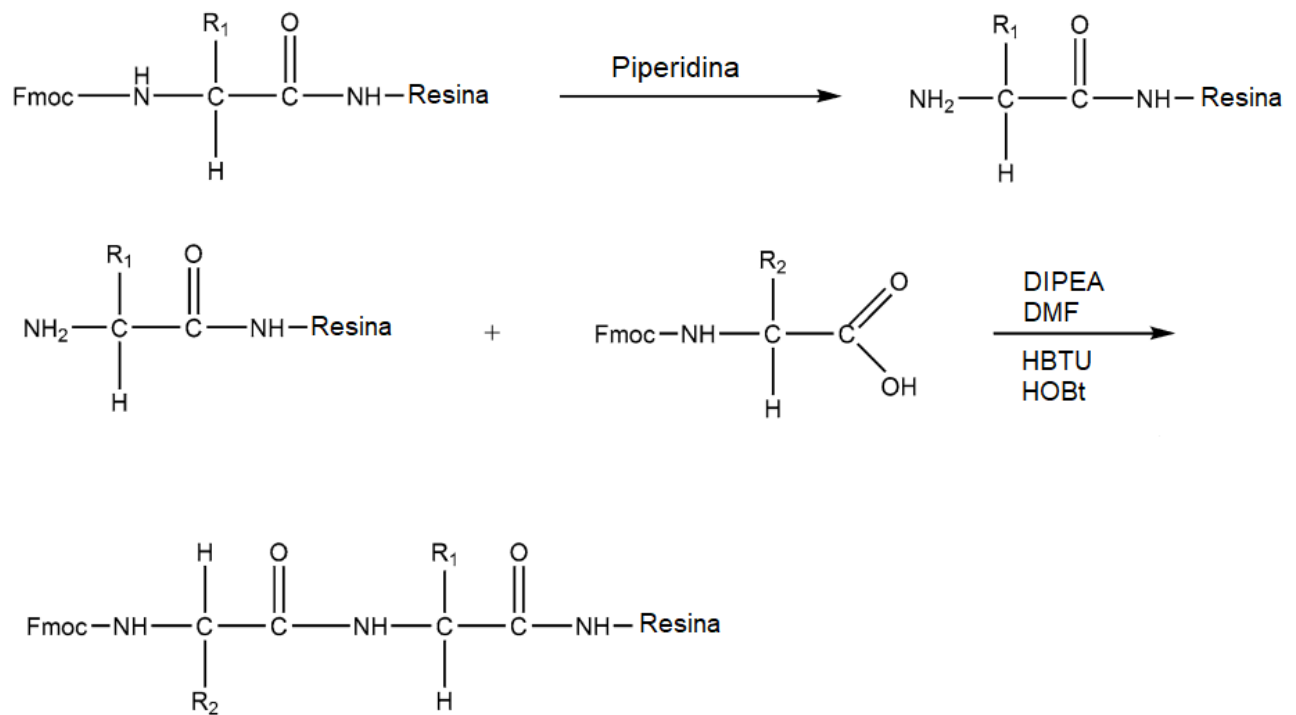


Figura 4. Protocolo de desprotección y acoplamiento en SPPS F-moc, primero la eliminación del grupo F-moc con Piperidina, y la posterior activación del aminoácido entrante, finalmente formación del enlace peptídico entre ambos aminoácidos, modificado de Pires, Bemquerer & do Nascimento, 2014.

2. Justificación

La diversidad de péptidos contenidos en el veneno de los escorpiones por sus características intrínsecas se han empleado desde herramientas farmacológicas en el estudio de los canales iónicos, hasta considerarse terapéuticos o una base en el desarrollo de los mismos, sin embargo dentro de esta gran diversidad aún hay péptidos sin caracterización estructural y funcional; El estudio de estos implica la colecta de especímenes de su ambiente natural para la extracción del veneno y purificación de los componentes; además de la poca cantidad de veneno que proporciona cada escorpión, la diversidad de péptidos contenidos está representada en proporciones desiguales, algunos encontrándose en muy bajas cantidades, lo cual es una limitación cuando hay interés de estudio por alguno en particular, por esta razón la síntesis química de péptidos es una herramienta que permite la producción de los mismos para los fines pertinentes; aislado del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, el péptido nombrado Cn29 es de interés por la particularidad de su secuencia, prácticamente sin similitud a otras toxinas de escorpión, por lo que es de interés su producción mediante síntesis química asegurando su disponibilidad para la búsqueda de su blanco de acción y completar su caracterización.

3. Hipótesis

Por medio de la síntesis química de péptidos en fase sólida es posible producir un péptido sintético estructuralmente idéntico al péptido Cn29 presente en el veneno del escorpión *C. noxius*.

4. Objetivos del trabajo

4.1 Objetivo general

Sintetizar mediante la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida, el péptido Cn29 encontrado naturalmente en el veneno del escorpión *Centruroides noxius*.

4.2 Objetivos particulares

- Comprobar la identidad de la toxina sintética con la nativa.
- Determinar el patrón de enlaces disulfuro de Cn29.
- Predicción *in silico* de la estructura secundaria y accesibilidad al solvente de Cn29
- Predicción *in silico* de la estructura terciaria de Cn29

5. Materiales y métodos

5.1 Síntesis química en fase solida a partir de Fmoc-aminoácidos

El péptido Cn29 está compuesto de 27 aminoácidos en el orden: Leu-Cys-Leu-Ser-Cys-Arg-Gly-Gly-Asp-Tyr-Asp-Cys-Arg-Val-Lys-Gly-Thr-Cys-Glu-Asn-Gly-Lys-Cys-Val-Cys-Gly-Ser, su masa molecular en estado reducido corresponde a 2,827.25 Da, presenta 6 residuos de cisteína que pueden formar 3 enlaces disulfuro.

Para la síntesis se utilizó un reactor de vidrio con filtro de vidrio poroso, el cual retiene la resina y permite la eliminación de restos de reactivos y solventes empleados a un matraz de residuos mediante vacío. El reactor fue silanizado durante 24 horas con SurfaSil™ al 10% en Tolueno, el cual reacciona directamente con los grupos polares de la superficie del reactor, lo que resulta en una superficie hidrofóbica resistente a uniones no específicas, lo que permite un óptimo manejo de la resina.

La síntesis química en fase sólida mediante la metodología N-Fmoc, se realizó para una cantidad meta de 100 mg de péptido crudo, lo que equivale a 0.0353 mmol. (0.0353 mmol=1 equivalente). Como soporte sólido se utilizó la resina NovaSyn TG^R HMP (NovaBiochem), compuesta de polietilenglicol (PEG) y poliestireno (PS), 90 μm tamaño de partícula, la cual tiene una substitución de 0.18 mmol/g, y tiene como extremo el ácido 4-(Hidroximetil)fenoxiacético, que permite obtener un péptido con el extremo C-terminal como ácido carboxílico.

La cantidad de resina usada fueron 200 mg, que se determinó de acuerdo a la substitución de la misma y la cantidad meta a obtener de péptido.

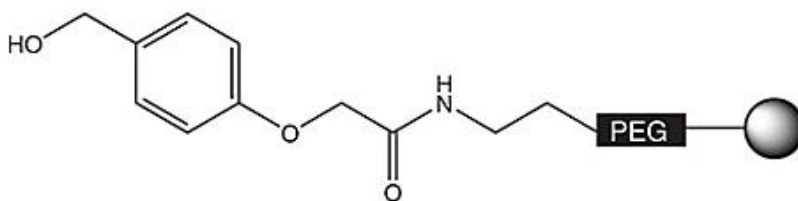


Figura 5. Resina NovaSyn TGR-HMP.

5.2 F-moc aminoácidos

Todos los aminoácidos utilizados en la síntesis tienen una pureza $\geq 98\%$ y como protector α -amino el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (F-moc). Los grupos protectores de la cadena lateral, y el peso de cada Fmoc-aminoácido se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 1. F-moc aminoácidos utilizados en la síntesis de Cn29. Se muestra los F-moc aminoácidos utilizados en la síntesis de Cn29 el grupo protector de la cadena lateral, y su peso molecular correspondiente.

Grupo protector	Fmoc-aminoácido	Peso molecular (g/mol)
Boc	Fmoc-Lys-Boc	468.6
	Fmoc-Ser-tBu	383.4
tert-butyl (tBU)	Fmoc-Thr-tBu	397.5
	Fmoc-Tyr-tBu	459.6
	Fmoc-Cys-Trt	585.7
Trifenilmetil (Trt)	Fmoc-Asn-Trt	569.7
	Fmoc-Arg-Pbf	648.8
2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf)		
t-butyl éster (OtBu)	Fmoc-Asp-OtBu	411.5
	Fmoc-Glu-OtBu	425.5
Sin grupo protector	Fmoc-Gly	297.3
	Fmoc-Leu	353.4
	Fmoc-Val	339.4

5.3 Incorporación del primer aminoácido a la resina

Después de haber solvatado la resina durante dos horas con dimetilformamida (DMF), se procedió a incorporar el residuo C-terminal mediante la técnica de anhídrido simétrico. Lo cual implica la esterificación del grupo hidroxilo de la resina con el anhídrido simétrico del F-moc-aminoácido en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP).

Para la formación del anhídrido simétrico se disolvió un exceso de 10 veces Fmoc-Ser-tBu-OH, (0.353 mmol = 138.024 mg) en el mínimo volumen de diclorometano (DCM), se agregaron 2 gotas de DMF para completar la disolución, luego se adicionaron 5 equivalentes (0.176 mmol = 28.2 μ l) de DIPCDI (Diisopropilcarbodimida), y la reacción se realizó durante 20 minutos a 0° C. Después, se evaporó el DCM a modo de rotavapor. El residuo seco obtenido se disolvió en DMF y se adicionó a la resina. Seguidamente, se adicionó 1 equivalente (0.0353 mmol = 4.39 mg) de DMAP también disuelto en DMF. Después de 1 hora de reacción a temperatura ambiente y en agitación constante por inversión, se eliminaron los excesos de reactivo realizando 10 lavados de 1 minuto con DMF, este procedimiento se realizó dos veces para obtener una óptima funcionalización de la resina. Por último, se realizaron 3 lavados con DCM y 3 lavados con metanol durante 1 minuto cada uno. Finalmente, la resina fue secada con vacío durante 10 minutos.

5.4 Funcionalización de la resina

Se determinó el porcentaje de incorporación del primer aminoácido sobre la resina, y por tanto su funcionalización inicial real, mediante la detección del aducto dibenzofulvenopiperidina que se forma al liberar el grupo F-moc con piperidina.

Este procedimiento se realizó a partir de dos pequeñas alícuotas de F-moc-aminoácido-resina seca, una de 1.8 mg (Muestra 1) y otra de 2.5 mg (Muestra 2), a cada una se adicionó 3 ml de piperidina al 20% en DMF y se agitaron suavemente durante 3 minutos. Se preparó un blanco que contenía únicamente la disolución de piperidina-DMF, y se midieron las absorbancias de cada una a $\lambda=290$ nm.

La funcionalización en mmol/g fue calculada a partir de las absorbancias y la tabla de referencia obtenida del manual del fabricante de la resina (Tabla 2), mediante la fórmula *Fmoc loading: mmole/g= ug mole F-moc/mg of resin.* El promedio de ambos valores indica la funcionalización inicial de la resina.

Tabla 2. Tabla de referencia para calcular funcionalización de resina

Fmoc μmol	Absorbancia	Fmoc μmol	Absorbancia
0.1	0.165	0.6	0.990
0.2	0.330	0.7	1.155
0.3	0.495	0.8	1.320
0.4	0.660	0.9	1.485
0.5	0.825	1.0	1.650

5.5 Desprotección del grupo F-moc

Para la desprotección del grupo α -amino se utilizó piperidina al 20% en DMF, la cual se adiciona al reactor que contiene la resina y permanece en agitación, primero durante 3 minutos, seguido de un ciclo de 20 minutos. Al terminar cada ciclo de desprotección la resina fue lavada 10 veces con DMF durante 1 minuto para eliminación de sub-productos de la reacción.

5.6 Acoplamiento

Para la activación del grupo α -carboxilo del aminoácido entrante se usaron HBTU y DIPEA como activadores, y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como aditivo para evitar la racemización de los aminoácidos. En una proporción Fmoc-a.a:HBTU:HOBt:DIPEA (1:0.9:0.9:2) Empleando 3 excesos en cada ciclo de acoplamiento. En un vial se disolvieron los equivalentes de cada F-moc aminoácido, HBTU, HOBt en 0.9 ml de DMF, se adicionó DIPEA y la reacción fue transferida al reactor de síntesis, el cual permaneció en agitación suave, ya que el fenómeno del acople se da por la difusión y la interacción entre el aminoácido activado y resina.

Una vez terminado el tiempo de reacción para el acoplamiento del aminoácido, se realizaron 10 lavados con DMF, cada uno durante 1 minuto y agitando manualmente, para eliminar los reactivos y el resto de aminoácido sin reaccionar.

El proceso de desprotección y acoplamiento se repitió hasta completar la secuencia del péptido deseado.

5.7 Monitoreo de acoplamiento y desprotección

5.7.1 Prueba de Kaiser

El ensayo de ninhidrina, ideado por Kaiser, es un método para detectar de forma cualitativa la presencia de grupos aminos primarios libres, utilizado al finalizar un acoplamiento y tras la desprotección del grupo α -amino.

Para realizar la prueba se introduce una muestra mínima de resina-péptido seca en un tubo de vidrio, se añade 1 gota de reactivo A (5 g de ninhidrina en 100 ml etanol), 1 gota de reactivo B (80 g de fenol en 20 ml de etanol) y una gota de reactivo C (2ml de 0.001 M de cianuro de potasio en 98 ml de piridina), luego se calienta a 120°C durante 3 minutos en Thermoblock. La ninhidrina reacciona con los grupos aminos obteniéndose una coloración azul púrpura, que indica la presencia de grupos amino primarios libres (positivo), una coloración amarilla indica la ausencia de estos (negativo), lo que asegura que la incorporación del aminoácido se ha producido.

5.7.2 Prueba de TNBS

La prueba del ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) permite la detección de aminos primarios, fue utilizada para monitorear el acoplamiento de Serina, Cisteína y Ácido aspártico ya que con estos aminoácidos la prueba de Kaiser no es muy clara. El TNBS reacciona con los grupos aminos, y produce una coloración naranja. Se adiciona una pequeña muestra de resina-péptido a un tubo de vidrio, se añaden 1 gota de DIPEA al 10 % en DMF y 1 gota de TNBS al 1 % en DMF y se dejan reaccionar durante 5 minutos. El cambio de color a naranja de la resina es indicativo de grupos aminos libres.

Al terminar de elongar la cadena peptídica, se eliminó el grupo F-moc del último aminoácido acoplado, para posteriormente separar el péptido de la resina. Es muy importante dejar la resina sin DMF por lo que se lava con DCM 3 veces durante 1 min, y después con metanol, de 3 a 5 lavados de 1 minuto cada uno, posteriormente se seca con vacío durante diez minutos. Ya que el objetivo es eliminar la mayor cantidad posible de DMF.

5.8 Separación del péptido de la resina

Primero, la resina fue secada al vacío en un concentrador Savant SpeedVac durante 4 horas para eliminar restos de los solventes usados durante la síntesis, principalmente DMF.

La separación del péptido de la resina y la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales se realizó por medio de acidólisis, utilizando Reactivo K (King et al., 1990) con ligeras modificaciones: se utilizó Ditiotreitól (DDT) como agente reductor, para prevenir la formación de puentes disulfuro intramolecular e intermolecularmente, en lugar de 1,2-Ethanedithiol (EDT). Se utilizó 1 ml de Reactivo K (84 % TFA, 5% Tioanisól, 5% Agua, 5% Fenól y 1% DDT) por cada 15 mg de péptido-resina. En este caso 300 mg de péptido-resina reaccionaron en 15 ml reactivo K. El tiempo de reacción fue de 1 hora a temperatura ambiente, y por cada Arginina presente en el péptido la reacción se prolongó 30 minutos más, para un tiempo total de dos horas, ya que el grupo Pbf de la Arginina suele requerir más tiempo para ser capturado.

Transcurrido el tiempo de reacción, la extracción del péptido se realizó, mediante goteo de la mezcla péptido- reactivo K en Métil tert-butil éter a 0°C, precipitando así el péptido. Usando 10 ml de Métil tert-butil éter por cada 1 ml de reactivo K. Todo el péptido se compactó en un pellet por centrifugación a 3500 rpm, durante 15 min, a 4°C, además se realizaron 3 lavados sucesivos con Métil tert-butil éter con los mismos parámetros, para después disolver los pellets de péptido obtenidos en ácido acético al 20%, para posteriormente ser liofilizados.

5.9 Plegamiento *in vitro*

El buffer para la formación de los puentes disulfuro se realizó con fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 20 mM, cloruro de sodio (NaCl) 0.1 M, Glutación reducido 5 mM, Glutación Oxidado 0.5 mM, a una concentración de 0.2 mg de péptido crudo por 1 ml de buffer, para evitar agregación y reacciones intermoleculares, ajustando a pH 7.9 con hidróxido de sodio (NaOH) 1M. La reacción se realizó durante 2 horas, y se detuvo ajustando a pH 3 con ácido fórmico.

Posteriormente la mezcla de reacción fue filtrada a través de un filtro de tapa de botella Corning® de 0.22 μm de poro con membrana de polietersulfona (PES) de baja adsorción de proteínas, con ayuda de vacío en un frasco de 500 ml, para la posterior purificación mediante HPLC.

5.10 Purificación por Cromatografía líquida de alta eficacia fase reversa

5.10.1 Escala preparativa

La purificación del péptido contenido en el buffer de plegamiento, se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia fase reversa (RP-HPLC), en un sistema Waters 600 HPLC, usando una columna de fase reversa C18 preparativa (10 μm , 22 mm x 250 mm), Vydac (Hesperia, CA, USA). Se utilizaron como solventes: acetonitrilo, agua y ácido trifluoroacético (TFA) pureza grado HPLC, para la preparación de los buffers usados, Buffer A (Agua, 0.12% TFA) y Buffer B (Acetonitrilo, 0.1% TFA).

El buffer de plegamiento que contenía el péptido, fue cargado a la columna a un flujo de 2.5 ml/min, Buffer de plegamiento 95%, Buffer B 5%. Posteriormente se realizó un lavado, con Buffer A 95%, Buffer B 5% durante 23 minutos, los primeros 20 minutos a un flujo de 2.5 ml/min, y durante los últimos 3 minutos el flujo subió a 5 ml/min.

Para la elución del péptido se utilizó un gradiente, 95% A, 5% B a 65% A, 35% B en 60 minutos, a un flujo de 5 ml/min. La elución fue monitoreada a 230 nm mediante el uso de un detector Waters 2487 UV-VIS (ultravioleta visible). Los picos que eluyeron del gradiente fueron colectados individualmente en vasos de precipitado de vidrio para ser analizados por espectrometría de masas, y ser liofilizados.

5.10.1 Escala analítica

La re-purificación del péptido, prueba de co-elución y determinación de enlaces disulfuro se realizó por HPLC a escala analítica en un sistema Waters 1525, usando una columna de fase reversa C18 analítica (5 μm , 4.6 mm x 250 mm), Vydac (Hesperia, CA, USA). Se utilizó un gradiente de 100% A, 0 %B a 40%A 60%B en 60 minutos. La elución se monitoreo a 230 nm en un detector Waters 2489 UV-VIS.

5.11 Cuantificación

Todas las estimaciones de péptido se realizaron en un equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer a $\lambda=280$ nm, tomando como referencia la Abs 1mg/ml=0.660 (valor teórico obtenido de ExPASy a partir de la secuencia de Cn29).

5.12 Espectrometría de masas y secuencia

Las determinaciones de masa molecular se realizaron por espectrometría de masas por electrospray en un equipo Thermo Scientific LCQ FLEET ESI mass spectrometer, y la secuencia por degradación de Edman en un equipo Shimadzu Biotech PPSQ-31A Protein Sequencer, todo el trabajo fue realizado por el Dr. Fernando Zamudio Zúñiga, del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca Mor., México.

5.13 Prueba de Co-elución

Para comprobar la identidad del péptido nativo con el sintético se realizó una prueba de Co-elución. Se realizaron corridas cromatográficas individuales (condiciones descritas anteriormente). Primero con 10 μg de la toxina nativa pura, posteriormente una corrida con 10 μg de toxina sintética, y finalmente una mezcla de 4 μg y 6 μg de la toxina nativa y sintética respectivamente.

5.14 Determinación de enlaces disulfuro

Para determinar los enlaces disulfuro de Cn29 se realizaron digestiones enzimáticas con endoproteasas, seleccionadas de acuerdo a la secuencia del péptido y a los fragmentos obtenidos después de la primera digestión. Los picos más significativos se analizaron por espectrometría de masas y secuencia de aminoácidos por degradación de Edman.

5.14.1 Digestión con Tripsina

La digestión con tripsina se realizó con 50 µg de Cn29 en 50 µl buffer Tris-HCl 50 mM pH 6.8, se le agregaron 4 µg de la enzima y la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 24 horas.

5.14.2 Digestión con Termolisina

Se seleccionó esta enzima por los resultados obtenidos de la digestión con tripsina. A los fragmentos de interés de la digestión realizada con Tripsina, se agregaron 40 µl de buffer de digestión de Termolisina (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 1 mM CaCl₂), y se incubó con 2 µg de la enzima a 70°C durante 4.5 horas.

Se realizó una segunda digestión con Termolisina de los fragmentos resultantes de la anterior digestión con 2.5 µg de la misma enzima y condiciones, pero incubando a 70°C durante 24 horas.

Los detalles se encuentran en el apartado de resultados.

5.15 Predicción *in silico* de estructura secundaria y accesibilidad al solvente de Cn29

La predicción *in silico* de la estructura secundaria de Cn29 y accesibilidad al solvente se realizó a través del servidor de predicción de estructura y función de proteínas I-TASSER (Iterative Threading ASSEmblly Refinement), el cual realiza la predicción a partir de la secuencia problema, mediante la búsqueda e identificación de 10 plantados estructurales (secuencias con estructuras resultas) con mayor similitud en el Banco de Datos de proteínas (Protein Data Bank, PDB) (J Yang et al., 2015).

5.16 Modelos de estructura terciaria de Cn29

I-TASSER generó cinco modelos de la estructura tridimensional del péptido Cn29 a partir de los templados estructurales identificados del banco de datos de proteínas (PDB). Cada uno de los modelos generados tiene un C-score, que es un estimado de la calidad de los modelos predichos y es calculado basándose en la significancia de los alineamientos (Z-score), y la convergencia de las simulaciones (Ambrish, Alper & Yang, 2010). Los puntajes del C-score se encuentran en un intervalo -5 a 2, un puntaje más alto refleja un modelo de mayor confianza. Los modelos finales fueron visualizados con el software Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

6. Resultados

6.1 Eficiencia de síntesis del péptido Cn29

Para la resina con una sustitución inicial de 0.18 mmol/g se obtuvo una funcionalización de 0.1525 mmol/g.

A partir de la sustitución en la formula *Fmoc loading: mmole/g= ug mole F-moc/mg of resin*

La muestra 1 tuvo una absorbancia de 0.431, de acuerdo a la tabla de referencia corresponde un valor de 0.261.

Fmoc loading: mmole/g=0.261 ug mole F-moc /1.8mg

Fmoc loading= 0.145 mmole/g

La muestra 2 se obtuvo una absorbancia de 0.66; de acuerdo a la tabla y sustituyendo en la formula

Fmoc loading: mmole/g=0.4 ug mole F-moc /2.5mg

Fmoc loading: 0.16 mmole/g

Obteniendo el promedio de ambos valores: *0.145 mmole/g+0.16 mmole/g*

2

Fmoc loading=0.1525 mmole/g

Con esta funcionalización es posible obtener hasta 84.7 mg de péptido crudo. La cantidad resultante de la síntesis fueron 84 mg, lo que significó prácticamente un 100% de rendimiento de péptido crudo. Al analizarse por HPLC el péptido esperado tuvo un tiempo de retención de 25.98 minutos, y se determinó una masa molecular de 2,827.19 Da, que corresponde al peso molecular de Cn29 en estado reducido. (Figura 6)

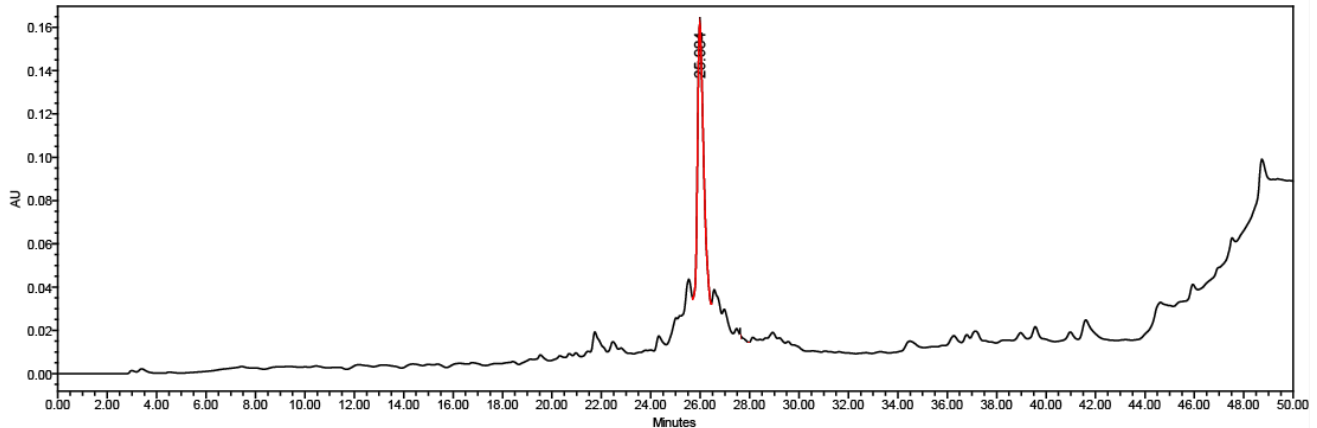


Figura 6. Cromatograma de Cn29 . 50 µg de péptido Cn29 se cargó en una columna C18 analítica, se corrió un gradiente de 0 a 60%B en 60 min, a un flujo de 1 ml/ml, la elución fue monitoreada a $\lambda=230$ nm. El componente que eluyó a los 25.98 min, corresponde al péptido Cn29 reducido (indicado en rojo).

6.2 Plegamiento y purificación

El péptido crudo se plegó *in vitro* en dos partes primero una muestra de 38 mg de péptido crudo, se disolvieron en 190 ml de buffer de plegamiento, de acuerdo protocolo descrito anteriormente (**5.9 Plegamiento *in vitro***). Al terminar la reacción de plegamiento, la muestra se cargó directamente a una columna C18 preparativa, y se corrió un gradiente de 5 a 35% de B en 60 min, obteniendo 3 picos principales, que se muestran en el siguiente cromatograma (Figura 7).

A los 43.00 min eluyó el primer pico, determinándose dos masas moleculares de 2,822.05 Da y 3,128.6 Da, el segundo pico a los 45.350 min, masas moleculares 2,824.14 Da, 2,708 Da, y un último pico a los 53.55 minutos, 2,821.20 Da que corresponde a la masa molecular de Cn29 plegado correctamente.

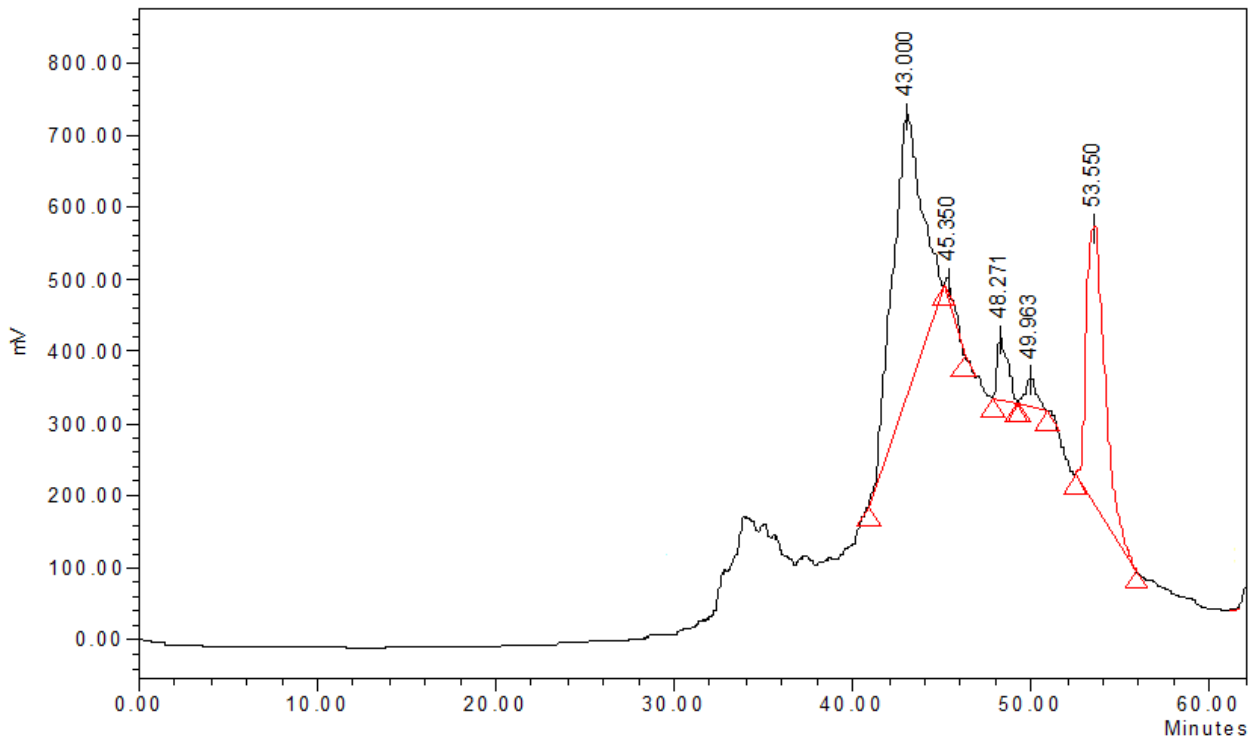


Figura 7. Purificación de Cn29. Al terminar la reacción de plegamiento la muestra de cargo directamente en la columna C18 preparativa a un flujo de 2.5ml/min y se eluyó con un gradiente de 5% a 35% B en 60 minutos, a un flujo de 5 ml/min, la elución fue monitoreada a $\lambda=230$ nm. El pico que eluyó a los 53.55 min corresponde al péptido Cn29 plegado correctamente (indicado en rojo).

La segunda muestra del péptido plegada fueron 43 mg en 215 ml de buffer de plegamiento; colectando los mismos picos en la purificación por HPLC; se determinaron las mismas masas moleculares. En ambas muestras los picos principales que eluyen antes del minuto 53.4 muestran diferencias de 1 o 2 Da de peso molecular con respecto al peso molecular del péptido Cn29 correctamente plegado.

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos después de plegamiento *in vitro* de Cn29.

Tabla 3. Productos obtenidos después de plegamiento *in vitro*, del péptido Cn29. Se muestra el tiempo de retención, el peso molecular y la cantidad de cada componente obtenido después de la reacción de plegamiento del péptido Cn29. El componente eluido a los 53.55 min corresponde a Cn29 plegado correctamente obteniendo 4.188 mg.

Tiempo de retención (min)	Masa molecular (Da)	Cantidad obtenida (mg)
43.00	2,822.05	2.6
	3,128.6	
45.35	2,824.14	3.6
	2,708	
53.55	2,821.20	4.188

6.3 Prueba de co-elución

Para comprobar que el péptido Cn29 sintético es exactamente igual al péptido nativo, se realizaron tres corridas cromatográficas bajo las mismas condiciones, en la primera se aplicaron 10 µg de péptido Cn29 nativo, obteniendo un solo componente que eluye a los 31.091 min (Fig 8), en la segunda se aplicaron 10 µg de Cn29 obtenido por síntesis química obteniendo igualmente un solo componente que eluye prácticamente al mismo tiempo que el péptido nativo, 31.093 min (Fig 9), la corrida cromatográfica final fue una mezcla de 4 µg Cn29 nativo + 6 µg Cn29 sintético que co-eluyen en un solo pico a los 31.166 min (Fig 10), estos resultados comprueban la identidad estructural del péptido nativo y el sintético. Se muestran los cromatogramas individuales de cada caso, y uno que resume las tres corridas cromatográficas (Fig 11)

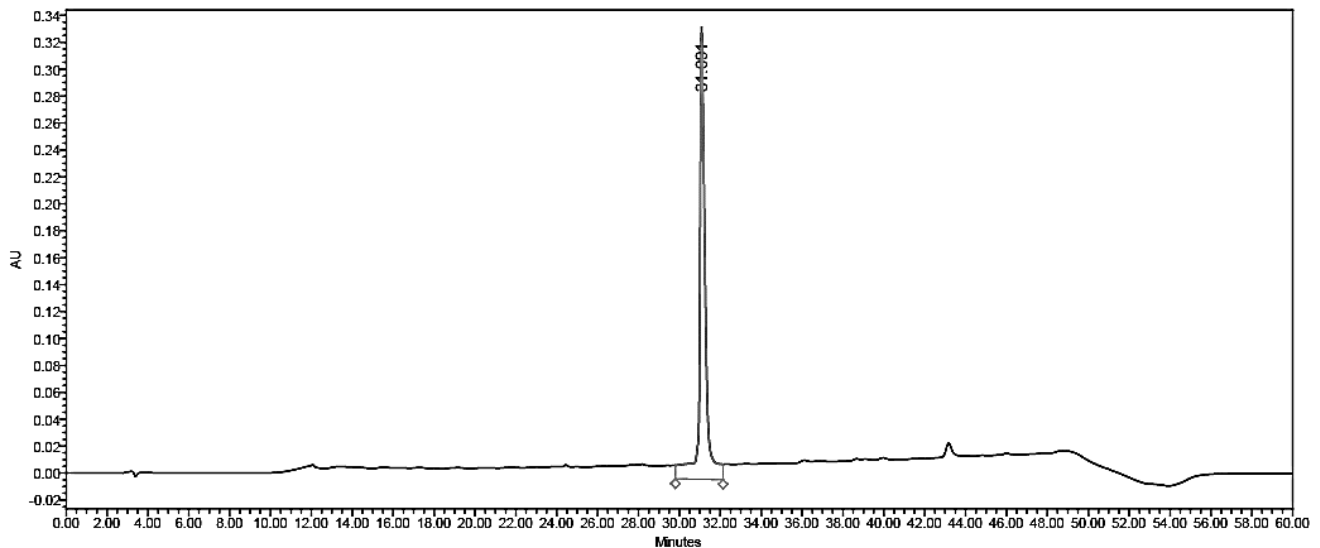


Figura 8. HPLC del péptido Cn29 nativo, 10 µg de péptido Cn29 nativo, se cargaron en una columna C18 analítica, y se eluyo con un gradiente de 0 a 60%B en 60 min, a un flujo de 1 ml/ml, elución monitoreada a $\lambda=230$ nm, el péptido Cn29 nativo eluyó a los 31.09 min.

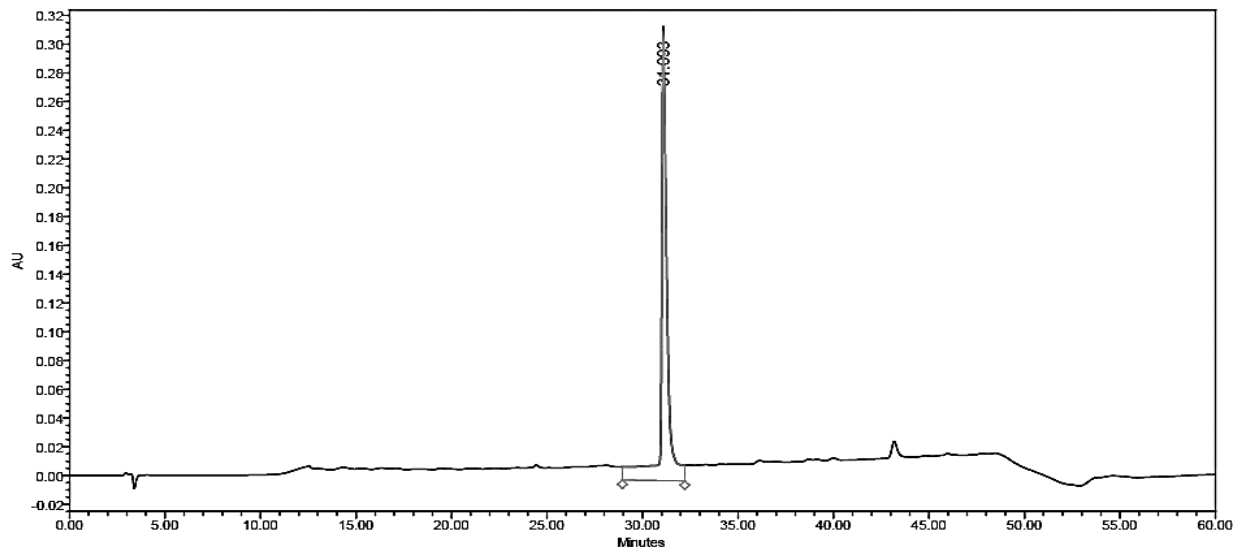


Figura 9. HPLC del péptido Cn29 sintético. 10 µg de péptido Cn29 sintético se aplicaron en una columna C18 analítica y se eluyo con un, gradiente de 0 a 60%B en 60 min, a un flujo de 1 ml/ml, elución monitoreada a $\lambda=230$ nm, Cn29 sintético eluyó a los 31.16 min

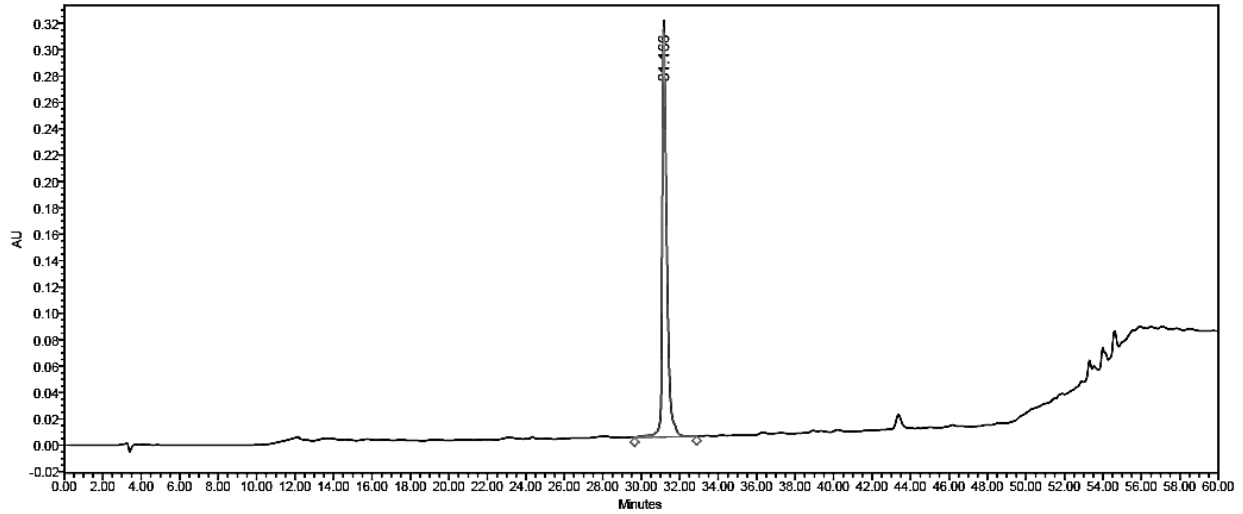


Figura 10. HPLC de la mezcla de Cn29 nativo y sintético-, Una mezcla de 4 μg de péptido Cn29 nativo + 6 μg Cn29 sintético, se aplicaron a una columna C18 analítica y se corrió un gradiente de 0 a 60%B en 60 min, a un flujo de 1 ml/ml, la elución se monitoreo a $\lambda=230$ nm. Se obtuvo un solo pico a los 31.16 min, lo que indicaría la identidad estructural entre el péptido nativo y el sintético.

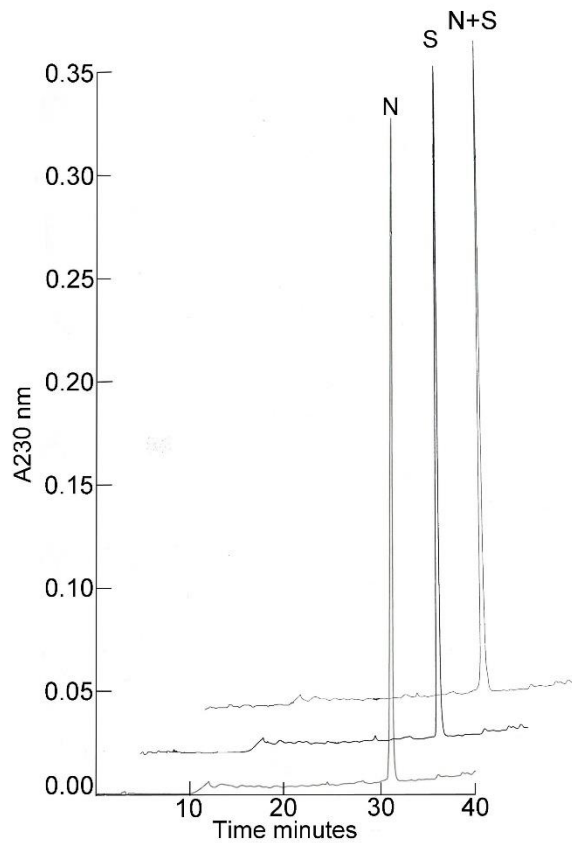


Figura 11. Cromatograma que resume las 3 corridas cromatográficas, N: Cn29 nativo, S: Cn29 sintético, N+S: Cn29 nativo + sintético.

6.4 Determinación de enlaces disulfuro

De la digestión del péptido Cn29 con Tripsina se obtuvo un pico principal con tiempo de retención 22.50 min, y masa molecular 2,647 Da (Fig 12), En la tabla 4 se detalla la secuencia obtenida de este componente.

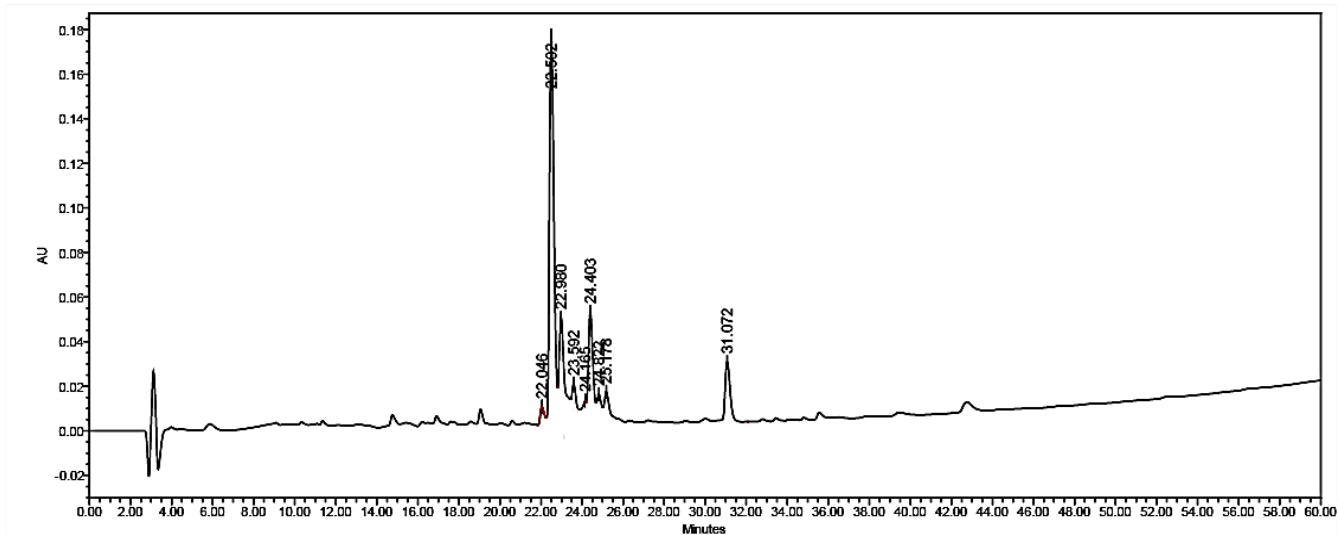


Figura 12. Digestión del péptido Cn29 con Tripsina. 50 µg de Cn29, se digirieron con 4 µg de tripsina en 50 ul de buffer Tris-HCl 50 mM pH 6.8 a 37°C por 24 horas, los productos de digestión se separaron en una columna C18 analítica con un gradiente de 0 a 60%B en 60 min, a un flujo de 1 ml/ml, elución monitoreada a $\lambda=230$ nm. el componente que eluyó a 22.50 min, tiene masa molecular de 2,647 Da.

Tabla 4. Tabla de fragmentos obtenidos de la digestión de Cn29 con Tripsina. Se muestra el peso molecular y la secuencia de aminoácidos de los principales productos obtenidos de la digestión de Cn29 con tripsina

Tiempo de retención (min)	Masa molecular (Da)	Secuencia
22.502	2,647.94	LCLSCR- GGDYDCR- GTCENK- CVCGS
31.072	2821.05	LCLSCRGGDYDCRVKGTCENGKVCVGS

La secuencia del péptido con tiempo de retención 22.502 min nos muestra que obtuvimos cortes del péptido en el C-terminal de Arg6, Arg13, Lys15 (perdiéndose el dipéptido Val14-Lys15) y Lys22 (tabla 4) no pudiendo inferir la posición de los puentes de disulfuro, debido a que los péptidos aún se encuentran unidos por estos enlaces. El componente eluido a los 31.07 min corresponde al péptido Cn29 sin digerir. Para poder elucidar la posición de los puentes de disulfuro se decidió digerir el péptido hidrolizado por tripsina con Termolisina de la digestión resultante de este fragmento de masa molecular 2,647 Da, se obtuvieron 3 picos principales, detallados en el cromatograma de la figura 13 y en la Tabla 5.

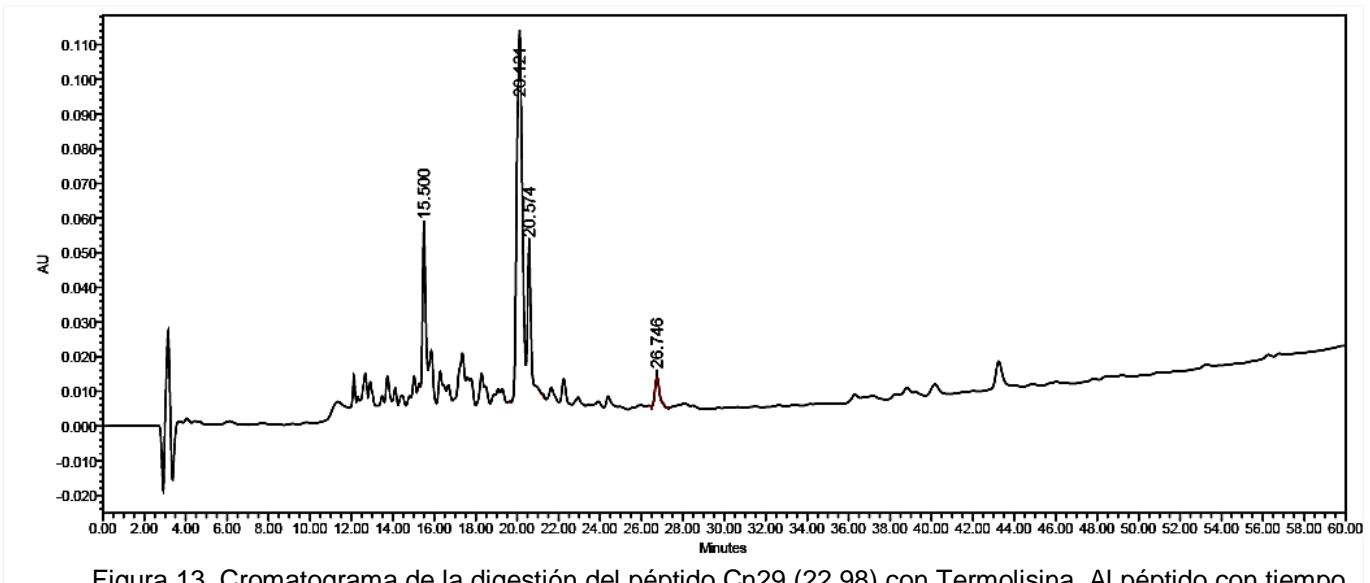


Figura 13. Cromatograma de la digestión del péptido Cn29 (22.98) con Termolisina. Al péptido con tiempo de retención 22.98 de la digestión de Cn29 con tripsina se le agregaron 40 μ l buffer Tris-HCl 50 mM pH 6.8 con 1 mM de CaCl_2 y 2 μ g de Termolisina, la mezcla se incubó a 70°C por 4.5 hrs. Los productos de digestión se separaron en una columna C18 analítica con un gradiente de 0 a 60 % de B en 60 min. a un flujo de 1 ml/ml, la elución fue monitoreada a 230 nm, se obtuvieron 3 picos principales con tiempos de retención 15.5 min, 20.1 min, 20.5 min.

Tabla 5. Tabla de fragmentos obtenidos de digestión con Termolisina del pico con tiempo de retención 22.502 Da, masa molecular 2,747.94 Da. Se muestra el peso molecular y la secuencia de aminoácidos de los principales fragmentos obtenidos de la digestión con Termolisina.

Tiempo de retención(min)	Masa molecular (Da)	Secuencia
15.5	1,182	LSC ⁵ R- GTC ¹⁸ ENGK
20.1	1,481	---
20.5	1,337	---

A partir de la secuencia obtenida del fragmento que eluyó a los 15.5 min se observó que la Termolisina corto en el extremo N-terminal de la Leu3 y en el N-terminal de la Gly21 por lo que se determinó el primer enlace disulfuro entre el par Cys5-Cys18. Los otros dos picos principales no fue posible secuenciarlos por la poca cantidad de muestra, pero a partir de la secuencia de Cn29 y la masa molecular de los péptidos obtenidos, y los sitios de corte de la enzima (extremo amino terminal de Leu, Gly y Val), se infirieron las posibles combinaciones de los 2 puentes de disulfuro restantes del fragmento que eluyó a los 20.1 min con un peso molecular de 1,481 Da nos da una posible secuencia LC-GGDYDCR-CVCGS con la posibilidad de los enlaces disulfuro Cys2-Cys23 y Cys12-Cys25 o Cys2-Cys25 y Cys12-Cys23 y el fragmento con un tiempo de retención de 20.5 min con un peso molecular de 1,337 una posibilidad de secuencia LC-GYDCR-CVCG, LCGGDYDCR-CVC, ambas con las mismas combinaciones posibles de los enlaces disulfuro, por lo que con esta información no era posible determinar los 2 enlaces disulfuro restantes, estos picos se digirieron con la misma enzima Termolisina, pero durante más tiempo. El cromatograma resultante se muestra a continuación (Fig. 14)

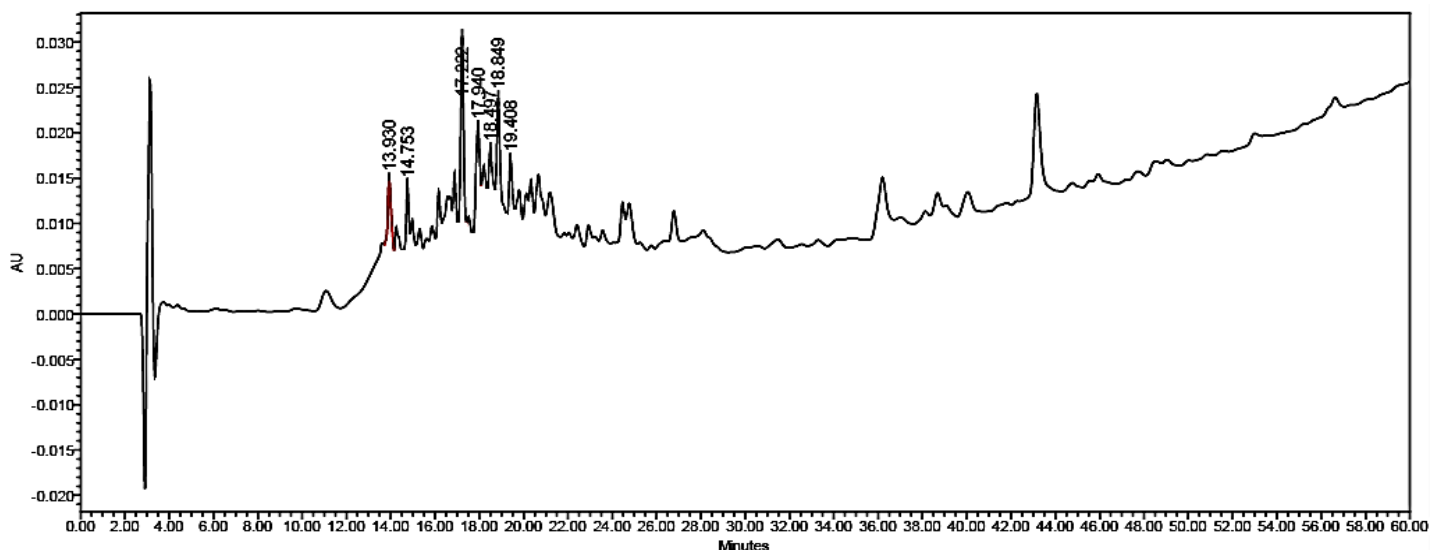


Figura 14. Cromatograma digestión con Termolisina, de los fragmentos con tiempo de retención 20.1 min y 20.5 min, Los péptidos obtenidos de la digestión con Termolisina por 4.5 h con tiempo de retención 20.1 y 20.5 de, se disolvieron en 50 μ l de buffer Tris-HI 50 mM pH6.8 con 1mM de CaCl_2 y 4 μ g de Termolisina y se incubaron a 70°C por 24 h, los productos de esta digestión se separaron en una columna C18 analítica con un gradiente de 0 a 60%B en 60 min, a un flujo de 1 ml/ml, elución monitoreada a $\lambda=230$ nm, los picos principales con tiempos de retención 17.1 min, 17.9 min fueron analizados

Tabla 6. Fragmentos obtenidos de la digestión con Termolisina de los picos 20.1 min y 20.5 min. Se muestran los pesos moleculares y secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos de la digestión con Termolisina de los fragmentos 20.1 y 20.5.

Tiempo de retención(min)	Masa molecular (Da)	Secuencia
17.1	773.4	YDC ¹² R VC ²⁵
17.9	1,002	---
	1,108	---

El fragmento que eluyó a los 17.1 dio una secuencia de aminoácidos que indica que la Termolisina corto en el extremo amino terminal de la Val24, liberando así el péptido YDCR-VC unido por un puente disulfuro confirmando el segundo enlace disulfuro entre el par Cys12-Cys25. El pico que eluyó a los 17.9 minutos tiene dos componentes uno con un peso molecular de 1,002 Da, infiriendo que podrían ser el dipéptido GGDYDCR-VC ó el péptido GDYDCR-VCG, a ambos corresponde el mismo peso molecular, que formarían el enlace Cys12-Cys25, y otro fragmento con un peso molecular de 1,108 Da

de masa molecular, que podría corresponder al péptido LC-YDCR-CVC unido por los puentes disulfuro Cys2-Cys-23 y Cys12-Cys25, confirmando de este modo la posición de los puentes de disulfuro presentes en Cn29

De acuerdo al análisis de los fragmentos obtenidos de las digestiones, los enlaces disulfuro determinados corresponden a Cys2- Cys23, Cys5-Cys18 y Cys12-Cys25, por la posición de cisteínas en la secuencia, y de acuerdo al orden un patrón Cys1- Cys5, Cys2- Cys4 y Cys3-Cys6, como se muestra (Fig. 15).

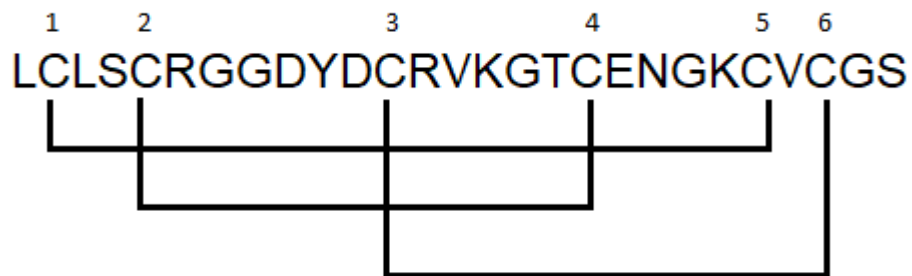


Figura 15. Patrón de enlaces disulfuro de Cn29, acuerdo a la posición de cisteínas en la secuencia Cys1- Cys5, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys6.

6.5 Predicción estructura secundaria y accesibilidad al solvente de Cn29

6.5.1 Predicción de estructura secundaria

Para realizar la predicción de estructura secundaria I-TASSER selecciona 10 templados estructurales con mayor similitud en secuencia a Cn29, en la tabla 7 se muestran estos 10 templados cada uno identificado con su clave de Protein Data Bank (PDB), Iden1 corresponda al porcentaje de identidad e Iden2 al porcentaje de similitud entre la secuencia problema y el templado, Cov: Cobertura, que es igual al número de residuos alineados entre la longitud de la secuencia problema, cada alineamiento tiene también un valor Norm. Z-score, el cual si es mayor a 1 indica un buen alineamiento, y el valor más alto corresponde al mejor (Yang, J., & Zhang, Y, 2015), la entrada **1JLZ** es la más significativa por su Norm Z-Score=2.62, y corresponde a la toxina Tc1 aislada del alacrán *Tityus cambridgei* la cual tiene un 41% de identidad, y 48% de similitud respectivamente con Cn29. Las demás entradas corresponden a **6BXB** que corresponde a la estructura de la integrina B3 P33, **1H9H** Complejo de EETI-II (inhibidor de Tripsina II de *Ecballium elaterium* con Tripsina porcina), **4G1E** Estructura cristalizada de la integrina α -v- β -3, **2K9O** estructura de la toxina Vm24 del escorpión *Vaejovis mexicanus smithi*, **3K6S** estructura del ectodominio de la integrina α -X β -2, **6ATN** α -KTx 4.5 del escorpión *Tytilus costatus*, **1SIS** Insecto-toxina I5A toxina del escorpión *Mesobuthus eupeus*, **2NLH** Beta defensina-1 humana, **1ZIN** enzima adenilato quinasa con unión a P1,P5-Di(adenosina-5') pentafofato (AP5A).

Tabla 7. Tabla de los 10 templados seleccionados por I-TASSER para la predicción de estructura secundaria de Cn29, Rank: Top 10 de templados, PDB Hit: Clave de acceso en Protein Data Bank, Iden1: Identidad, Iden2: Similitud, Cov: Cobertura, número de residuos alineados entre la longitud de la secuencia problema, Norm. Z-Score: Es un valor normalizado de puntuaciones-Z, un valor mayor a 1 indica un buen alineamiento, el mejor corresponde al valor más alto, por último se muestra la secuencia de Cn29 alineada con la secuencia de los templados seleccionados, los residuos que son idénticos se encuentran coloreados basado en el esquema de color de las propiedades de los aminoácidos.

Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	20
						Sec.Str CSSSSCCCCSSSSSSSSCCSSSSCC
						Seq LCLSCRGGDYDCRVKGTCENGKVCVCGS
1	6bxbA	0.46	0.44	0.96	1.33	EC-SPREGQPVC SQRGEC LCGQCVCHS
2	1h9hI	0.35	0.37	0.85	1.52	---GCPRIILIRCKQSDCLAG-CVCGP
3	4g1eB	0.44	0.48	0.93	2.05	TCMS SNG--LLCSGRGKCECGSCVCIQ
4	2k9oA	0.41	0.44	1.00	1.12	AAISCVGSPEKCRANGKCMNRKCKCY
5	1jlzA	0.48	0.41	0.85	2.62	ACGSCR---KKCKGSGKCIINGRCKCY-
6	3k6sB	0.37	0.37	1.00	1.28	LEGSCRKNSIIC SGLGDCVCGQLCHT
7	6atnA	0.42	0.44	0.96	1.29	INVKCRGSP-ECKSAGKCMNGKCKCYP
8	1sisA	0.30	0.30	1.00	1.86	MCMPCF TDDCCGGNGKCFGPQCLCNR
9	2nlhA	0.46	0.37	0.96	1.10	NCVS-SGGLYSCKIAGTCYRGKAKCKK
10	1zinA	0.31	0.30	0.96	1.81	ICRNC-GATYHLIFHPPAKPGVCKCGG

A partir del análisis realizado a partir de estos templados, el servidor I-TASSER indica que la estructura secundaria del péptido Cn29 se podría conformar principalmente por hebras beta, una primera por los cuatro residuos de aminoácidos Cys2, Leu3, Ser4, Cys5, la siguiente por siete residuos, Cys12, Arg13, Val14, Lys15, Gly16, Thr17, Cys18, y una tercera por 3 residuos Lys22, Cys23, Val24, no hay predicción de α -hélice, y el resto de aminoácidos se presentan como random coils.

```

                20
                |
Sequence  LCLSCRGGDYDCRVKGTCENGKVCVCGS
Prediction CSSSSCCCCSSSSSSSSCCSSSSCC
Conf.Score 905533887340577576298287088
          H:Helix; S:Strand; C:Coil

```

Figura 16. Predicción de estructura secundaria de Cn29. Se muestra la secuencia de aminoácidos del péptido Cn29, y debajo se indica la predicción de la estructura, H: hélice, S: Hebra- β , C: Coil, por último el puntaje de confianza, un valor más alto indica mayor probabilidad de que el residuo pueda formar esa estructura.

6.5.2 Predicción de accesibilidad al solvente

La predicción de accesibilidad al solvente es calculada por I-TASSER a partir de las características de cada aminoácido que compone la secuencia, y los templados estructurales seleccionados, y mide el grado de exposición de cada residuo en el solvente (agua). 0 indica un residuo con exposición mínima o nula, encontrándose en el interior del péptido, y 9 indica una alta exposición. De acuerdo a la predicción, 8 residuos: Leu1, Arg6, Gly7, Gly8, Asp11, Glu19, Asn20, Ser27 tienen una exposición de 50% o más, los que tendrían el mayor contacto con el solvente y el resto con valores de predicción menores del 50%, siendo poco accesibles.

	20
Sequence	LCLSCRGGDYDCRVKGTCENGKCVCGS
Prediction	623415545241424331753413358
	Values range from 0 (buried residue) to 9 (highly exposed residue)

Figura 17. Predicción de accesibilidad al solvente del péptido Cn29. Se indican los valores de exposición al solvente de cada residuo de aminoácido de Cn29. 0 indica un residuo con exposición mínima o nula, encontrándose en el interior del péptido, y 9 indica una alta exposición.

6.6 Modelos tridimensionales de Cn29

Los 5 modelos del péptido Cn29 generados por I-TASSER y visualizados con PyMol se muestran en representación de listones, los átomos de la cadena lateral de cada cisteína se despliegan en representación de tiras para visualizar su posición y los enlaces disulfuro. Ninguno de los 5 modelos generados tiene los 3 enlaces disulfuro, y el modelo 2 y 3 tienen el mejor C-score: -1.34, siendo este último el mejor, ya que tiene los enlaces Cys5-Cys18 y Cys12-Cys25 y esta estructuralmente conformado por dos hebras- β . Se resalta que en el modelo 1 y 4 no hay ningún enlace disulfuro, y no están plegados, son random coils.

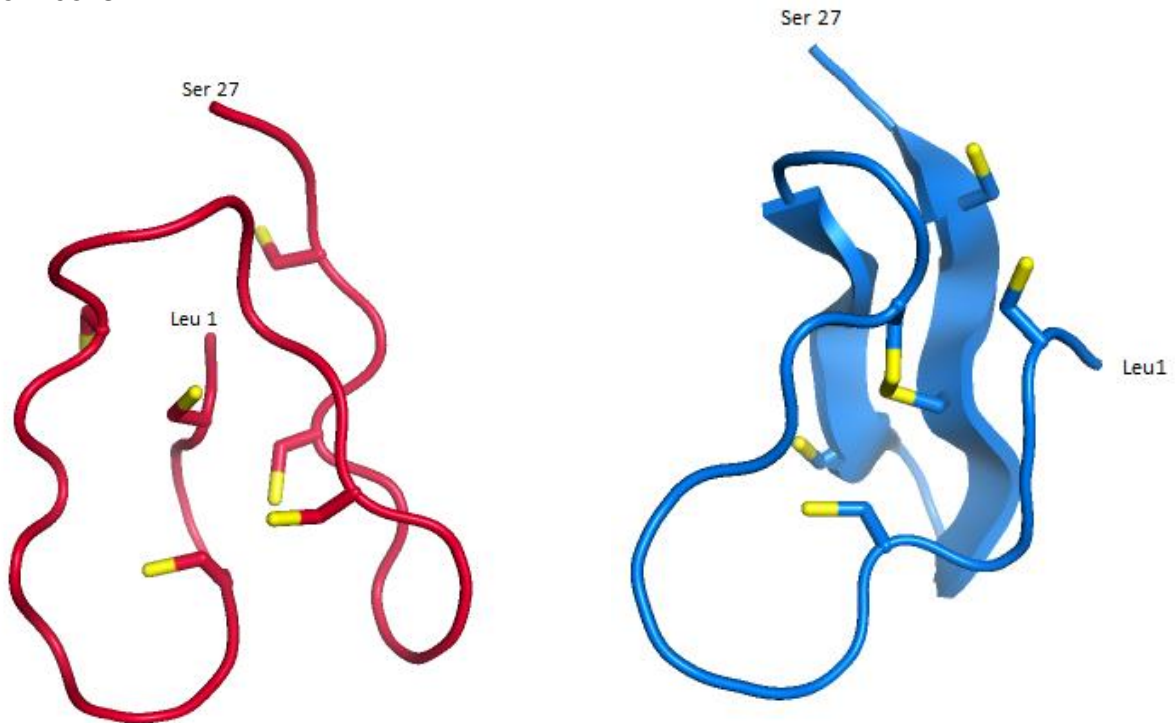


Figura 18. Modelo 1 (rojo) y 2 (azul) de Cn29 generados por I-TASSER; en representación de listones, se muestran etiquetados el primer aminoácido (Leu 1) y el último (Ser27). El modelo 1 tiene un C-score: -1.37, sin embargo no presenta ningún enlace disulfuro, y no hay plegamiento; el modelo 2 tiene dos hebras- β una primera formada por los residuos Cys18, Thr17, Gly16, y una segunda por Lys22, Cys23, Val24, Cys25, aunque el C-score es alto: -1.34 el plegamiento es incorrecto, ya que solo tiene un enlace disulfuro entre Cys12-Cys23.

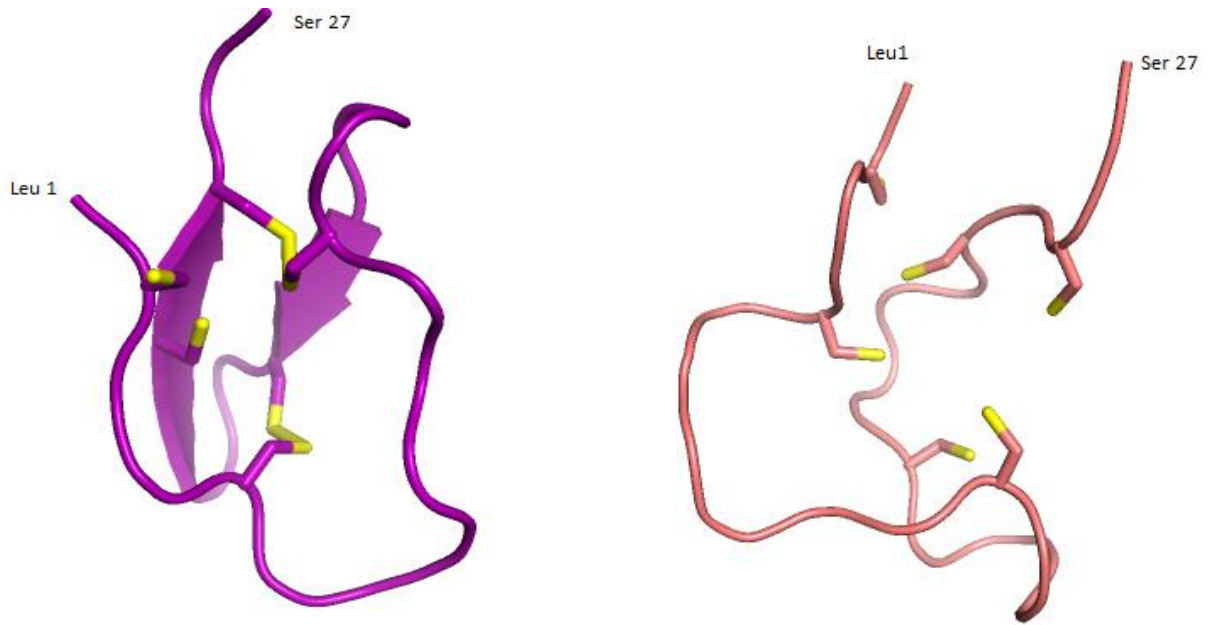


Figura 19. Modelo 3 (purpura) y 4 (rosa) de Cn29. El modelo 3 presenta únicamente dos enlaces disulfuro (amarillo), Cys12-Cys-25, Cys5-Cys18, las cisteínas en la posición 2 y 23 no se encuentran formando el enlace; estructuralmente se conforma por dos hebras-B la primera por los aminoácidos Gly16, Thr17, la segunda por Gly21, Lys22, Cys23, Val24, tiene un C-score: -1.34. El modelo 4 no tiene plegamiento, se presenta como random coil, y las cisteínas no forman ningún enlace disulfuro, este modelo tiene un C-score: - 5.

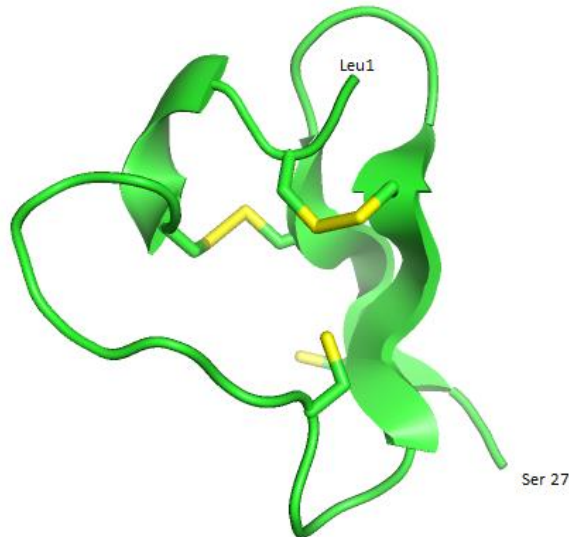


Figura 20. Modelo 5 de Cn29 generado automáticamente por I-TASSER; Los enlaces disulfuro (amarillo) y corresponden a Cys2-Cys18, Cys5-Cys23, las Cys12 y Cys25 no se encuentran formando los enlaces. Se generó una pequeña α -hélice por los residuos Leu3, Cys4, Ser5, y dos laminas β , la primera por los residuos Lys15, Gly16, Thr17, Cys18, y una segunda por los residuos Lys22, Cys23, Val24, Cys25. Aunque esta plegado, este modelo tiene un C-Score -5.

6.7 Estructura terciaria de Cn29 resulta por resonancia magnética nuclear

La estructura terciaria de Cn29 fue resuelta por métodos de resonancia magnética nuclear (RMN). El trabajo fue realizado por la Dra. Muriel Delepierre en el Instituto Pasteur, Paris, Francia. Cn29 consiste de una pequeña alfa hélice constituida por los residuos Tyr10, Asp11, Cys12, Arg13, Val14, y una horquilla beta, la primera lámina beta conformada por los residuos de aminoácidos Thr17, Cys18, Glu19, la continua por Lys22, Cys23, Val24. La estructura confirma el ensamble de enlaces disulfuro obtenidos experimentalmente Cys2-Cys23, Cys5-Cys18 y Cys12-Cys25 que se encuentran conectando los elementos de estructura secundaria.

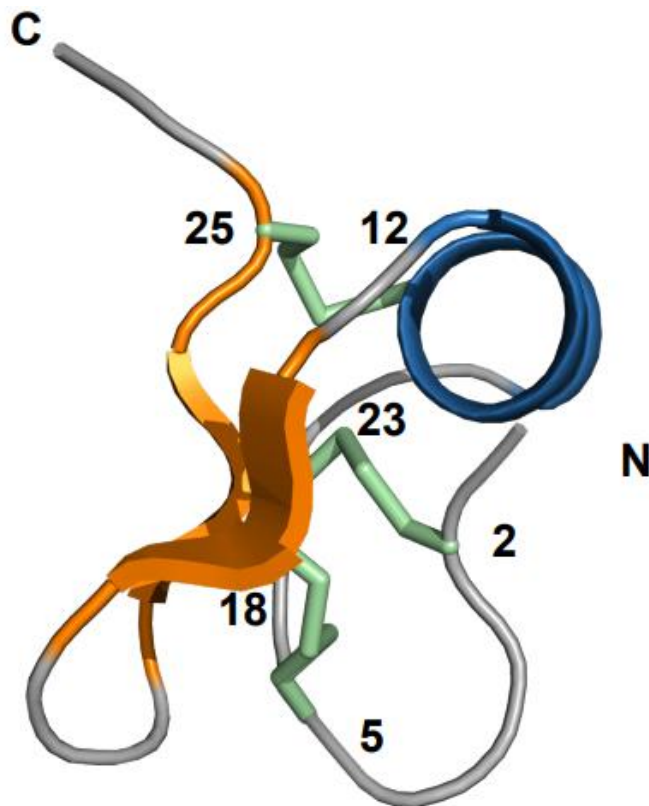


Figura 21. Estructura tridimensional de Cn29, en azul la pequeña α -hélice conformada por los residuos Tyr10, Asp11, Cys12, Arg13, Val14, en anaranjado se observan las hebras- β , la primera conformada por los residuos Thr17, Cys18, Glu19, y la continua por Lys22, Cys23, Val24, en gris las regiones no estructuradas, finalmente en verde se muestran los enlaces disulfuro Cys2-Cys23, Cys5-Cys18 y Cys12-Cys25.

7. Discusión

En esta tesis se realizó parte de la caracterización de un péptido recientemente identificado en el veneno del escorpión *Centruroides noxius* al que se ha nombrado Cn29. Mediante SPPS Fmoc se obtuvo el péptido sintético, y se comprobó el correcto plegamiento mediante espectrometría de masas y la prueba de co-elución por HPLC. Durante la síntesis no se presentaron dificultades de acoplamiento, y en la identificación del péptido crudo por HPLC escala analítica se observó la presencia de una mínima parte de otros productos que pueden corresponder a péptidos truncados generados durante la síntesis. El rendimiento final de la síntesis fue de ~4% (a partir de la cantidad inicial de resina), una causa fue la poca solubilidad del péptido sintético durante la reacción de plegamiento, por los residuos hidrofóbicos presentes en su secuencia, perdiendo un porcentaje del producto por su precipitación durante la filtración. Un hecho importante de evidenciar es, un aumento en el tiempo de retención en la columna C18, después del plegamiento, como consecuencia de la exposición de regiones más hidrofóbicas.

Una parte del péptido sintético no se plegó correctamente, lo cual es otro de los factores que afectaron el rendimiento, durante la purificación por HPLC a escala preparativa, se aprecian dos picos que corresponden a péptidos con diferencias de masa molecular, +1 y +3 Da, en el primer caso probablemente debido a una desaminación de la asparagina (+1 Da), que puede ocurrir cuando el péptido permanece tiempos largos en soluciones, y en el segundo caso de la misma manera, y probablemente sin la formación de un enlace disulfuro (+2 Da). Estos péptidos tuvieron una diferencia de ~10 minutos menos en el tiempo de retención que Cn29, sugiriendo un cambio estructural respecto al plegamiento nativo, exponiendo regiones menos hidrofóbicas, además de no ser un pico homogéneo. De estas observaciones realizadas se sugiere monitorear el péptido por HPLC durante la reacción de plegamiento, para evitar ser dejado más tiempo del necesario en solución y purificar a la brevedad.

El análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia de Cn29 no muestra relación con ninguna toxina de escorpión u otros animales venenosos, y de los 10 templates estructurales seleccionados por el servidor I-TASSER para realizar la predicción de estructura secundaria y los modelos tridimensionales, únicamente 4

corresponden a toxinas de escorpión, Vm24 (PDB: 2K9O) del escorpión *Vaejovis mexicanus*, α -KTx 4.5 (PDB: 6ATN) de *Tityus costatus*, Insecto-toxina I5A (PDB: 1SIS) *Mesobuthus eupeus*, y Tc1 (PDB:1JLZ) de *Tityus cambridgei*, siendo esta última la más significativa; Un alineamiento entre la toxina Tc1 y Cn29 tiene un 40.7% y 48.1% de identidad y similitud respectivamente, conservándose 11 residuos.

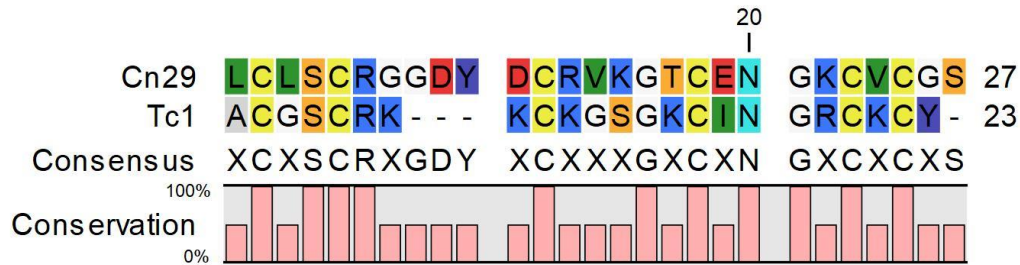


Figura 22. Alineamiento de secuencia entre Cn29 y Tc1. Tc1 tiene 23 residuos de aminoácidos, por lo que el alineamiento tiene 4 espacios, conservándose 11 residuos, los cuales se indican como 100% en la sección "Conservation"

El resultado de la predicción de estructura secundaria realiza por I-TASSER, coincidió con la estructura resuelta por resonancia magnética nuclear en los residuos Lys22, Cys23, Val24 que se encuentran conformando una hebra- β , la predicción también coincide en que los residuos Thr17, Cys18 forman parte de una hebra- β , sin embargo la α -hélice de la estructura de Cn29 no fue predicha por I-TASSER, en cambio este predice una hebra- β conformada por siete residuos (Cys12, Arg13, Val14, Lys15, Gly16, Thr17, Cys18). Estas diferencias en la predicción del modelo y la estructura obtenida por RMN se deben a que I-TASSER realiza la predicción a partir de los plantados estructurales con mayor similitud a la secuencia problema, al ser la secuencia de Cn29 muy particular y no tener alta similitud con estructuras ya resueltas y depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) tanto la predicción de su estructura secundaria se dificulta, y aún más la de estructura terciaria. Ninguno de los modelos tridimensionales generados por I-TASSER tiene el ensamble de enlaces disulfuro de Cn29, el mejor acercamiento fue el modelo 3, que tiene los enlaces Cys12-Cys25, Cys5-Cys18, así como Cn29, también el modelo predicho coincide en los residuos Lys22, Cys23, Val 24 que conforman una

hebra- β , aunque el modelo agrega aminoácido extra, Gly21 formando parte de la hebra- β , sin embargo la α -hélice no fue predicha.

El ensamble de enlaces disulfuro de Cn29 determinado a partir de digestiones enzimáticas y confirmado por el modelo estructural resuelto por resonancia magnética nuclear, corresponde a Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys6 (de acuerdo al orden de cisteínas en la secuencia), en conjunto con su secuencia de aminoácidos da a Cn29 una conformación estructural distinta del plegamiento CS α/β , motivo alfa/beta estabilizado por cisteínas, donde la alfa hélice se encuentra conectada directamente con una hebra de la hoja- β , Cn29 presenta una pequeña alfa hélice, y una horquilla- β que estas unidas mediante un enlace disulfuro, y presentan una disposición espacial distinta. Este patrón difiere notoriamente del ensamble más distribuido en toxinas de escorpión (Cys1-Cys4, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6), que generalmente adoptan el plegamiento CS α/β , presente en las familias α , β y γ -KTx. Además de Cn29, este ensamble de enlaces disulfuro se ha reportado únicamente en las toxinas κ -BUTX-Tt2b y Ts16 de los alacranes *Tityus trivittatus* y *Tityus serrulatus* respectivamente, estructuralmente conformadas por el motivo CS α/α , clasificadas por su secuencia como α -KTx, y no en la familia κ -KTx por su estructura (Saucedo et al., 2011), Cn29 no guarda similitud de secuencia con ninguna de ambas toxinas.

Al ser muy pocas las similitudes de Cn29 con otras toxinas de escorpión u otros animales venenosos, no se sugiere un blanco de acción directo, aunque por su identidad con Tc1, y en menor medida con Vm24, y α -KTx 4.5 se sugiere la probabilidad de actividad sobre canales de potasio, así también se pueden explorar receptores dónde no se han reportado toxinas de escorpión con actividad sobre los mismos.

8. Conclusiones

Se logró obtener por medio de síntesis química en fase sólida F-moc un nuevo péptido identificado en el veneno del escorpión *Centruroides noxius* nombrado Cn29, de 27 aminoácidos con una secuencia: LCLSCRGGDYDCRVKGTCEGKCVCGS y un patrón de enlaces disulfuro formado por los pares de cisteínas : Cys2-Cys23, Cys5-Cys18 y Cys12-Cys25 escasamente reportado en otras toxinas de escorpión, y una estructura terciaria que no es común a las ya descritas, que aporta perspectivas nuevas sobre la diversidad estructural en las toxinas de escorpión.

9. Bibliografía

- Almaaytah, A., & Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides*, **51**, p. 35-45.
- Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J., & Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular biotechnology*, **33** (3), p. 239-254.
- Baker, D., & Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, **294** (5540), p. 93-96.
- Borges, A., Miranda, R. J., & Pascale, J. M. (2012). Scorpionism in Central America, with special reference to the case of Panama. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, **18** (2), p.130-143.
- Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Coronas-Valderrama, F. I., Corzo, G., & Possani, L. D. (2013). Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na⁺-channel α -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Biochimie*, **95** (6), p. 1216-1222.

Chen, Z., Luo, F., Feng, J., Yang, W., Zeng, D., Zhao, R., ... & Wu, Y. (2013). Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins. *PLoS One*, **8**(4), e 60201.

Chippaux, J. P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug design, development and therapy*, **6**, p. 165.

Cohen-Inbar, O., & Zaaroor, M. (2016). Glioblastoma multiforme targeted therapy: The Chlorotoxin story. *Journal of Clinical Neuroscience*, **33**, p. 52-58

Cremones, C. M., Maiti, M., Peigneur, S., Cassoli, J. S., Dutra, A. A., Waelkens, E., ... & Arantes, E. C. (2016). Structural and functional elucidation of peptide Ts11 shows evidence of a novel subfamily of scorpion venom toxins. *Toxins*, **8** (10), p. 288.

Czarnik, A. W. (1998). Solid-phase synthesis supports are like solvents. *Biotechnology and bioengineering*, **61** (1), p. 77-79.

de la Vega, R. C. R., & Possani, L. D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon*, **43** (8), p. 865-875.

de la Vega, R. C. R., & Possani, L. D. (2007). Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon*, **49** (2), p. 171-180.

Debin, J. A., Maggio, J. E., & Strichartz, G. R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American journal of physiology-cell physiology*, **264** (2), p. 361-369.

Diego-García, E., Caliskan, F., & Tytgat, J. (2014). The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. *BMC genomics*, **15** (1), p. 295.

Gurrola, G. B., Hernández-López, R. A., Rodríguez de la Vega, R. C., Varga, Z., Batista, C. V., Salas-Castillo, S. P., ... & Possani, L. D. (2012). Structure, function, and chemical synthesis of *Vaejovis mexicanus* peptide 24: a novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry*, **51** (19), p. 4049-4061.

Guy, C. A., & Fields, G. B. (1997). Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry. *Methods in enzymology* **289**, p. 67-83.

Jeyaprakash, A., & Hoy, M. A. (2009). First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *Experimental and Applied Acarology*, **47** (1), p. 1-18.

Jimenez-Vargas, J.M. Possani, L.D. Luna-Ramirez, K. 2017. Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels *Neuropharmacology*, **127**, p. 139-160.

Khamessi, O., Mabrouk, H. B., ElFessi-Magouri, R., & Kharrat, R. (2018). RK1, the first very short peptide from *Buthus occitanus tunetanus* inhibits tumor cell migration, proliferation and angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, **499** (1), p. 1-7.

King, D. S., Fields, C. G., & Fields, G. B. (1990). A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Chemical Biology & Drug Design*, **36** (3), p. 255-266.

Kozlov, S. (2017). Animal toxins for channelopathy treatment. *Neuropharmacology*, **132**, p. 83-97.

Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, **85**(14), p. 2149-2154.

Ntnu.no. (2018). The Scorpion Files - Main Page. [online] Disponible en: <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/> [Acceso Junio. 2018].

Pipelzadeh, M. H., Jalali, A., Taraz, M., Pourabbas, R., & Zaremirakabadi, A. (2007). An epidemiological and a clinical study on scorpionism by the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *Toxicon*, **50** (7), p. 984-992.

Pires, D. A. T., Bemquerer, M. P., & do Nascimento, C. J. (2014). Some mechanistic aspects on Fmoc solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **20** (1), p. 53-69.

Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., & Tytgat, J. (1999). *Scorpion toxins specific for Na⁺-channels*. *The FEBS Journal*, **264** (2), p. 287-300.

Prendini, L., & Wheeler, W. C. (2005). Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics*, **21** (5), p. 446-494.

Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H., & Possani, L. D. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*, **76**, p. 328-342.

Resh, V. H., & Cardé, R. T. (Eds.). (2009). *Encyclopedia of insects*. Academic Press.

Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Rodríguez, E. R., Santibañez-López, C. E., Güereca, L., Uribe-Romero, S. J., Gómez-Ramírez, I. V., ... & Becerril, B. (2017). Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*, **138**, p. 130-137.

Rjeibi, I., Mabrouk, K., Mosrati, H., Berenguer, C., Mejdoub, H., Villard, C., ... & ElAyeb, M. (2011). Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. *Peptides*, **32**(4), p. 656-663.

Santibañez-López, C. E., & Possani, L. D. (2015). Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. *Toxicon*, **107**, p. 317-326

Saucedo, A. L., Flores-Solis, D., de la Vega, R. C. R., Ramírez-Cordero, B., Hernández-López, R., Cano-Sánchez, P., ... & Brieba, L. G. (2012). New tricks of an old pattern structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *Journal of Biological Chemistry*, **287** (15), p. 12321-12330.

Stawikowski, M., & Fields, G. B. (2012). Introduction to peptide synthesis. *Current protocols in protein science*, **69** (1), p. 18-1.

Suranse, V., Sawant, N. S., Paripatyadar, S. V., Krutha, K., Paingankar, M. S., Padhye, A. D., ... & Dahanukar, N. (2017). First molecular phylogeny of scorpions of the family Buthidae from India. *Mitochondrial DNA Part A*, **28** (4), p. 606-611.

Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M. F., van der Walt, J. J., & Possani, L. D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences*, **20** (11), p. 444-447.

V. H. Resh, & R. T. Carde, *Encyclopedia of insects* Oxford, UK: Elsevier Science & Technology, (2nd ed.), 2009

Valdivia, H. H., Kirby, M. S., Lederer, W. J., & Coronado, R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89** (24), p. 12185-12189.

Varga, Z., Gurrola-Briones, G., Papp, F., De La Vega, R. C. R., Pedraza-Alva, G., Tajhya, R. B., ... & Possani, L. D. (2012). Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Molecular pharmacology*, **82** (3), p. 372-382.

Veisheh, M., Gabikian, P., Bahrami, S. B., Veisheh, O., Zhang, M., Hackman, R. C., ... & Kwok, D. (2007). Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer research*, **67** (14), p. 6882-6888.

Verlander, M. (2001). *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide* Edited by SA Kates and F. Albericio. Marcel Dekker: New York. 2000. 826 pp.

Weinberger, H., Moran, Y., Gordon, D., Turkov, M., Kahn, R., & Gurevitz, M. (2009). Positions under positive selection—key for selectivity and potency of scorpion α -toxins. *Molecular biology and evolution*, **27**(5), p. 1025-1034.

Xiao, L., Gurrola, G. B., Zhang, J., Valdivia, C. R., SanMartin, M., Zamudio, F. Z., ... & Valdivia, H. H. (2016). Structure–function relationships of peptides forming the calycin family of ryanodine receptor ligands. *The Journal of general physiology*, **147** (5), p. 375-394.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, **12** (1), p. 7.

Zambelli, V. O., Pasqualoto, K. F. M., Picolo, G., Chudzinski-Tavassi, A. M., & Cury, Y. (2016). Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs. *Pharmacological research*, **112**, p. 30-36.

Zeng, X. C., Corzo, G., & Hahin, R. (2005). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life*, **57**(1), p. 13-21.