



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD DE  
PROTEASAS DE LOS VENENOS DE**  
*Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha*.

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**ADRIANA LÓPEZ ESTRADA**

**Directora de Tesis: Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez Villafuerte**

*Cuernavaca, Morelos*

*Junio 2021*



El presente trabajo se desarrolló bajo la asesoría de la Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, en el Laboratorio de Neurofarmacología, del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico especialmente a mi madre Lidia Estrada Hernández, a mis hijos Bruno, C. Eduardo y Victoria, quienes me impulsaron a seguir adelante y están conmigo en todo momento, muchas gracias, los amo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y la Facultad de Ciencias Biológicas por el apoyo brindado.

Al Centro de Investigación en Biotecnología por darme la oportunidad de realizar mi servicio social, y así mismo, poder realizar este proyecto.

A la Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez Villafuerte por dirigir este proyecto, por el tiempo y la confianza brindados.

A los integrantes del comité evaluador: Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez Villafuerte, M. en C. Carolina Abarca Camacho, M. en B. José Manuel Castro García, Biól. Justina Leticia Peña Camacho y él Biól. Salvador Morales Cortés.

A Lucero Valladares por su tiempo, la ayuda brindada en todo momento, por el gran conocimiento que me regalo y lo más importante por su gran amistad y confianza. Gracias, amiga.

A la M. en C. Carolina Abarca Camacho por la revisión que realizó a este trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio Perla, Edgar, Ana, muchas gracias por el enorme apoyo en quipo.

Gracias por el enorme apoyo que me brindaron para que la realización de esta tesis tuviera éxito.



# ÍNDICE GENERAL

	ÍNDICE GENERAL	PÁGINA
	ÍNDICE GENERAL	I
	ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	IV
	ABREVIATURAS	VI
	RESUMEN	VIII
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	3
	2.1. Clasificación taxonómica <i>scolopendromorpha</i> .	3
	2.2. Morfología del orden <i>Scolopendra</i> .	3
	2.3. Alimentación de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polimorpha</i>	6
	2.4. Reproducción sexual de <i>scolopendra</i> .	7
	2.5. Distribución Geográfica de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polimorpha</i>	7
	2.6. Componentes del veneno de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	9
	2.7. Proteasas	9
	2.8. Estudios realizados con el veneno de diferentes escolopendras.	12
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	13
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	14
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	14
	5.1. Objetivo General	14
	5.2. Objetivos Particulares	14
<b>6.</b>	<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	15
<b>7.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	16
	7.1. Colecta de las especies de estudio <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polimorpha</i> .	16
	7.2. Obtención de Veneno.	16
	7.3. Cuantificación de Proteínas.	17
	7.4. Electroforesis (SDS-PAGE) para la identificación proteica de	18

	los venenos <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	
	7.5. Purificación proteica por Electroelusión.	19
	7.6. Proceso de Dialización.	20
	7.7. Proceso de Liofilización.	21
	7.8 Corroboración de las proteínas puras de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	22
	7.9. Actividad directa de proteasas del veneno total de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	23
	7.10. Actividad directa de proteasas con proteínas puras de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	24
	7.11. Zimograma con gelatina para las proteínas del veneno total con actividad de proteasa.	25
	7.12. Determinación del porcentaje de degradación por ensayo turbidimétrico del VT de ambas especies.	26
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b>	27
	8.1. Obtención de Veneno	27
	8.2. Perfil proteico de los venenos de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	28
	8.3. Confirmación de las proteínas puras de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	29
	8.4. Degradación de gelatina en la prueba directa de proteasas del veneno total de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	30
	8.5. Degradación en la actividad directa de proteasa con proteína pura de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	31
	8.6. Degradación en el zimograma de la actividad de proteasa del veneno total de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	33
	8.7. Ensayo turbidimétrico con veneno total de ambas especies.	34
	8.8. Porcentaje de degradación de la gelatina con respecto al control negativo a una temperatura de 30, 40 y 50° C.	37
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	39

<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	44
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	45
<b>12.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	46
<b>13.</b>	<b>ANEXOS</b>	51
	13.1. Método de Lowry	51
	13.2. SDS-PAGE 12%	52
	13.3. Tinción de coomassie y plata	53
	13.4. Solución desteñidora	54
	13.5. Actividad de proteasa directa	54
	13.6. Zimograma con 1.5 % de gelatina para la actividad de proteasa	55
	13.7. Cálculo del Rf de las bandas	56
	13.8. Solución para electroelución	56
	13.9. Determinación de la actividad de proteasa por ensayo turbidimétrico	56



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>		<b>Página</b>
Tabla 1.	Metaloproteasas presentes en el veneno de <i>S. viridicornis</i> , <i>O. pradoi</i> y <i>C. iheringi</i> . (Malta <i>et al.</i> , 2008).	12
Tabla 2.	Condiciones para realizar los ensayos turbidimétricos.	26
Tabla 3.	Identificación de las proteasas presentes en otras especies de <i>Scolopendras</i> .	40

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>		<b>Página</b>
Fig. 1.	Morfología de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	5
Fig. 2.	Alimentación de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i>	6
Fig. 3.	Incubación de <i>S. polymorpha</i> .	7
Fig. 4.	Distribución geográfica de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	8
Fig. 5.	Clasificación de las peptidasas.	11
Fig. 6.	Obtención del veneno de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	16
Fig. 7.	Cuantificación de Proteína de los venenos de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	17
Fig. 8.	Electroforesis (SDS-PAGE) 12%, para la identificación proteica de los venenos <i>S. viridis</i> Say y <i>polymorpha</i> .	18
Fig. 9.	Purificación proteica por electroelusión.	19
Fig. 10.	Proceso de diálisis.	20
Fig. 11.	Muestras en proceso de liofilización MAXI-Dry lyo.	21
Fig. 12.	Corroboración de las proteínas puras de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	22
Fig. 13.	Actividad directa de proteasa de VT y de proteínas puras de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	23
Fig. 14.	Actividad directa de proteasas con proteínas puras de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	24
Fig. 15.	Zimograma de los venenos totales de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	25

Fig. 16.	Perfil Proteico de los venenos de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	28
Fig. 17.	Confirmación de las proteínas puras de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	29
Fig. 18.	Degradación de la gelatina en la prueba directa del veneno total de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	30
Fig. 19 A.	Actividad directa de proteasa con proteína pura de <i>S. viridis</i> Say.	31
Fig. 19 B.	Actividad directa con proteínas puras de <i>S. polymorpha</i> .	32
Fig. 20.	Degradación en el zimograma de los venenos totales de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	33
Fig. 21.	Hidrólisis a una temperatura de 30° C a diferentes pH (4, 6 y 8) del veneno total de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	34
Fig. 22.	Hidrólisis a una temperatura de 40° C a diferentes pH (4, 6 y 8) del veneno total de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	35
Fig. 23.	Hidrólisis a una temperatura de 50° C a diferentes pH (4, 6 y 8) del veneno total de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> .	36
Fig. 24 A.	Porcentaje de degradación de la gelatina en presencia del veneno de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> . En una temperatura de 30° C.	37
Fig. 24 B.	Porcentaje de degradación de la gelatina en presencia del veneno de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> . En una temperatura de 40° C.	38
Fig. 24 C.	Porcentaje de degradación de la gelatina en presencia del veneno de <i>S. viridis</i> Say y <i>S. polymorpha</i> . En una temperatura de 50° C.	38

## ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celcius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
BSA	Albumina de suero bovino
CEIB	Centro de Investigación en Biotecnología
Cm	Centímetros
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato cúprico
Gr	Gramos
H <sub>2</sub> O	Agua
Hr	Horas
KDa	Kilodaltones
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> . 4H <sub>2</sub> O	Tartrato de sodio y potasio
M	Concentración Molar
Mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
Mm	Milímetros
Mm	Mili molar
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
Nm	Nanómetros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

pH	Potencial de hidrógeno
Pk	Proteinasa K
MPM	Marcadores de Peso molecular
Rf	Distancia migrada por la proteína
Rpm	Revoluciones por minuto
Seg	Segundos
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Sp	<i>Scolopendra polymorpha</i>
SvS	<i>Scolopendra viridis</i> (Say,1821)
TEMED	Tetrametiletilenediamina
TCA	Ácido tricloroacético
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
V	Voltios
VT	Veneno Total
VTp	Veneno Total <i>polymorpha</i>
VTs	Veneno Total de serpiente.
VTv	Veneno Total <i>viridis</i>

## RESUMEN

Los venenos están compuestos por una mezcla de enzimas y toxinas, y son sustancias que pueden desencadenar un gran número de reacciones en los seres vivos, ya sea por mordedura o picadura, estos pueden ser utilizados como mecanismo de defensa o para depredación. En el caso de los ciempiés, estos tienen una glándula de veneno conectadas a un par de forcípulas, que utilizan para morder, y de esta forma inyectar el veneno a sus presas y así desencadenar una serie de eventos fisiológicos, provocando acciones específicas que desequilibran el funcionamiento normal del organismo poniéndolo en riesgo mortal. Algunas de las enzimas reportadas en el veneno de animales son: quitinasas, cistatinas, hialuronidasas, esfingomelininasas D, fosfolipasas A2 y proteasas (Winningham et al, 2004; Malta et al., 2008; Fry et al., 2009).

Las proteasas son de gran interés biotecnológico por el papel importante que desarrollan dentro de la industria alimentaria (panadería, producción de carne, fabricación de quesos, fermentación, etc.), industria farmacéutica (fabricación de medicamentos, suplementos digestivos, etc.) y la industria de químicos (fabricación de detergentes). (Theron y Divol, 2014).

El objetivo principal de este trabajo fue la identificación de las proteínas con actividad de proteasas presentes en los venenos de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*, por lo que se realizaron geles de SDS-PAGE, zimogramas y ensayos turbidimétricos con veneno total de ambas especies. Los resultados obtenidos, mostraron que si tienen la actividad de proteasa. En el veneno de *S. viridis* Say se observan solo 5 bandas con pesos moleculares aproximados de  $\geq 112$ , 75, 45, 25 y 18 KDA, siendo la mayor con un peso molecular aproximado por arriba de  $\geq 112$  KDa., mientras que de *S. polymorpha* se observan 6 bandas con los siguientes pesos moleculares aproximados  $\geq 115,32$ , 26, 22, 11, 5 KDa. Siendo la mayor con un peso molecular aproximado arriba de  $\geq 115$  KDa. Los resultados turbidimétricos mostraron que, a una temperatura de 30 y 40 °C a un pH 6 son las mejores condiciones para llevar a cabo la hidrólisis con veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

## 1. INTRODUCCIÓN.

En la naturaleza existe un gran número de animales ponzoñosos, los cuales tienen la capacidad de generar su propio veneno, los principales artrópodos venenosos en México se agrupan en tres clases: *Arácnida*, *Insecta* y *Myriapoda*.

Dentro de los *arácnidos* los órdenes más importantes son: las arañas, escorpiones y las garrapatas. Dentro de la clase *Insecta* los órdenes que destacan son: los himenópteros (abejas, avispas, abejorros), hemípteros (chinchas), dípteros (mosquitos, tábanos), afanípteros (pulgas), lepidópteros (orugas), coleópteros (moscas) y anopluros (pulgas). La clase *Myriapoda* cuenta con dos grupos, los Diplópodos y los Quilópodos, el primero se integra de cuatro órdenes llamadas Polyxenida, Polyzoniida, Platydesmida y Siphonocryptida (grupo de milpiés o bichos bola), el segundo de tres órdenes scutigermorpha (escutigermorfos), geophilomorpha (geofilomorfos), lithobiomorpha (ciempiés), siendo el tercero el relevante para poder llevar a cabo este proyecto.

Los ciempiés tienen una glándula de veneno que está conectada a un par de forcípulas que utilizan para inyectarlo, sea para defenderse de sus depredadores (Fry *et al.*, 2009; Lewis y García, 2003) y/o, para inmovilizar y capturar a sus presas, y de esta forma desencadenar acciones específicas sobre canales iónicos, enzimas y otros receptores celulares, desequilibrando su funcionamiento normal y que traen como consecuencias la afectación de procesos vitales, como la transmisión neuromuscular, la circulación sanguínea, y la permeabilidad de las membranas, entre otros, (Castañeda, 2000). Esto se debe a que el veneno tiene diversas actividades enzimáticas, como: quitinasas, cistatinas, hialuronidasas, esterases, fosfolipasas A2 y proteasas (Malta *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 2009), así como también actividades neurotóxicas. y hemolíticas.

En este trabajo el enfoque está dirigido sobre las proteasas, que son las responsables de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos de otras proteínas, dando como resultado la producción de péptidos o aminoácidos libres. Además de poseer gran importancia biológica, las proteasas son de gran interés biotecnológico, por el papel importante que desarrollan dentro de la industria alimentaria (panadería, producción de carne, fabricación de quesos, fermentación, etc.), industria farmacéutica (fabricación de medicamentos, suplementos digestivos, etc.), y la industria de químicos (fabricación de detergentes).

(Theron y Divol, 2014). La gran diversidad de proteasas, en contraste con la especificidad de su acción, ha atraído la atención mundial en los intentos de explotar sus aplicaciones fisiológicas y biotecnológicas (Müller-Esterl *et al.*, 2008; Heinz, 2004).

Originalmente, las proteasas se clasificaron de acuerdo con su masa molecular, carga o especificidad de sustrato. Actualmente se pueden clasificar en familias, dependiendo del aminoácido o metal que poseen en su centro activo y dentro de cada una, sus miembros tienen estructuras y mecanismos de reacción similares (Manjabacas, 1995).

La acción de las proteasas está regulada por inhibidores endógenos, y son responsables de la modulación de la reacción de diversas hormonas y neurotransmisores de naturaleza peptídica, (Delgado *et al.*, 2004).

En la actualidad existen diversos estudios que han demostrado la presencia de proteasas y metaloproteasas en venenos de otros organismos: serpientes, avispas, arañas, escorpiones, caracoles, insectos, peces, anémonas marinas y ciempiés (Takohashi y Ohsaka, 1970; Markland y Perdon, 1986; Deshimaru *et al.*, 1996; Dani *et al.*, 2003; Winningham *et al.*, 2004; Malta, 2008; Undheim y King, 2011; Huari *et al.*, 2016).

Los ciempiés son artrópodos responsables de un importante número de envenenamientos no letales para los humanos, por lo que la información sobre la composición bioquímica no es relevante, por lo que el estudio de su veneno podría ser de gran interés Biotecnológico.

## 2.- ANTECEDENTES.

### 2.1. Clasificación taxonómica de Scolopendromorpha.

**Phyllum:** Arthropoda

**Clase:** Chilópoda

**Orden:** *Scolopendromorpha*

**Familia:** Scolopendridae

**Género:** *Scolopendra*

**Especie:** *viridis* Say y *polimorpha*.

(Foddai *et al.*, 2002)

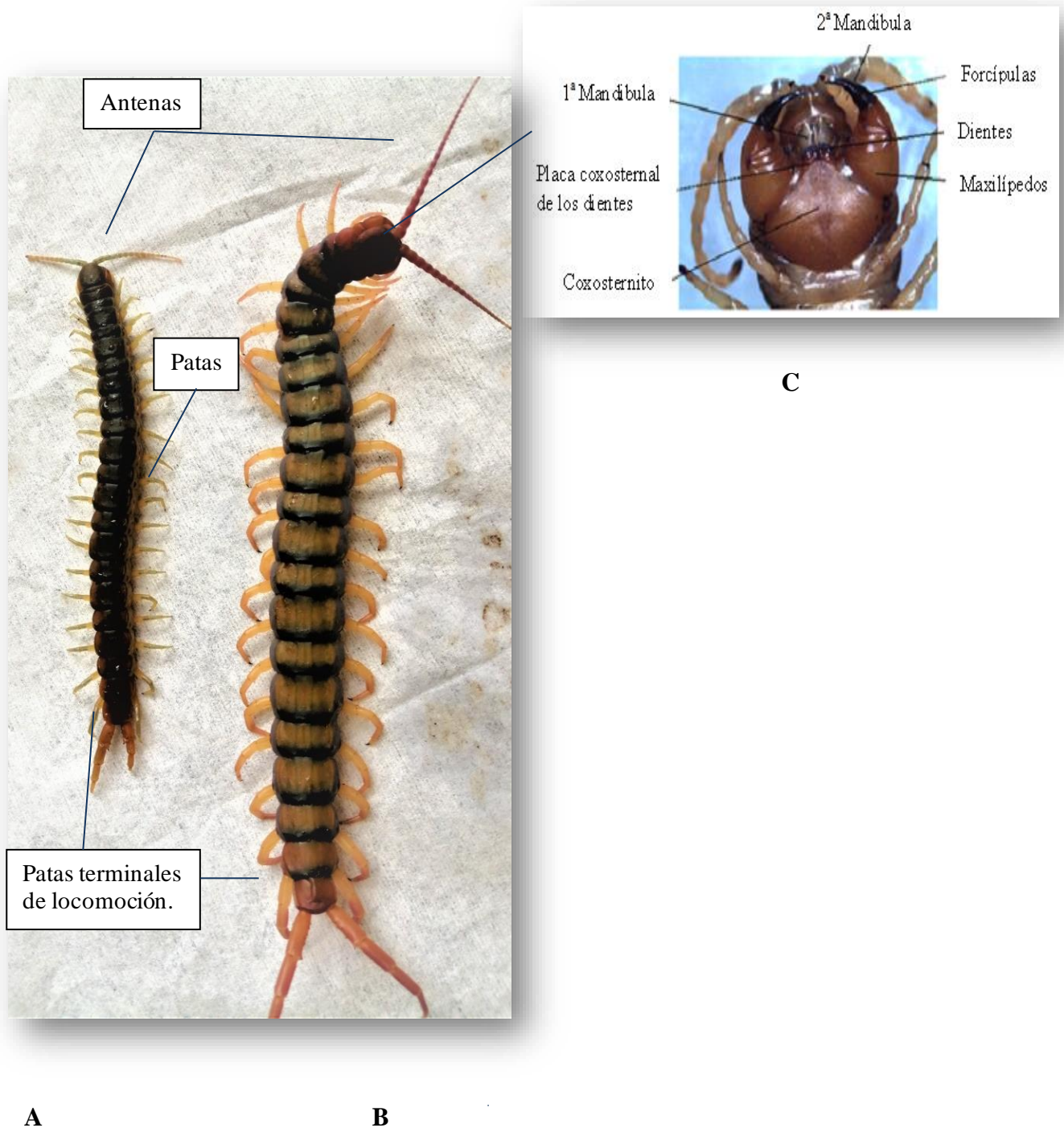
### 2.2. Morfología del orden *Scolopendra*.

Los integrantes de este orden se caracterizan por presentar cuerpos alargados, aplanados y multisegmentados, que tienen en cada segmento corporal un par de patas, (Barnes, 1989). El aparato venenoso de la *escolopendra* consiste en una glándula, un ducto y una mandíbula (afilada y curvada), inyectora del veneno, mismo que es producido en las glándulas venenosas, que se localizan en los artemos basales de las forcípulas (Brusca y Brusca, 2005; Pedroso *et al.*, 2007). En el interior y a lo largo de cada forcípula, se encuentra un conducto que descarga las secreciones de la glándula por contracción del musculo abductor al exterior o al tejido de la víctima, por una abertura que se encuentra cercana a la punta del tarsungulum (Chao y Chang, 2006). Ocelos (ojos primitivos): Son cuatro los que se encuentran a cada lado, en la parte frontal de la placa cefálica. Primera mandíbula (Maxilar primero): Estas se utilizan para masticar la comida. Segunda mandíbula (El segundo par de mandíbulas): Tiene una especie de cepillos que se encuentra al final del maxilar, se utilizan para la limpieza (las patas y las antenas). La segunda mandíbula también se utiliza para la manipulación de alimentos. Coxosternito coxosternum: Placa central abdominal de la cabeza. Placa Coxosternal de los dientes: Dos placas en la parte frontal del Coxosternito con los dientes al final de ésta, destinados para



triturar la presa. El tamaño y la configuración de la Placa Coxosternal de los dientes, se puede utilizar para definir la especie. Protuberancias Trocanteroprefemorales: Una pequeña cresta en la parte interna del lado de las forcípulas, se parece a los dientes. Tarsungulum: Es el extremo de las forcípulas. A la cabeza le sigue un diplosegmento expandido denominado cuello o collum, las antenas son simples y con segmentación variada; cutícula dura y gonoporos en el último somito del tronco. Tienen espiráculos laterales o medio dorsales, con válvulas en algunas especies; cuerpo con 15 a 193 segmentos y con apéndices locomotores. Estos apéndices se extienden lateralmente, de manera que el cuerpo queda cerca del suelo, el último par de patas está dirigido hacia atrás, y no intervienen en la locomoción (Brusca y Brusca, 2005). Suturas de la placa cefálica: Sutura en ambos lados de la mitad de la placa cefálica. Sutura transversal anterior: También llamado anillo. Surco en el tergito 1: Es un surco formado por un plegado del cuerpo. Este surco se ve sólo en *Scolopendra* del nuevo mundo (América). Suturas de los tergitos: En ambos lados de la mitad de un tergito, la posición y la disposición de éstos, se pueden utilizar para definir la especie. Espiráculo: Orificios para tomar oxígeno, se encuentra en la superficie lateral de un segmento, es una apertura al exterior del sistema traqueal (tráquea = un tubo del sistema respiratorio), se encuentran en segmentos de 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20. Pre-fémur: Primer segmento de la pierna. Fémur: Segundo segmento de la pierna entre la pre-femur y tibia. Tibia: Tercer segmento de la pierna entre el fémur y el tarso 1. Tarso 1: cuarto segmento de la pierna después de la tibia. Tarso 2: quinto segmento de la pierna. Pre-tarso: sexto y último segmento de la pierna o la garra.

Patas terminales: El último par de patas. Estos tramos se pueden utilizar para definir la especie Coxopleura: La parte lateral del segmento 21. El segmento 21 contiene los órganos reproductivos. Espinas pre-femorales: Espinas en el pre-fémur de las patas terminales. Protuberancias pres-femorales: No todas las especies de *Scolopendra* las poseen (Figura 1).



**FIG. 1.** (A) Morfología de *S. viridis* Say, (B) *S. polymorpha* (C) Partes de la cabeza (López, 2019).

### 2.3. Alimentación de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

La mayoría de los ciempiés son carnívoros, depredadores agresivos y activos, por lo que son capaces de inyectar dosis de veneno por medio de forcípulas a pequeños invertebrados, particularmente lombrices de tierra, caracoles u otros artrópodos. El veneno de *Scolopendra* es tan efectivo que puede matar a pequeños vertebrados, incluyendo otros ciempiés (Figura 2.) (Brusca y Brusca, 2005).



**A**

**B**

**FIG. 2.** (A) Alimentación de *S. viridis* Say (B) *S. polymorpha*.  
(López, 2019).

#### 2.4. Reproducción sexual de *Scolopendra*.

Algunas veces, hay un baile de cortejo, o simplemente los ciempiés masculinos hacen girar una pequeña red sobre la cual depositan un espermatóforo (una cápsula o masa creada por los machos de varias especies de invertebrados, que contienen espermatozoides) para que las hembras los encuentren.

En las zonas templadas, la puesta de huevos se produce en primavera y verano, pero en las zonas subtropicales y tropicales parece haber poca estacionalidad para la cría de ciempiés. Las hembras ponen huevos en grupos de 50 u 80; se enrollan sobre ellos para incubarlos y vigilan hasta el periodo de eclosión y dispersión de las crías. (Figura 3).



**FIG. 3.** Incubación de *S. polymorpha*.  
(López, 2019).

#### 2.5. Distribución geográfica *S. viridis* Say y *S. polimorpha*.

En México se ha documentado que los ciempiés, además de ser parte importante de la fauna del suelo (Morón-Ríos y Huerta-L. Wanga, 2006), forman parte de la dieta de aves y mamíferos terrestres (Leopold y McCabe, 1957; Sanabria *et al.*, 1995). Estos organismos son característicos de zonas templadas y tropicales. La distribución de ciempiés en México incluye a 31 Estados, con excepción de Tlaxcala, (Figura 4).





**FIG. 4.** Distribución geográfica (A) *Scolopendra polymorpha* (B). *Scolopendra viridis* Say (Cupul-Magaña,2007)

## **2.6. Componentes del veneno de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.**

El veneno o toxina de *Scolopendra*, es una sustancia que puede producir un efecto nocivo en los seres vivos, desequilibrando sus sistemas dinámicos, estas sustancias nocivas generalmente son producidas para usarlas como mecanismo de defensa o para depredación. Los venenos generalmente están constituidos por dos componentes primordiales: enzimas y toxinas. Entre las enzimas están las proteasas que realizan una actividad pre-digestiva de los tejidos, trabajando en conjunto con fosfolipasas que digieren las membranas plasmáticas de las células afectadas, y con hialuronidasas, encargadas de la difusión de los componentes tóxicos del veneno por el torrente sanguíneo de la presa (Menez, 2002). Las toxinas cumplen un papel importante actuando a nivel sináptico, presináptico o postsináptico, modulando los canales iónicos de las células excitables (Gawade, 2007). En el momento en que este complejo de toxinas es introducido en un organismo vivo, mediante la mordedura, se genera una respuesta fisiológica que promueve o inhibe una reacción bioquímica compleja, donde el sistema inmune participa induciendo anticuerpos neutralizantes o antitoxinas, provocando un conjunto de síntomas y lesiones que comprometen la supervivencia del animal afectado (Wallace, 2007).

## **2.7. Proteasas**

Las proteasas, también conocidas como peptidasas, son las responsables de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos de otras proteínas, sus aplicaciones son principalmente en la industria alimentaria (panadería, producción de carne, fabricación de quesos, fermentación, etc.). En la industria farmacéutica (fabricación de medicamentos, suplementos digestivos, etc.), y en la industria de químicos (fabricación de detergentes) (Müller-Esterl, 2008).

## CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS

Por su especificidad de sustrato se pueden clasificar en:

**ENDOPEPTIDASAS:** Son las proteasas que hidrolizan los enlaces peptídicos dentro de la cadena polipeptídica. Tendiendo a actuar lejos del N-terminal o del C-terminal. (Müller-Esterl, 2008).

**EXOPEPTIDASAS:** Son las proteasas que hidrolizan una unión peptídica a no más de tres residuos, desde el N-terminal o del C-terminal. Según el extremo que cortan, serán aminopeptidasas o carboxipeptidasas (Müller-Esterl, 2008).

Por el mecanismo de acción, estas se pueden clasificar en:

**SERINA PROTEASA:** Son las enzimas endopeptidasas, y su catálisis depende del ataque nucleófilo del -OH de un residuo de serina al enlace peptídico, al igual que un residuo de histidina y uno de ácido aspártico en el proceso catalítico (Manjacabacas, 1995). Ejemplos de esta proteasa: Tripsina, Trombina, Quimotripsina, Elastasa.

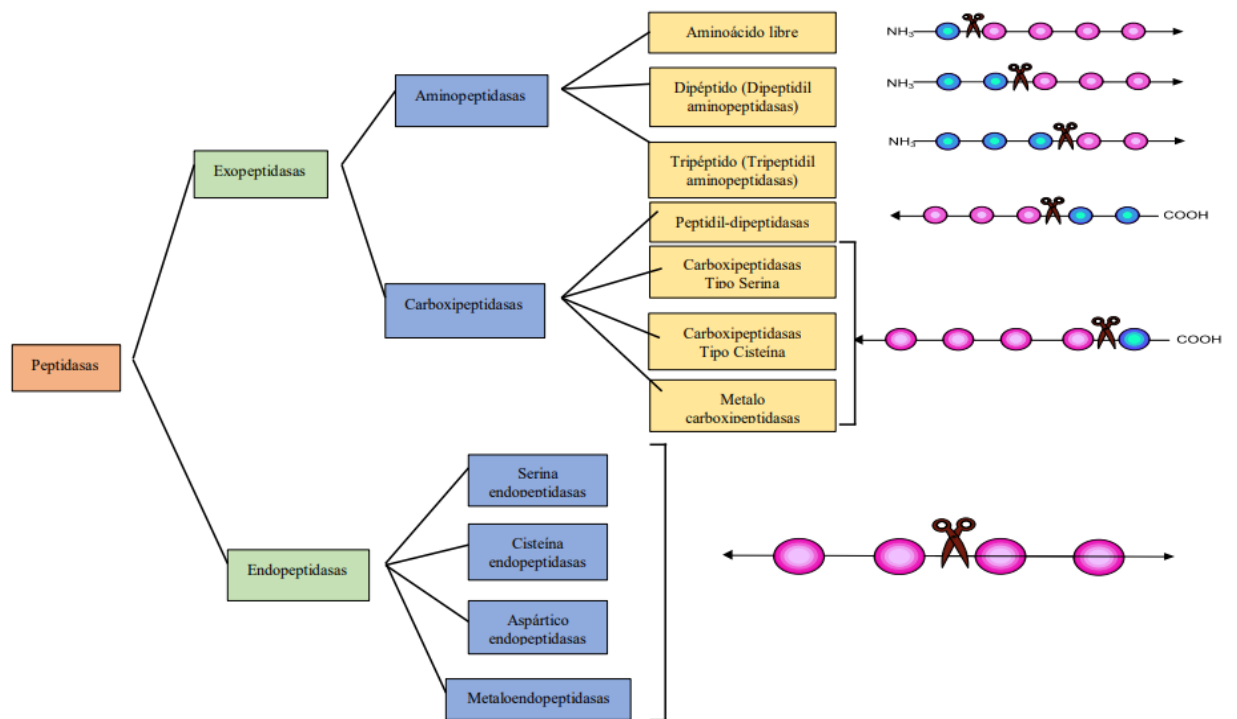
**CISTEINA PROTEASA:** Son aquellas que presentan un residuo de cisteína en el centro activo, y que actúa como nucleófilo. La mayoría atacan específicamente a enlaces peptídicos en los que participe una histidina (Anwar y Saleemuddin. 2000). Ejemplos de esta proteasa: Papaína y Caspasas.

**METALOPROTEASA:** Son enzimas endopeptidasas que requieren cofactores metálicos en su centro activo, la mayoría contienen Zn. Estas enzimas son inhibidas por agentes quelantes de iones metálicos como el EDTA, pero no por agentes sulfidrilos (Labbe *et al.*, 1974). Estas enzimas tienen gran relevancia por su gran importancia industrial y comercial. Ejemplo: la Termolisina.

**ASPARTYL PROTEASA:** Son enzimas bilobuladas donde el sitio activo está entre dos lóbulos, y los residuos son de ácido aspártico. Uno de los residuos de ácido aspártico, activa la molécula de agua atacante para su des-protonación, mientras que el otro residuo polariza

el carbonilo peptídico aumentando su susceptibilidad al ataque (Berg *et al.*, 2007). Ejemplo de esta proteasa: Pepsina y Renina.

**TREONINA PROTEASA:** Utilizan el aminoácido de treonina como nucleófilo catalítico para romper el enlace peptídico. Es un alcohol secundario, ya que posee un grupo metilo. La Treonina actúa juntamente con otros dos aminoácidos: la metionina y el ácido aspártico ejercen la labor de metabolizar las grasas que se depositan en los órganos (Figura 5).



**FIG. 5.** Clasificación de las peptidasas.

(Theron y Divon, 2014)



## 2.8. Estudios realizados con el veneno de diferentes escolopendras.

Entre los estudios realizados con el veneno de otras escolopendras, se mencionan los siguientes:

En el 2008, Malta *et al.*, realizaron ensayos de actividad tóxica del veneno de ciempiés brasileiros, de las especies *Otostigmus pradoi*, *Cryptops iheringi* y *Scolopendra viridicornis*. Los ensayos de medición de actividad enzimática mediante zimografías, indicaron que las proteínas presentes en estos venenos poseen actividad hialuronidasa, caseinolítica, fibrinógena y proteasa. (Tabla 1).

**Tabla 1.** Metaloproteasas presentes en el veneno de *S. viridicornis*, *O.pradoi* y *C. iheringi* (Malta *et al.*, 2008).

<b>Especie</b>	<b>PM de metaloproteasas</b>
<i>S. viridicornis</i>	44, 22 KDa
<i>O.pradoi</i>	35,23 y 15 KDa
<i>C. iheringi</i>	121,44 y 25 KDa

En el 2014, Granado, C. Trabajo en el perfil proteico y actividad enzimática del veneno de *Scolopendra gigantea*, en SDS-PAGE y ensayos zimográficos, donde identificó 8 proteasas, de las cuales, 5 presentaron actividad serina-proteasa, con pesos moleculares aproximados de: dos bandas  $\geq 250$  KDa, 116 KDa, 100 KDa y 51 KDa , 2 mostraron actividad metaloproteasa con pesos moleculares aproximados de 26 KDa y 22 KDa, y una banda que probablemente sea aspartil-proteasa o cisteina-proteasa con un peso molecular aproximado de 34 KDa.

En el 2019, Clement, H. Trabajo en la caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas, reportando dos proteasas, una serina-proteasas o metaloproteasa tipo I de 25 KDa. y la otra metaloproteasa de 46 KDa.

### 3.- JUSTIFICACIÓN.

Existe una gran diversidad de animales ponzoñosos que generan su propio veneno, el cual puede ser utilizado como mecanismo de defensa o para alimentación.

El veneno de los ciempiés es una mezcla compleja que está constituida por enzimas, como: péptidos, aminos, proteasas, esterases, hialuronidasas, histamina, serotonina, etc., y toxinas con actividad neurotóxicas y hemolítica.

El estudio de los venenos que se encuentran en diferentes organismos se ha ampliado últimamente, ya que muchos de ellos presentan características o funciones únicas y específicas, que han ayudado al hombre para diferentes fines biotecnológicos y médicos.

Las investigaciones en venenos de animales ponzoñosos, se inclinan más en aquellos que son mortales para el hombre, y el veneno del ciempiés no se considera como un factor de alto riesgo en humanos, puesto que, la mordedura de estos ciempiés, generalmente produce en adultos: eritemas, edemas, intenso dolor, fiebre, debilidad, linfagitis local, isquemia, y necrosis del área afectada, es por esa razón, que no se le da la importancia necesaria para poder estudiar la composición bioquímica más detallada del veneno de este ciempiés.

Por lo tanto, el principal enfoque en este trabajo es poder realizar la identificación de las proteínas con actividad de proteasa del veneno de ciempiés de *S. viridis* Say y de *S. polymorpha*, ya que darían la posibilidad de que estas proteínas sean purificadas y utilizadas con un fin biotecnológico o medicinal.

## 4. HIPÓTESIS

Se ha reportado que los venenos del ciempiés de *S. viridis* Say y de *S. polymorpha*, presentan ciertas actividades enzimáticas, como: antimicrobiana, fosfolipasa, hialuronidasa, entre otras, por lo que, en este trabajo se espera encontrar específicamente a las proteínas que tienen actividad de proteasas, utilizando diferentes técnicas.

## 5. OBJETIVOS

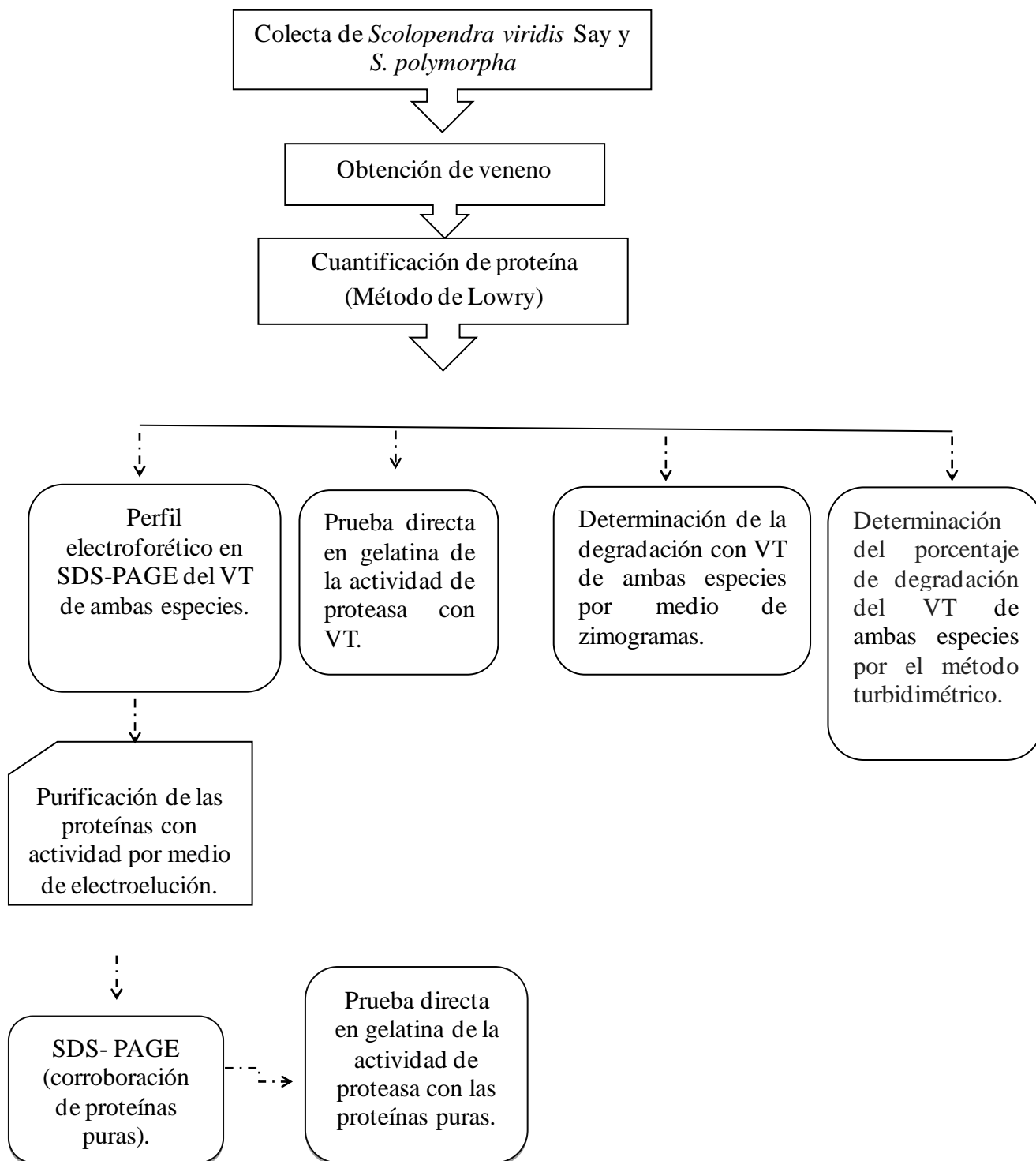
### 5.1. Objetivo general.

Identificar y purificar las proteínas con mayor actividad de proteasas presente en el veneno de *S. viridis* Say y de *S. polymorpha*.

### 5.2. Objetivos particulares.

- Identificar el perfil proteico del veneno de *S. viridis* Say y *S. polymorpha* a través de SDS-PAGE.
- Identificar las proteínas con actividad de proteasa mediante zimograma y prueba directa en gelatina de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.
- Purificar la proteína identificada con mayor actividad de proteasa en el veneno de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.
- Determinar el porcentaje de degradación del veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha* por el método turbidimétrico.

## 6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



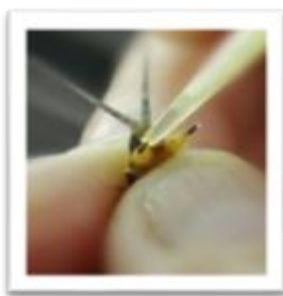
## 7.- METODOLOGÍA.

### 7.1 Colecta de las especies de estudio *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

Los especímenes del ciempiés *S. viridis* Say, fueron colectados principalmente en zonas húmedas y boscosas al norte del Estado de Morelos, y las *S. polymorpha*, fueron colectados en zonas cálidas en el centro sur del Estado de Morelos. Se mantienen en cautiverio en el laboratorio de Neurofarmacología del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en donde se colocaron de manera individual en recipientes con suficiente tierra húmeda, y cada cuatro días comen larvas de *Tenebrio*.

### 7.2 Obtención del veneno.

El veneno de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*, se obtiene de la siguiente manera: los especímenes son sometidos a un cambio de temperatura, colocándolos en un refrigerador a 4° C, durante 3-4 min. aproximadamente para ser inmovilizados, posteriormente a los ciempiés se les aplica estimulación manual, ejerciendo poca fuerza sobre la cabeza, para que de esta forma el veneno sea expulsado por medio de las forcípulas, este veneno fue colectado con una punta amarilla para micropipeta, por último, el veneno se coloca en un tubo eppendorf con 5 µl de agua mili-Q, para su posterior deshidrocongelación, y de esta forma conservarlo congelado, hasta su próximo uso. Este proceso se llevaba a cabo cada veinte días. (Figura 6).



**FIG. 6.** Obtención del veneno de ambas especies (*S. viridis* Say y *S. polymorpha*).  
(López, 2019)

### 7.3. Cuantificación de proteína.

La cuantificación de proteína de los venenos, fue determinada empleando el método de Lowry, ya que es uno de los métodos colorimétricos más sensibles para medir la concentración de proteína, utilizando una curva estándar de una concentración conocida de BSA, considerando que la sensibilidad del método, está en un rango de 1 a 100  $\mu\text{g}$ , la muestra del veneno total se diluyo en 20  $\mu\text{l}$  de agua milliQ, y alternativamente la concentración de las muestras fue determinada midiéndoles la absorbancia de luz ultravioleta a 560 nm., (Anexo 13.1) para la cuantificación de proteína. (Lowry *et al.*, 1951). (Figura 7).



**FIG. 7.** Cuantificación de Proteína de los venenos de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*. (López, 2019).

#### 7.4. Electroforesis (SDS-PAGE) para la identificación proteica de los venenos de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

La electroforesis en un gel (SDS-PAGE), es una técnica que permite separar las proteínas de acuerdo con su peso molecular en una matriz de poliacrilamida, usando un campo eléctrico. El veneno es separado por electroforesis (SDS-PAGE) 12% (Anexo 13.2), se deja libre el primer carril y en el segundo se colocan 2.5  $\mu$ l de marcadores de pesos moleculares, en el tercer carril se colocan 18  $\mu$ g del veneno y en los carriles restantes del gel se colocan 40  $\mu$ g del veneno y se corre con un flujo de corriente de 50 V, para el gel concentrador (solo para empaquetar el veneno), y después se cambia a 75 V, se deja aproximadamente 2 hrs. (Figura 8).

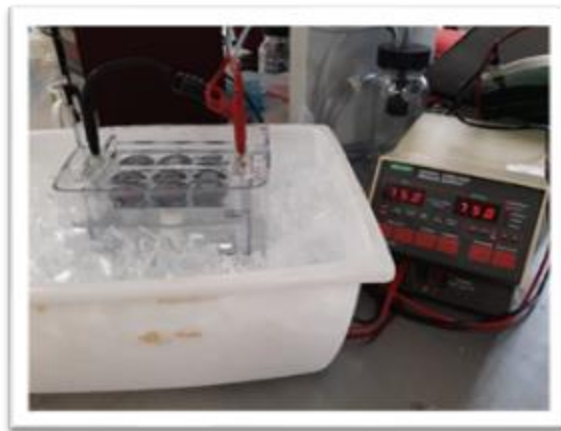


**FIG. 8.** Electroforesis (SDS-PAGE) 12%, para la identificación proteica de los venenos *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.  
(López, 2019)

Después de la electroforesis, el gel se corta en dos partes, donde la primera parte es: el carril del marcador de peso molecular, más un carril con 18  $\mu$ g de la muestra del veneno, la segunda parte, se coloca en cámara húmeda en refrigeración, mientras la otra parte es teñida con azul de Comassie (Anexo 13.3). Una vez localizadas las proteínas del veneno, se calculó el Peso Molecular de cada una de las bandas ( $R_f$ ) (Cevallos *et al.*, 1992), (Anexo 13.7).

### 7.5. Purificación proteica por electroelusión.

Una vez que se observan las bandas proteicas en el gel SDS-PAGE 12%, cada banda se corta de forma individual, y se coloca en un tubo sellado en la parte inferior con una membrana de diálisis (corte de 12 – 14 KDa.), se llenan los tubos con Tris 50 mM pH 6.8, la parte superior se sella con tapón de plástico. La corrida se realiza en frío durante 2 hrs., bajo un flujo de corriente de 75 Volt, con una solución amortiguadora (Anexo 13.8). (Figura 9).



**FIG. 9.** Purificación proteica por electroelusión de los venenos *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.  
(López, 2019)



## 7.6. Proceso de Dialización.

El proceso de diálisis se lleva a cabo después de la electroelución, esto se hace para poder quitar el exceso de sales que pudiera tener. Para este proceso, se necesita quitar la banda de gel sin perder el buffer, la bolsa es sellada con pinzas, y es dializada en agitación constante con 3 cambios de agua mili-Q cada hora, este proceso se realizó en el cuarto frío (-4° C) para que la proteína no se desnaturalice. Por último, la proteína es colocada en tubos eppendorf para después ser liofilizada y guardada hasta su posterior uso. (Figura 10).



**FIG. 10.** Proceso de diálisis.  
(López, 2019)

## 7.7. Proceso de Liofilización.

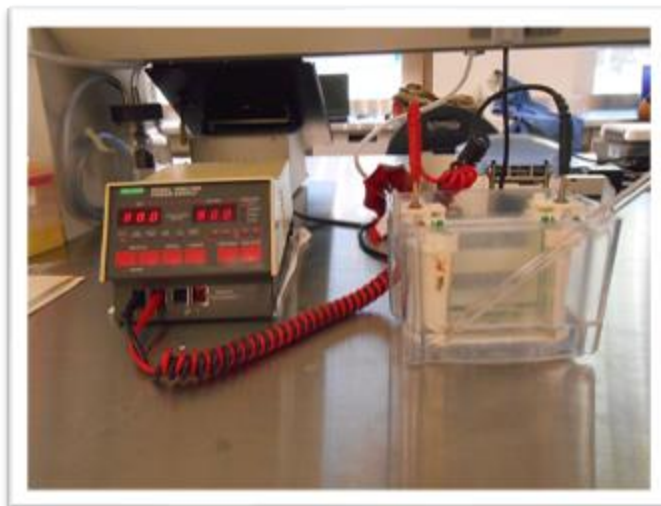
El proceso de liofilización es el secado donde se emplea una MAXI-Dry lyo, en el cual se colocaron los tubos eppendorf que contienen la solución de proteína a deshidratar. El liofilizador opera a una presión de 0.2 atm y a  $-110^{\circ}\text{C}$  de temperatura en la trampa de vapores (Figura 11).



**FIG. 11.** Muestras en proceso de liofilización.  
(López, 2019)

### 7.8. Obtención de las proteínas puras de *S.viridis* Say y *S. polymorpha*.

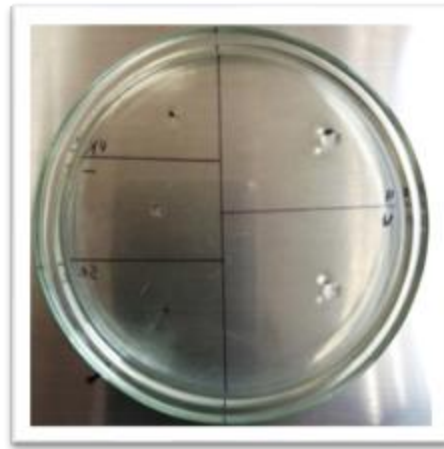
Se realizó una electroforesis en un gel (SDS-PAGE 12%), donde el veneno es separado por una corriente eléctrica (Anexo 13.2), se deja libre el primer carril y en el segundo se colocan 2.5 µl de marcadores de pesos moleculares, se colocan 8 µg de las proteínas puras del veneno, se corre a una corriente constante de 50 V, para el gel concentrador (solo para empaquetar el veneno), y después se cambia a 75 V, se deja aproximadamente 2 hrs. Este gel se tiñó con plata, el cual tiene un rango de 5 a 10 µg de proteína. (Anexo 13.2, 13.3 y 13.7). (Figura 12).



**FIG. 12.** Corroboración de las proteínas puras de *S.viridis* Say y *S. polymorpha*.  
Teñidas con plata.  
(López, 2019)

### 7.9. Actividad directa de proteasas del veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

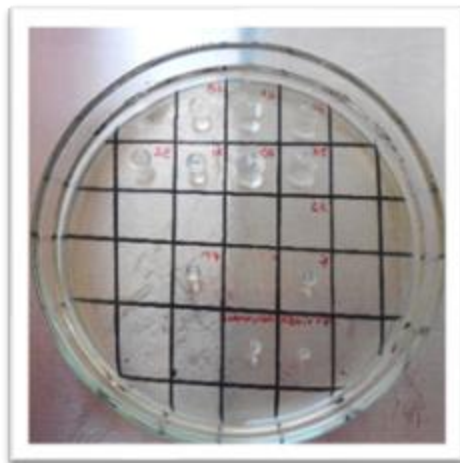
La actividad de proteasa directa del veneno se lleva a cabo en gelatina comercial 15%, se colocan 2.5 µl del C- (agua milliQ), 2 µg del control+ (PK) y 12.6 µg de (VTS), 100 µg del veneno total *S. viridis* Say y 53 µg y *S. polymorpha*, la caja se incuba por 24 hrs. a temperatura ambiente para que ocurra la degradación, y posteriormente se tiñe con coomasie (Anexo 13.3,13.4 y 13.5), realizando los enjuagues necesarios hasta visualizar la actividad mediante los halos. (Figura 13).



**FIG. 13.** Actividad directa de proteasa de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.  
(López, 2019).

### 7.10 Actividad directa de proteasas con proteínas puras de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

La actividad de proteasa directa de las proteínas puras de los venenos de ambas especies, se lleva a cabo en gelatina comercial al 15%, se colocan 2.5  $\mu$ l del C- (gel sin muestra), 12.6  $\mu$ g del control+ (VTS), 20  $\mu$ g del veneno total *S. viridis* Say y 20  $\mu$ g y *S. polymorpha*, la caja se incuba por 24 hrs. a temperatura ambiente para que ocurra la degradación, y posteriormente se tiñe con azul de coomasie (Anexo 13.3,13.4 y 13.5), realizando los enjuagues necesarios hasta visualizar la actividad mediante los halos. (Figura. 14).



**FIG. 14.** Actividad directa de proteasas con proteínas puras de *S. viridis* Say *S. polymorpha*.  
(López, 2019).

### 7.11. Zimograma con gelatina para las proteínas del veneno total con actividad de proteasa.

Esta técnica electroforética y cuantitativa se realiza en un gel de SDS-PAGE 12% con 0.5% de gelatina comercial, este gel se corrió por alrededor de 2 hrs., a un flujo de corriente constante de 75 V. Se cargaron 2.5 µl de marcadores de peso molecular marca BIO-RAD, y de ambos venenos se cargaron de *S. viridis* Say 150 µg y *S. polymorpha* 53 µg. (Anexo 13.3,13.4 y 13.6). (Figura 15).



**FIG. 15.** Zimograma de los venenos totales de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*. (López, 2019)

### 7.12. Determinación del porcentaje de degradación por ensayo turbidimétrico del VT de ambas especies.

La actividad proteolítica del veneno total de ambas especies se determinó mediante ensayo turbidimétrico por triplicado (Anexo 13.9), controlando las condiciones de temperatura (30°, 40° y 50° C) y de pH (4, 6 y 8). Se utilizó gelatina al 0.3% g/v como sustrato en los diferentes pH de Tris.

Se utilizó 10 µg del veneno total de *S. viridis* Say y 10 µg *S. polymorpha*, C- (Tris con gelatina) 200 µl, C+ (VTS) 2 µg a un volumen de 200 µl en el Tris. Se agitaron y se dejaron durante 15 minutos a las condiciones correspondiente, la reacción se detuvo con 120 µl de ácido tricloroacético al 0.44 M, los tubos se agitaron y se dejaron en frío 15 minutos y finalmente se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos, las lecturas se leen a 280 nm. (Tabla 2).

**Tabla 2. Condiciones para realizar los ensayos turbidimétricos.**

Muestra	Tris	Tris con gelatina 0.3 %	Veneno de serpiente	Veneno total S.vS	Veneno total S.p	TCA 0.44M	ABS 280 nm
<b>Blanco</b>	200 µl	-----	-----	-----	-----	120 µl	
<b>Control –</b>	-----	200 µl	-----	-----	-----		
<b>Control + VTS 2 µg</b>	-----	180 µl	20 µl	-----	-----		
<b>VTvS 10 µg</b>	-----	199.6 µl	-----	0.4 µl	-----		
<b>VTp 10 µg</b>	-----	199.7 µl	-----	-----	0.3 µl		

## **8. RESULTADOS.**

Para llevar a cabo la identificación y purificación de las proteínas con mayor actividad de proteasas de los venenos de *Scolopendra viridis* Say, y de *Scolopendras polymorpha*, se utilizó veneno puro de ambas especies, y se llevaron a cabo diferentes técnicas para la identificación del perfil proteico, la identificación de las proteínas con actividad de proteasa en gelatina, la purificación de las proteínas con actividad de proteasa, y ensayos turbidímetros para determinar el porcentaje de degradación del veneno total de las dos especies.

### **8.1. Obtención del veneno.**

Para poder llevar a cabo las diferentes técnicas, se necesitó la recopilación de veneno de ambas especies.

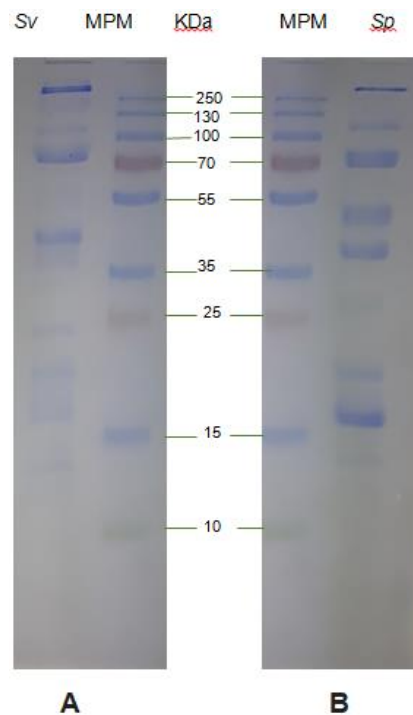
Para la obtención del veneno de *Scolopendras viridis* Say, se ordeñaron 200 especímenes no importando el tamaño del ciempiés, y se obtuvieron aproximadamente 500 µg de veneno por ordeña.

Para *Scolopendra polymorpha*, se ordeñaron 15 especímenes sin importar el tamaño del ciempiés, y lo que se obtuvo aproximadamente fueron 800 µg por ordeña.



## 8.2. Perfil proteico de los venenos de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

La primera estrategia empleada para la identificación del perfil proteico, se realizó un gel en presencia de SDS, con una concentración de acrilamida al 12%, en el gel separador, y para el gel concentrador al 4%, para poder determinar las proteínas presentes en los venenos de *S. viridys* Say y *S. polymorpha*. (Anexo 13.2). Colocando 18 y 40 µg de ambos venenos en carriles diferentes y 2.5 µl de marcadores de peso molecular marca BIORAD de amplio rango (Figura 16).



**FIG. 16.** Perfil Proteico de los venenos de (A) *S. viridis* Say y (B) *S. polymorpha*. (López, 2019)

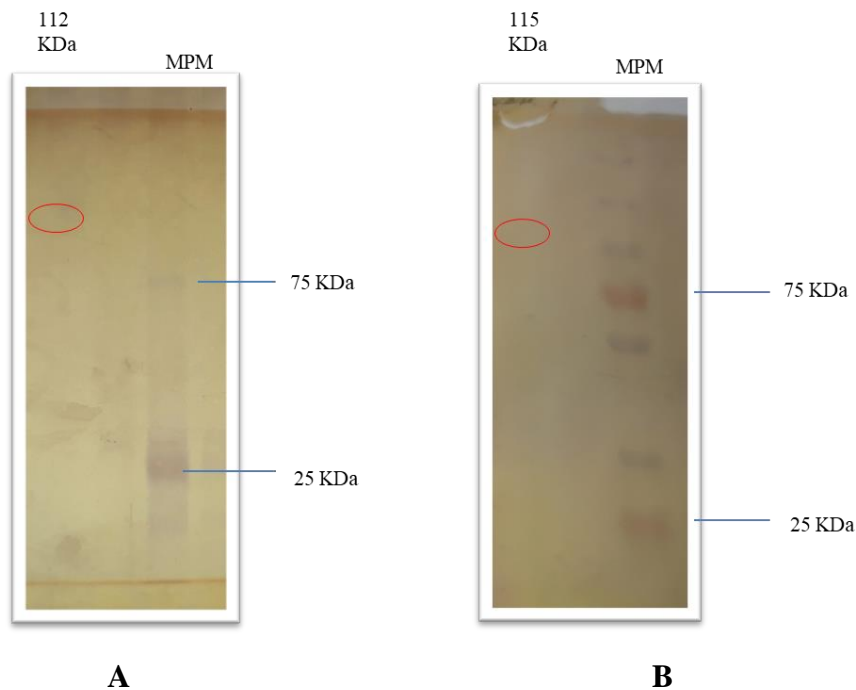
En la **figura (A)**. Se observa el perfil proteico de *S. viridis* Say, en el cual se observan 27 bandas proteicas dentro de un rango de marcadores de peso molecular de 10 a 250 KDa.

En la **figura (B)**. Se observa el perfil proteico de *S. polymorpha*, con 16 bandas dentro de un rango de marcadores de peso molecular de 10 a 250 KDa.

Con esto identificamos las proteínas presentes en los venenos de ambas especies, así como sus pesos moleculares.

### 8.3 Confirmación de las proteínas puras de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

Para la confirmación de las proteínas puras en ambos casos, la presencia de una banda oscura, nos indica que la proteína efectivamente esta pura, lista para la siguiente prueba. (Figura 17).



**FIG. 17.** Confirmación de las proteínas puras de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.  
Teñidas con plata.

En la **figura 17**. Se muestra las proteínas puras en ambos venenos.

En la **figura (A)**. *Scolopendra viridis* Say, se cargaron 8  $\mu\text{g}$  de la proteína pura y 2.5  $\mu\text{g}$  marcadores de peso molecular, y como se puede observar en la imagen, efectivamente la proteína de 112 KDa se encuentra pura.

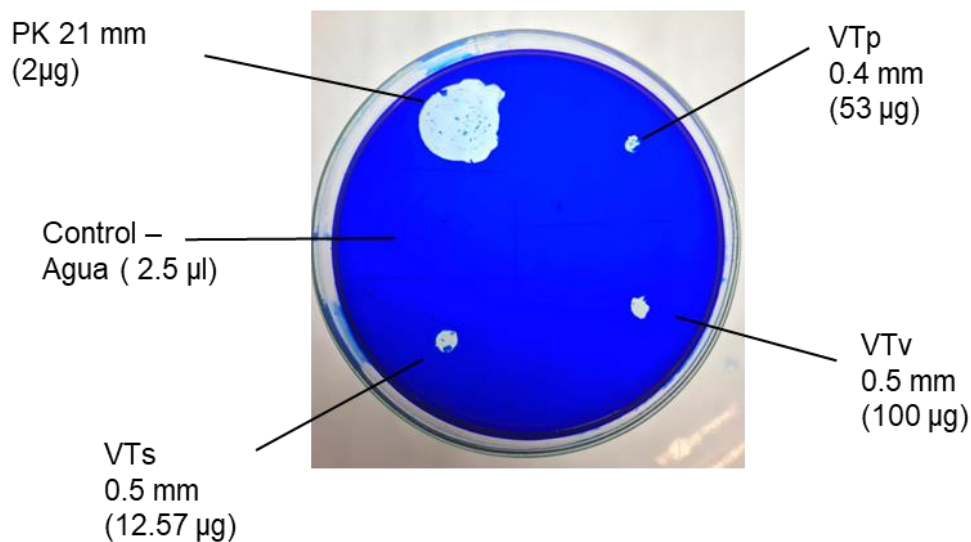
En la **figura (B)**. *Scolopendra polymorpha*, se cargaron 8  $\mu\text{g}$  de la proteína pura y 2.5  $\mu\text{g}$  marcadores de peso molecular, y se observa que la proteína pura de 115 KDa está sola.

Para ambos casos se observa ligeramente la presencia de una sola banda, lo que indica que efectivamente esta pura.

#### 8.4. Degradación de gelatina en la prueba directa de proteasas del veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

Para esta prueba se utilizó gelatina al 15% g/v como sustrato para observar la degradación de las proteínas con actividad. Los resultados obtenidos muestran la formación de halos que indican que efectivamente, el veneno total de ambas especies tiene actividad de proteasas y cuyas medidas son:

Para la C+ (PK) 21 mm y (VTs) 0.5 mm de diámetro, C- no se observa nada, VTp 0.4 mm de diámetro y para VTv 0.5 mm de diámetro, (Figura 18).



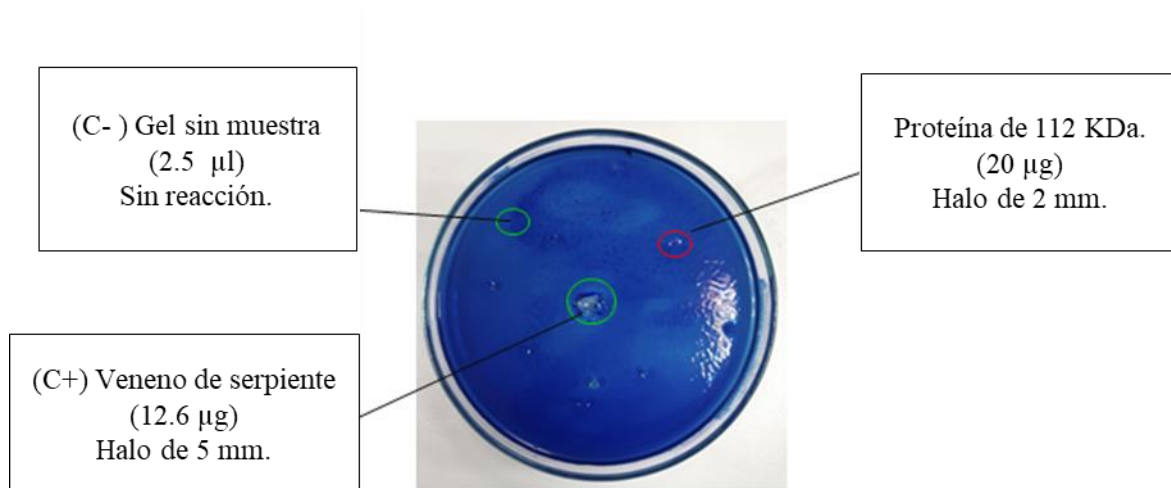
**FIG. 18.** Degradación de gelatina en la prueba directa del veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha* con 15 % de gelatina.  
(López, 2019)

## 8.5 Degradación en la actividad directa de proteasa con proteína pura de

*S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

Para esta prueba se utilizó la proteína pura con mayor actividad de proteasa, que fue de 112 KDa. del veneno de *S. viridis* Say, en gelatina comercial como sustrato al 15% g/v, la observación de un halo indica la actividad enzimática

En la **figura 19 A**: La formación de un halo de 2 mm de diámetro, nos confirma la degradación por la proteasa.

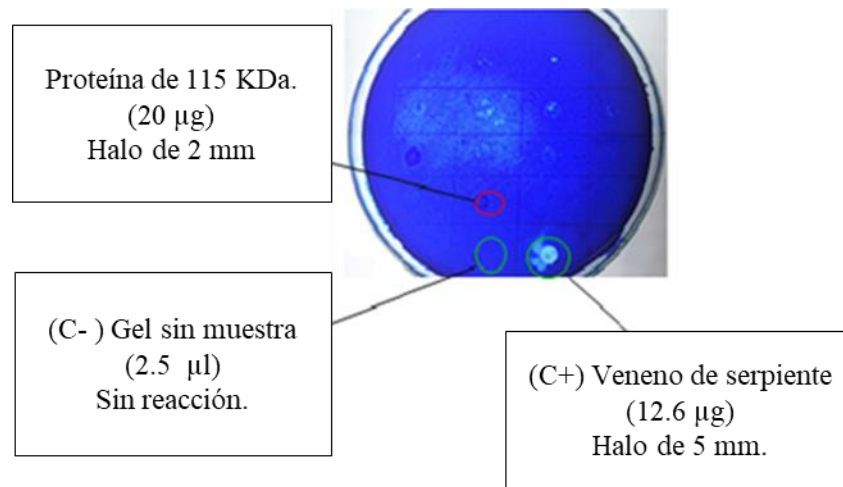


**FIG. 19. A.** Actividad directa de proteasa con proteínas puras de 112 KDa., de *S. viridis* Say.

(López, 2019)

Para esta prueba se utilizó la proteína pura de peso molecular de 115 KDa., del veneno de *S. polymorpha* en gelatina comercial al 15% g/v, la observación de un halo indica la actividad enzimática.

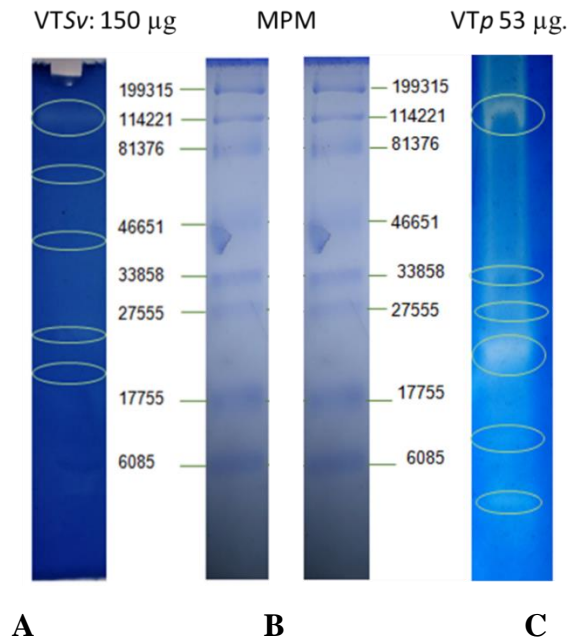
En la **figura 19 B**: La formación de un halo de 2 mm de diámetro, nos confirma la degradación por la proteasa.



**FIG. 19. B.** Actividad directa con proteínas puras de *S. polymorpha*.  
(López, 2019)

### 8.6. Degradación por zimograma de la actividad de proteasa del veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

Con esta técnica se identificaron los pesos moleculares de las proteínas con mayor actividad de proteasa en un gel SDS-PAGE 12% con 0.5% de gelatina comercial. Se evidenciaron la aparición de zonas blancas o de degradación del sustrato, que indican la actividad enzimática en los zimogramas. (Figura 20).



**FIG. 20.** Degradación en el zimograma de los venenos totales de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*. (López, 2019).

En la **figura 20**. Se muestran las proteínas con actividad de proteasa de los venenos totales de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*.

En la **figura (A)**. Se colocaron 150 µg de *S. viridis* Say, y se observa que solo 5 bandas con pesos moleculares aproximados de  $\geq 112,75,45,25$  Y 18 KDa, presentan actividad enzimática, siendo la mayor con un peso molecular  $\geq$  de 112 KDa.

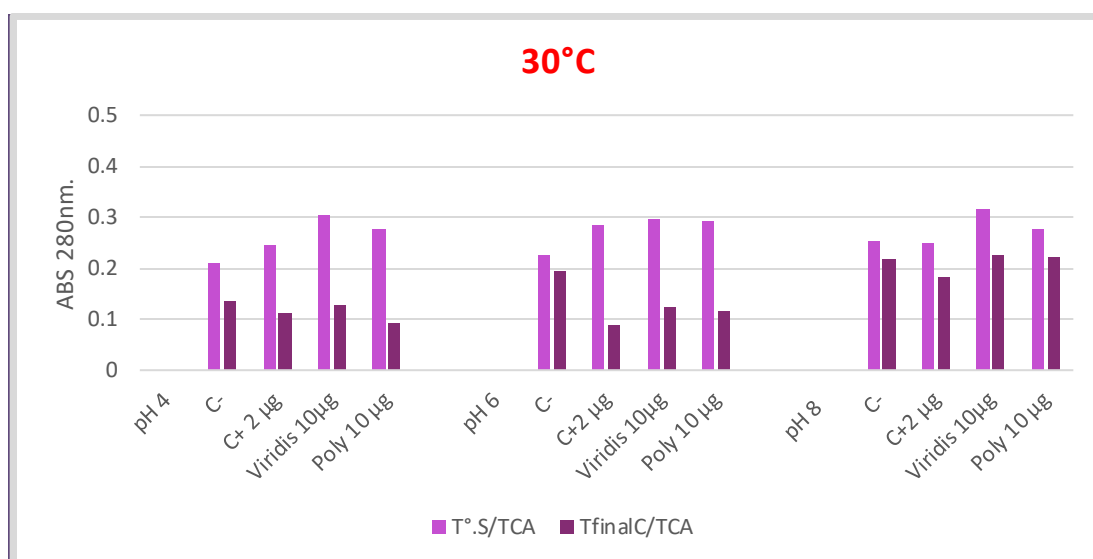
En la **figura (B)**. Se colocaron 2.5 µl de marcadores de peso molecular.

En la **figura (C)**. Se colocaron 53 µg de *S. polymorpha*, y se observa que 6 bandas presentan actividad de proteasas, con los siguientes pesos moleculares aproximados de  $\geq 115,32, 26, 22, 11, 5$ . Siendo la mayor con un peso molecular  $\geq$  de 115 KDa.

### 8.7. Ensayo turbidimétrico con veneno total de ambas especies.

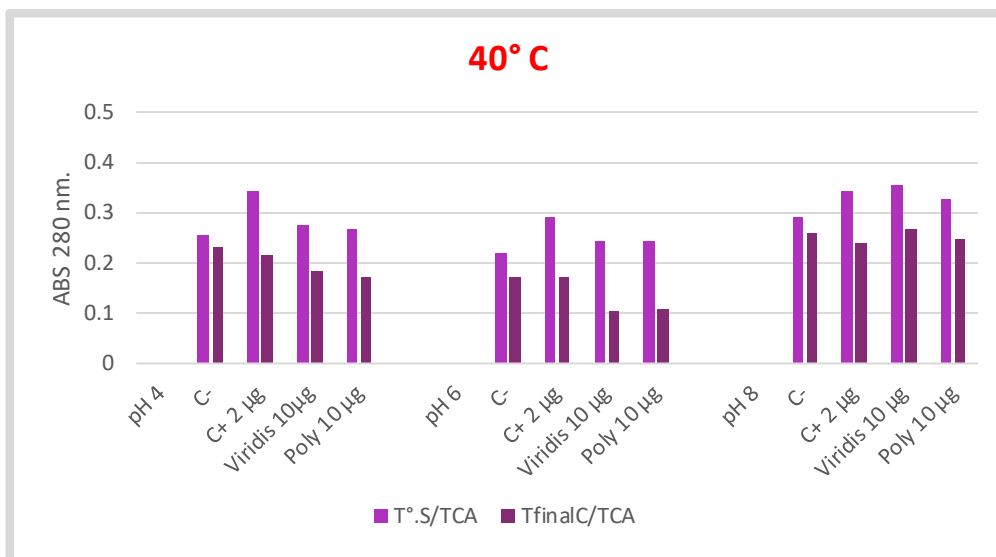
Para determinar el porcentaje de gelatina degradada por la actividad de proteasa, se utilizó el método turbidimétrico, cuyas condiciones se muestran en la tabla 2. La disminución en la absorbancia indica la degradación enzimática. Para sacar el porcentaje de degradación, el control negativo se tomó como el 100%, y la concentración final de la gelatina empleada fue de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

En la **figura 21**. Se observan las absorbancias a una temperatura de 30 °C con los pH 4, 6 y 8, donde se observa que la mayor hidrólisis con respecto al control negativo es en un pH 6 para ambas especies.



**FIG. 21.** Hidrólisis a una temperatura de 30° C a diferentes pH (4, 6 y 8) del veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*. (López, 2019).

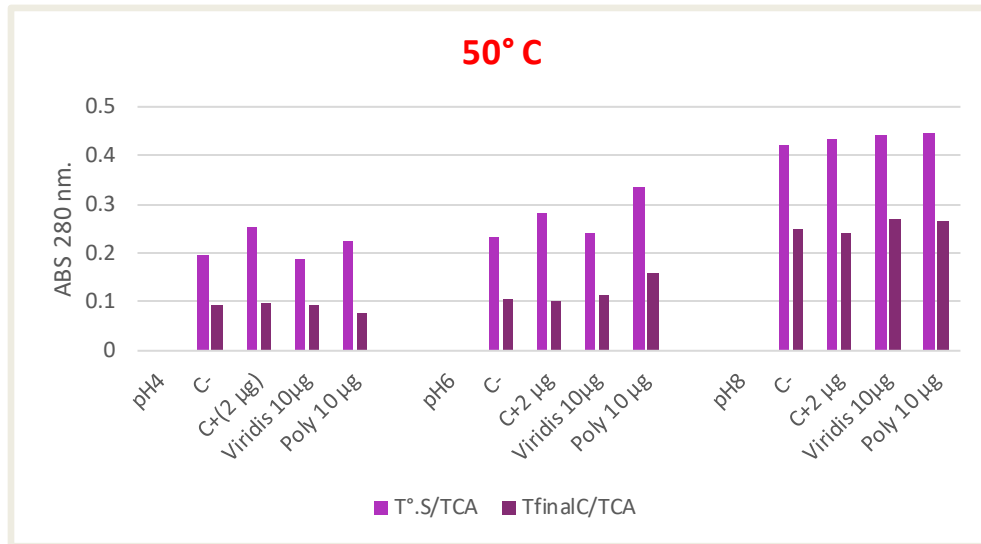
En la **figura 22**. Se utilizó una temperatura de 40 °C con las mismas condiciones de pH 4, 6 y 8, donde se observa que la mayor hidrólisis se lleva a cabo en un pH de 6 con respecto al control negativo.



**FIG. 22.** Hidrólisis a 40° C a diferentes pH (4, 6 y 8) del veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*. (López, 2019).

En la **figura 23** Se observa que a una temperatura de 50 °C con los tres pH 4, 6 y 8, no hay una mayor hidrólisis, por lo tanto, la temperatura no es viable para esta técnica.





**FIG. 23.** Hidrólisis a 50° C a diferentes pH (4, 6 y 8) del veneno total de *S. viridis* Say y *S. polymorpha* (López, 2019).

La disminución de la absorbancia en presencia del veneno de *S. viridis* Say y *S. polymorpha* con respecto al C-, nos indica que el veneno fue capaz de hidrolizar la gelatina, lo que quiere decir, que algunos componentes del veneno, tuvieron la actividad de proteasa, y que las mejores condiciones para llevar a cabo una mayor hidrolisis son a una temperatura de 30 °C y 40 °C con un pH 6.

### 8.8. Porcentaje de degradación de la gelatina con respecto al control negativo a una temperatura de 30 ° C.

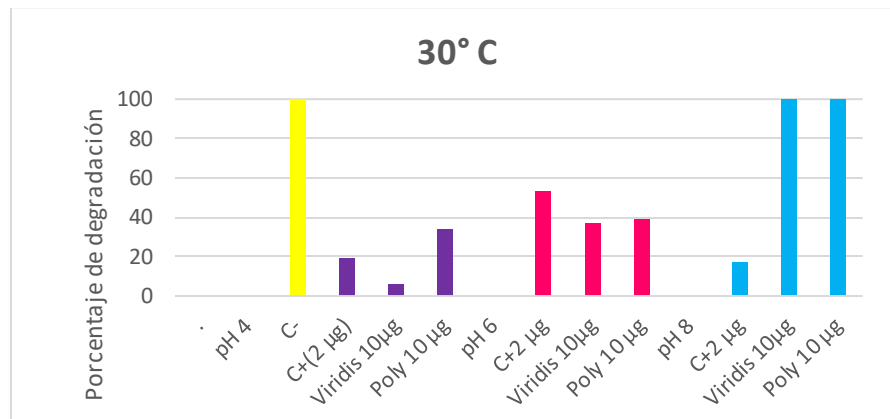
En la **figura 24 A**. Se pueden observar los porcentajes de degradación en una temperatura de 30 ° C, con los tres pH (4, 6 y 8), con una concentración de 3 µg/µl de gelatina con 10 µg del veneno total de ambas especies, donde se observa una reducción en la concentración de la gelatina.

En un pH 4 en *S. viridis* Say se degrado un 6%, en *S. polymorpha*, se degrado un 34%.

A un pH 6 en *S. viridis* Say se degrado un 37%, y en *S. polymorpha*, se degrado un 39%.

A un pH 8 en ambas especies no hay degradación.

Por lo tanto, a esta temperatura el pH 6 es el indicado.



**FIG. 24 A.** Porcentaje de degradación de la gelatina en presencia del veneno de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*. (López, 2019).

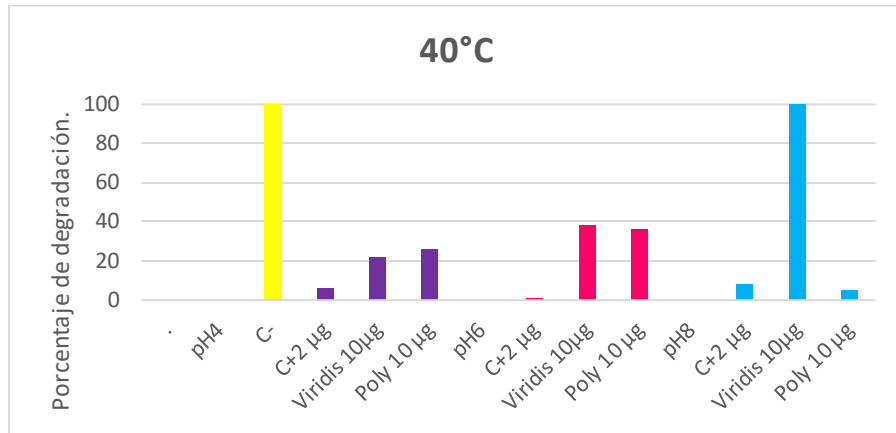
En la **figura 24 B**. Los resultados indican el porcentaje de degradación en una temperatura de 40° C con los pH 4, 6, 8, con una concentración de gelatina de 3 µg/µl, con 10 µg del veneno total de ambas especies, se observa una reducción en la concentración de la gelatina.

En un pH 4 en *S. viridis* Say se degrado un 22%, y en *S. polymorpha*, se degrado un 26%.

A un pH 6 en *S. viridis* Say se degrado un 38%, y en *S. polymorpha*, se degrado un 36%.

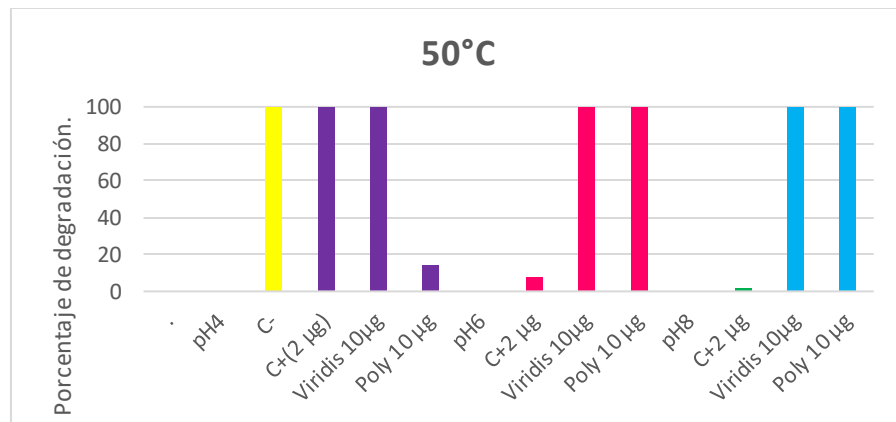
A un pH 8 en *S. viridis* Say no hay degradación, y en *S. polymorpha*, se degrado un 5%.

Por lo tanto, a esta temperatura, el pH que ofrece una mayor degradación de gelatina es el pH 6.



**FIG. 24 B.** Porcentaje de degradación de la gelatina en presencia del veneno de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*. (López, 2019).

En la **figura 24 C**. Se observan los resultados del porcentaje de degradación, en una temperatura de 50° C con los pH 4, 6, 8, con una concentración de 3 µg/µl de gelatina con 10 µg del veneno total de ambas especies, donde no se observa una mayor degradación. En un pH 4 solo en *S. polymorpha*, se observa un 14% de degradación, en un pH 6 y 8 no se observa reducción en la concentración de la gelatina, lo que quiere decir, que en estas condiciones no es posible llevar a cabo esta técnica.



**FIG. 24 C.** Porcentaje de degradación de la gelatina en presencia del veneno de *S. viridis* Say y *S. polymorpha*. (López, 2019).

## 9.- DISCUSIÓN.

El objetivo del presente trabajo fue identificar a las proteínas con mayor actividad de proteasa presentes en el veneno de *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha*.

La limitante principal para llevar a cabo este estudio con el veneno del ciempiés, es la cantidad de material venenoso que se obtuvo de cada organismo, ya que lo que se obtiene, son cantidades muy mínimas de muestra dadas en microgramos ( $\mu\text{g}$ ).

Debido a la dificultad para reunir una cantidad en miligramos (mg) del material venenoso, no se ha podido delimitar un rango en la colecta del número de ciempiés, el tamaño del organismo o la zona específica de colecta, lo único importante es contar con una cantidad en miligramos (mg) de veneno, para poder realizar los objetivos planteados en el presente trabajo, con los venenos de *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha*.

Los venenos que se presentan en una gran variedad de organismos ponzoñosos tienen componentes proteicos asociados a distintas alteraciones fisiológicas, que podrían ser mortales. Los venenos de los ciempiés son mezclas complejas de componentes bioquímicos y farmacológicamente activos, estos venenos tienen como función principal, inmovilizar a la presa para poder digerirla, o bien, como mecanismo de defensa frente a otros depredadores.

Se han reportado algunas actividades enzimáticas del veneno, solo por mencionar algunas, la actividad citotóxica, hemolítica, coagulante, fosfolipasa, hialorunidasa, proteasa, entre otras.

Los ciempiés por la poca mortalidad que ocasionan en el hombre, las investigaciones no le brindan gran atención, y se enfocan más en los venenos de escorpiones, serpientes y tarántulas. La falta de interés en conocer la composición bioquímica del veneno de estos escolopendromorfos se ve afectada por la poca información disponible sobre estos

animales, en comparación con los escorpiones, serpientes y tarántulas y por la poca evidencia de síntomas causados por su veneno (Rates *et al.*, 2007).

En la primera técnica realizada, se identificó el perfil proteico del veneno de *Scolopendra viridis* Say y de *Scolopendra polymorpha*, (Figura 16), que se realizó por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, permitiendo obtener cada una de las proteínas contenidas en los venenos de *Scolopendra viridis* Say y de *Scolopendra polymorpha*, las cuales están dentro de un rango de marcadores de peso molecular de 10 a más de 250 KDa. Con estos datos podemos identificar que el veneno tiene una gran variedad proteica, y sería relevante poder identificar a que tipo de proteasa corresponde cada una de ellas, y así podrían realizar nuevos estudios de forma específica.

Como se puede observar en la tabla 3, se han reportado proteínas con actividad de proteasas, así como su peso molecular. El rango que se puede apreciar va de 15 a más de 250 KDa. Otro dato relevante son los métodos que utilizan para la identificación de estas proteínas que son: zimogramas y por SDS-PAGE, que son los mismos realizados en este trabajo.

**Tabla 3.** Identificación de las proteasas presentes en otras especies de *Scolopendras*.

Especie	PM (KDa)	Método de identificación de la actividad de proteasa.	Referencia
<i>S. viridicornis</i>	44, 22 KDa	SDS-PAGE Zimograma.	Malta <i>et al.</i> (2008)
<i>O.pradoi</i>	35,23 y 15 KDa		
<i>C. iheringi</i>	121,44 y 25 KDa		
<i>Scolopendra gigantea.</i>	dos bandas $\geq$ 250 KDa ,116, 100, 51 26, 22 y 34 KDa.	SDS-PAGE Zimograma.	Granado, C. (2014).
<i>Bothrops ammodytoides</i>	25 y 46 kDa.	Zimograma.	Clement, H. (2019).

El segundo método utilizado para la determinación de la prueba directa con la actividad de proteasa con el veneno total (Figura 18), se utilizaron 100 µg de *Scolopendra viridis* Say y de *Scolopendra polymorpha*, 53 µg, esta prueba se hizo sobre gelatina al 15%, donde la aparición de unos halos confirma dicha actividad enzimática.

En este trabajo, el tercer método empleado fue por zimografía, donde se logró la identificación de las proteínas con mayor actividad de proteasa de los venenos de *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha* (Figura 20), reportando lo siguiente:

Para *Scolopendra viridis* Say, se visualizaron 5 bandas proteicas con pesos moleculares de  $\geq 112, 75, 45, 25$  y 18 KDa. y para *Scolopendra polymorpha*, se observaron 6 bandas proteicas con pesos moleculares de  $\geq 115, 32, 26, 22, 11, 5$ .

Como podemos apreciar, encontramos proteínas con pesos moleculares arriba de 115 KDa., así como también, proteínas de bajo peso molecular (5 KDa.).

Para la determinación de la prueba directa con la actividad de proteasa con proteínas puras de *Scolopendra viridis* y de *Scolopendra polymorpha*, el método que se utilizó para la purificación de las proteínas, fue la electroelución, donde se pudo obtener la proteína pura de *Scolopendra viridis* Say, con un peso molecular aproximado de  $\geq 112$  KDa., y con ella se realizó la actividad directa, usando como sustrato gelatina comercial al 15%, la formación de un halo cuyas medidas fueron de 2 mm, confirman dicha actividad, y para *Scolopendra polymorpha*, se obtuvo la proteína pura de peso molecular aproximado de  $\geq 115$  KDa., dando un halo de 2 mm, con esos datos confirmamos que ambos venenos tienen actividad de proteasa (Figura 19-A y 19-B).

Con los datos obtenidos, cabe mencionar que en el trabajo realizado por Malta *et al.* no se reportó alguna proteína con peso molecular de 75 KDa., en el caso de *Scolopendra viridis* Say, si hay una con ese peso molecular, de igual manera tampoco se reportó alguna proteína con peso molecular de 5 KDa, que presentó *Scolopendra polymorpha*. Estas dos

proteínas podrían ser caracterizadas para saber a qué tipo de proteínas pertenecen, y que función es la que realizan.

En el trabajo de Granado, C. no se reportó alguna proteína con peso molecular de 75 y 45 KDa., que se identificaron en *Scolopendra viridis* Say, así como tampoco, proteínas con peso molecular de 11 y 5 KDa., que se encontraron en *Scolopendra polymorpha*. Por tal motivo, es necesario realizar estudios que permitan la identificación de la actividad enzimática que tienen estas proteínas, para realizar nuevos estudios.

En el trabajo de Clement, H. solo se reportan dos proteínas de 25 y 46 KDa.

En el caso de *Scolopendra viridis* Say, se reportan tres más, con los siguientes pesos moleculares  $\geq 112,75$ , y 18 KDa.

En *Scolopendra polymorpha* se reportan cinco más, con los siguientes pesos moleculares  $\geq 115$ , 32, 22, 11, 5. Sería interesante conocer la actividad enzimática que presentan cada una de las proteínas identificadas para futuros estudios.

Como podemos observar, entre los trabajos reportados y lo obtenido en éste, hay varias proteínas que no fueron reportadas, esto posiblemente se pueda deber a ciertos factores que pudieron haber interferido en la identificación de proteasas en los venenos de las otras especies, solo por mencionar algunos factores, es la diferencia del hábitat, la ecología del ciempiés, que tanto sea su depredación, las condiciones de cautiverio en la cuales se mantuvo al ciempiés, el tipo de alimentación (en este caso eran tenebrios cada tercer día, y como estaban aislados, eso hace que el ciempiés no este estresado ya que no estaban presionados para utilizar su veneno, sea para defensa o para su alimentación.

Sería interesante poder caracterizar a cada uno de ellos, para poder conocer más a fondo a que tipo de proteasa pertenecen, y cuál es su función principal.

Finalmente, el ensayo de turbidimetría se realizó bajo tres condiciones de temperatura 30, 40 y 50° C y de pH 4, 6 y 8, el resultado mostro una disminución en la absorbancia, con lo

que se determinó el porcentaje de degradación, con el veneno total de *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha*.

Entre las tres temperaturas empleadas con los tres pH 4, 6 y 8, observamos las mejores condiciones para realizar esta prueba, las cuales son, con una temperatura de 30 y 40 ° C, el pH 6 es el adecuado. (Figura 21 y 22)

Como se puede observar, las proteasas efectivamente llevan a cabo el proceso de hidrolisis, por lo tanto, podrían ser de gran interés a nivel biotecnológico.

Es importante buscar nuevas técnicas para poder caracterizar cada una de las proteínas encontradas, así como también su actividad enzimática.



## 10.- CONCLUSIONES.

- ◆ En el perfil proteico de *S. viridis* Say, se observan 27 bandas proteicas dentro de un rango de marcadores de peso molecular de 10 a 250 KDa.
- ◆ En el perfil proteico de *S. polymorpha*, se observan 16 bandas dentro de un rango de marcadores de peso molecular de 10 a 250 KDa.
- ◆ Los venenos de *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra. Polymorpha*, si tienen actividad de proteasa.
- ◆ Los pesos moleculares aproximados que presentan actividad de proteasa en *Scolopendra viridis* Say, son:  $\geq 112,75,45,25$  y 18 KDa.
- ◆ El peso molecular aproximados que presentan mayor actividad de proteasa en *Scolopendra viridis* Say, es uno  $\geq 112$  KDa.
- ◆ Los pesos moleculares aproximados que presentan actividad de proteasa en *Scolopendra polymorpha* son:  $\geq 115, 32, 26, 22, 11, 5$ . KDa.
- ◆ El peso molecular aproximados que presentan mayor actividad de proteasa en *Scolopendra polymorpha*, es uno  $\geq 115$  KDa.
- ◆ Las mejores condiciones para que se lleve a cabo un mayor porcentaje de degradación, son con un pH de 6, en una temperatura de 30 y 40 °C.

## 11.-PERSPECTIVAS.

- Estudiar todas las proteínas, que están presentes en el veneno de *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha*.
- Separar y purificar parcial o totalmente las proteínas presentes en el veneno de *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha*.
- Realizar los estudios correspondientes, para caracterizar cada una de las proteínas identificadas.
- Evaluar otro tipo de actividad enzimática.

## 12.- REFERENCIA.

Abarca, C., Balbás, P., Gutiérrez, C. (2001). ¿Saber el uso en la medicina tradicional de la escolopendra? En hojas de la comunidad 2000. Chao, A. (2001). Unidad Central de Estudios para el Desarrollo Social (UNICEDES). Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Anwar A., Saleemuddin M. (1998) Alkaline proteases: A review. *Bioresouce Technology*. 64: 175-183.

Barnes, R. (1989). Zoología de invertebrados. Tercera edición, Ed. Interamericana, México.

Berg J. M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2007) Bioquímica. Sexta edición. Ed. Reverte, Barcelona, España. P.p250-255.

Brusca R. C., Brusca G. J. (2005) Invertebrados. 2da Edición. Ed. *McGraw-Hill/Interamericana de España S. A.* P.p. 691-705.

Calderón-Romero, L., Tay-Zavala, J., Sánchez-Vega, J.T. y Ruiz, S.D. (2004). Los artrópodos y su importancia en la medicina humana. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 47 (5).

Castañeda, P. (2000). Toxinas animales: Acciones facilitadoras de la transmisión colinérgica. *Revista Biología* 14 (1).

Cevallos M. A., Navarro-Duque C., Valera-Julia M., Alagón A. C. (1995) Molecular Mass Determination and Assay of Venom Hialuronidases by Sodium Dodecyl SulfatePolyacrylamide Gel Electrophoresis. *Toxicon* 30: 15153-15161.

Chao, J.L., Chang, H.W. (2006) Variation of the poison duct in Chilopodacentipedes from Taiwan. *Norwegian Journal of Entomology*. 53: 139-151.

Choo Y. M., Lee K. S., Yoon H. J., Kim B. Y., Sohn M. R., Roh J. Y., Je Y. H., Kim N. J., Kim I., Woo S. D., Sohn H. D., Jin B. R. (2010) Dual function of a bee venom serine protease: Prophenoloxidase-activating factor in Arthropods and fibrinolytic enzyme in mammals. *PLoS ONE* 5 (5): e10393.

Clement, H. (2019). Caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Naturales. (CEIB-UAEM).

Cooper A. M., Kelln W. J., Hayes W. H. (2014) Venom regeneration in the centipede *Scolopendra polymorpha*: evidence for asynchronous venom component synthesis. *Zoology* 117: 398-414.

Currier R. B., Calvete J. J., Sanz L., Harrison R. A., Rowley P. D., Wagstaff S. C. (2012) Unusual stability of messenger RNA in snake venom reveals gene expression dynamics of venom replenishment. *PLoS ONE* 7, e41888, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041888>. Dani M. P., Richards E. H., Isaac R. E.,

Edwards J. P. (2003) Antibacterial and proteolytic activity in venom from endoparasitic wasp *Pimpla hypocondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Physiology* 49: 945-954.

Delgado C. A., Miguillon C., Joglar T. J. (2004) Introducción a la química terapéutica. 2da Edición. Ed. *Díaz de Santos*. Madrid, España. Pp: 411-412.

Deshimaru M., Ogawa T., Nakashima K., Nobuhisa I., Chijiwa T., Shimahigashi Y., Fokumaki Y., Niwa M., Yamashina I., Hattori S., Ohno M. (1996) Accelerated evolution of crotaline snake venom gland serine protease. *FEBS letter* 397: 83-88.

Foddai, D., Pereira L. A., Minelli A. (2002) Geophilomorpha. In: Llorente-Bousquets, J. y J.J. Morrone (Eds.). *Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento*, Vol. III. UNAM-CONABIO, México. Pp. 417-427.

Fry B. G., Roelants K., Champagne D. E., Scheib H., Tyndall J. D. A., King G. F., Nevalainen T. J., Norman J. A., Lewis R. J., Norton R. S., Renjifo C., de la Vega R. C. R., (2009) The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10: 483–511. A

Fry B. G., Roelants K., Norman J. A. (2009) Tentacles of venom: Toxic protein convergence in the Kingdom. *Journal of Molecular Evolution* 68 (4): 311-321. B

Gawade S. (2007). Therapeutic alternatives from venoms and toxins. *Indian J. Pharmacol.* 39: 260-264

González, L. (2005). Purificación y Secuenciación de los componentes tóxicos del veneno del ciempiés *Scolopendra viridis* Say. Tesis de Maestría. (CEIB-UAEM).

González -Morales L., Diego-García E., Segovia L., Gutiérrez M. C., Possani L. D. (2009) Venom from the centipede *Scolopendra viridis* Say: Purification, gene cloning and phylogenetic analysis of a phospholipase A2. *Toxicon* 54: 8-15.

González-Morales L., Pedroza-Escalona M., Diego-García E., Restano-Cassulini R., Bautista V. F. C., Gutiérrez M. C., Possani L. D. (2014) Proteomic characterization of the venom and transcriptomic analysis of the venomous gland from the Mexican centipede *Scolopendra viridis*. *Journal of proteomics* 111: 224-237.

Granado, C. (2014). Perfil proteico y actividad enzimática del veneno de *Scolopendra gigantea*. Trabajo especial de grado para optar al título de Licenciado en Biología (FECTDB-UC).

Hagaky Y., Naoki H., Fujita T., Hisada M., Nakajima T. (1997) Characterization of spider venom by mass spectrometry, construction of analytical system. *Yakugaku Zasshi* 117(10-11): 728.

Heinz M. K. (2004) Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology* 15(4): 330-334.

Huari F., Lazo F., Vivas D., Rodríguez E., Yarleke A. (2016) Caracterización parcial de dos proteasas del veneno de la araña casera del Perú *Laxosceles laeta*. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 82(3): 296-305.

Ibarra, E. (2011). Identificación y caracterización de Hialuronidasas presentes en el veneno de *Scolopendra viridis* Say, 1821. Tesis de Licenciatura (CEIB-UAEM).

Labbe, J., Rebegrotte P., Turpine M., (1974). Demonstrating extracellular leucine aminopeptidase (EC3.4.1) of *Aspergillus oryzae* (IP410) leucine aminopeptidase 2 fraction C.R: Academy of Sciences 278:2699.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-85.

Leopold A. S., McCabe R. A. (1957) Natural history of the Montezuma quail in Mexico. *The Condor* 59(1): 3-26.

Lewis, R.J. y Garcia, M.L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery* 2:790-802.

Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Fan A.L y Randall R.J. J (1951). *Biol. Chem.* 193:265.

Malta M. B., Lira M. S., Soares S. L., Rocha G. C., Knysak I., Martins R., Guizze S. P. G., Santoro M. L., Barbaro K. C. (2008) Toxic activities of Brazilian centipede venoms. *Toxicon* 52: 255-263.

Manjabacas T. M. C. (1995) Análisis cinético de la activación de zimógenos: Aplicación a algunos casos particulares. *Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla. La Mancha*. Tesis Doctorales N° 25 Pp: 18-22.

Markland F. S., Perdon A. (1986) Comparison of two methods for proteolytic enzyme detection in snake venom. *Toxicon* 24(4): 385-393.

Matsui T., Fujimura Y., Titani K. (2000) Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1477: 146-156.

Menez, A. (2002). Perspectives in molecular toxinology. John Wiley & Sons. Ltda. Inglaterra. 485 p.

Montes M. C., Magaña I. (2002) Enzimas con aplicación industrial. *Avances y perspectivas* 21: 279-282.

Morón-Ríos A., Huerta-Lwanga E. (2006) Soil macrofauna of two sucesional evergreen cloud forest stages from the Cerro Huitepec Nature Reserve, San Cristóbal de la Casas, Chiapas, México. *Interciencia* 31(8): 611-615.

Müller-Esterl W., Brandt U., Anderka O., Kieb S., Ridinger K., Plenikowski M. (2008) *Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. 2da Edición. Ed. Reverté Barcelona, España. P.p: 168-169.

Olson B, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci*. 2007;0: Unit 3.4

Ortiz C., Lazo F., Bellido C., Gonzalez E., Yarleque A. (2012) Variaciones de las actividades enzimáticas del veneno de la Serpiente *Bothrops atrox* “jergon”, de tres zonas geográficas del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 29(2):198-205.

Parkinson N., Richards E. H., Conyers C., Smith I., Edwards J. P. (2002) Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypocondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 729-735.

Pedroso C. M., Antoniazzi M. M., Knysak I., Martins R., Guizze S. P. G., Barbaro K. C., (2007) Comparative morphological study of venom glands of *Cryptops iheringi*, *Otostigmus pradoi* and *Scolopendra viridicornis* centipede. *Memorias Do Instituto Butantan* 64: 4-13.

Rates B., M. Bemquerer, M. Richardson, M. Borges, R. Morales, M. De Lima & A. Pimenta (2007). Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon*. 49: 810-826.

Sanabria, B., Ortega-Rubio A., Argüelles-Méndez C. (1995) Food habits of the coyote in the Vizcaino desert, México. *Ohio Journal of Science* 95(4): 289-291.

Takahashi T., Ohsaka A. (1970) Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 198: 293-307.

Tay-Zavala, J., Castillo-Alarcón, L., Sánchez-Vega, J.T. y Romero- Cabello, R. (1998). Insectos Venenosos de importancia médica. *Rev Fac Med UNAM* 41(6):241-246.

Tiago E. H., Gorini A. B. (2011) Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* 57:497-511.

Theron, L.W., y Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98:8853–8868.

Undheim E. A. B., King G. F., (2011) On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon* 57: 512–524.

Undheim E. A. B., Jones A., Clauser K.R., Holland J.W., Pineda S.S., King G.F., Fry B.G. (2014) Clawing through evolution: Toxin diversification and convergence in the ancient lineage Chilopoda (Centipedes) *Molecular Biology and Evolution* 31(8):2124-2148.

Undheim E. A. B., Fry B.G., King G.F. (2015) Centipede venom: Recent discoveries and current state of knowledge. *Toxins* 7:679-704.

Wallace, A. (2007). Principles and methods of toxicology. CRC Press. E.E.U.U. P.p 2270.

Winningham K. M., Fitch C. D., Schmidt M., Hoffman D. R. (2004) Hymenoptera venom protease allergens. *Journal of Allergens and Clinical Immunology* 114: 928-933.

Zlotkin E., Rochat H., Kopeyan, Miranda F., Lissitzky S. (1971) Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Biochimie* 53: 1073-1078.

## 13.- ANEXOS

### 13.1. Método de Lowry

**Reactivos:** Albumina de suero bovino (BSA)  
Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )  
Hidróxido de sodio (NaOH)  
Tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )  
Sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ )  
Folin Ciocalteau

**Soluciones:** Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%  
Solución B: NaOH 0.1 M  
Solución C:  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  al 1%  
Solución D:  $\text{CuSO}_4$  al 1%  
Solución E: Folin  
Solución F: BSA 3 mg/ml.  
Solución 1: Carbonato de Sodio con Hidróxido de Sodio en 100 ml.  
Solución X: Por cada 25 ml. de Solución 1, agregar 250  $\mu\text{l}$  de solución C y D.

#### Curva Estándar de proteína

TUBO	BSA ( $\mu\text{l}$ )	AGUA ( $\mu\text{l}$ )	MUESTRAS	SOL. X	FOLIN	DENSIDAD ÓPTICA 560 nm
1	---	1 ml.	---	2 ml.	100 $\mu\text{l}$	Blanco
2	(1 $\mu\text{g}$ ) 0.33 $\mu\text{l}$	999.67 $\mu\text{l}$	---			----
3	(3 $\mu\text{g}$ ) 1 $\mu\text{l}$	999 $\mu\text{l}$	---			----
4	(7.5 $\mu\text{g}$ ) 2.5 $\mu\text{l}$	997.5 $\mu\text{l}$	---			----
5	(1 $\mu\text{g}$ ) 5 $\mu\text{l}$	995 $\mu\text{l}$	---			----
6	---	999.5 $\mu\text{l}$	0.5 $\mu\text{l}$			----

La densidad óptica se lee en un espectrofotómetro Genesis 10S/UV/VIS, a 560 nm. Agregado el folin, se incubó 15 min. a temperatura ambiente para que haga reacción, y posteriormente se hacen las lecturas, y se obtiene el resultado a través de una regresión lineal para obtener los valores de r, m y b. La fórmula para el cálculo es  $y = mx + b$  que ya despejada queda  $x = (y - b) / m$  donde “y” es igual a la lectura de la muestra.



### 13.2. SDS-PAGE 12%.

**Reactivos:** Acrilamida  
Bis-acrilamida  
Tris base  
Dodecil sulfato de sodio (SDS)  
Persulfato de amonio (APS)  
Tetrametiletilenediamina (TEMED)  
Glicina  
Ácido acético  
H<sub>2</sub>O Mili-Q  
Azul de bromo fenol  
Glicerol

**Soluciones:** Acrilamida 30 %  
Bis-acrilamida 0.8%  
Buffer de arriba para el gel concentrador: Tris base 0.5 M pH 6.8  
Buffer de abajo para el gel separador: Tris base 1.5 M pH 8.8  
SDS 10 %  
APS 10%  
Buffer de corrida pH 8.6: Tris base 0.25 M/Glicina 0.19 M/ SDS 0.1 %  
BSA 3µg/µl  
Buffer de carga: SDS 4%/Glicerol 20%/Azul de bromo fenol 0.05%/Buffer de arriba.

#### PREPARACIÓN DEL GEL

Gel separador	12%
H <sub>2</sub> O Mili-Q	1.36 ml
Acrilamida	1.6 ml
Tris pH 8.8	1.04 ml
SDS 10 %	56 µl
APS 10%	56 µl
TEMED	8 µl

Gel concentrador	4%
H <sub>2</sub> O Mili-Q	850 µl
Acrilamida	208 µl
Tris pH 6.8	156 µl
SDS 10 %	12.5 µl
APS 10%	12.5 µl
TEMED	8 µl

Ya que se tiene el gel polimerizado, se coloca en el casset de carga, donde será sumergido en buffer de corrida, y se cargarán las muestras previamente suspendidas en buffer de carga, se corre con un flujo de corriente de 50 V, para empaquetar las muestras y que pasen al gel separador, posteriormente se sube la corriente a 75 V y se deja durante 2 hrs.

### 13.3. Tinción de coomassie y plata.

**Reactivos:** Metanol  
Ácido acético  
Azul de coomassie R-250

**Soluciones:** Metanol 45.45%  
Ácido acético 9.2 %  
Azul de coomassie R-250 0.25 %

#### **TINCIÓN DE COOMASSIE** (Limite de detección 1 mg. de proteína).

Transcurrido el tiempo de corrida, el gel es transferido a una solución de coomassie (Metanol 30%/Ácido acético 10 %/Azul de coomassie R-250 0.25%) durante 30 min., posteriormente se retirará el azul de coomassie y se adicionará una solución desteñidora (Metanol 30 %/Ácido acético 10 %/Agua 60 % grado mili-Q), realizando los cambios necesarios para eliminar el exceso del colorante, y de esa forma poder visualizar las bandas de interés.

**Reactivos:** Metanol  
Ácido acético  
Tiosulfito de sodio  
Nitrato de plata  
Carbonato de sodio  
Formaldehido  
Etanol

**Solución:** Metanol 50%  
Ácido acético 10%, 0.1%  
Tiosulfito de sodio 0.2 g/L.  
Nitrato de plata 2 g/L:  
Carbonato de sodio 0.145 M  
Formaldehido 0.0014%  
Etanol 20%.

#### **TINCIÓN DE PLATA** (Limite de rango de detección 5 a 10 µg de proteína).

Una vez terminada la electroforesis, el gel es transferido a una solución fijadora o desteñidora (metanol 30%/Ácido acético 10 %/agua 60%) durante 30 min., después se retira la solución y se lava con etanol al 20% por 20 min., enseguida se lava 20 min. con

agua grado milli-Q, para después adicionar Tiosulfito de sodio (0.2 g/L) durante 5 min., se realiza otro lavado con agua grado milli-Q, para incubar el gel en nitrato de plata (2 g/L) en oscuridad durante 30 min., después lavar nuevamente con agua milli-Q 20 segundos, finalmente el gel es revelado con una solución reveladora (carbonato de sodio 0.145 M/ Tiosulfito de sodio 0.2 g/L/ Formaldehido 0.0014%), la reacción es frenada con Ácido acético 1%.

#### **13.4. Solución desteñidora.**

**Reactivos:** Metanol  
Ácido acético  
Agua

**Soluciones:** Metanol 30 %  
Ácido acético 10 %  
Agua 60 %

#### **13.5. Actividad de proteasa directa.**

**Reactivos:** Tris- base  
Gelatina

**Soluciones:** Buffer Tris-Base 0.1 M pH 7.9  
Gelatina al 15 %

Para realizar la placa, la gelatina se disolverá en el buffer Tris- Base, calentándolo suavemente en el microondas, ya disuelto la gelatina se verterá en una caja petri hasta que se gelifique.

### 13.6. Zimograma con 1.5 % de gelatina para la actividad de proteasa.

**NOTA:** SDS-PAGE 12% ver anexo 13.2

**Reactivos:** Gelatina comercial  
Tritón-100  
Tris

**Soluciones:** Gelatina 1.5%  
Tris 20 mM pH 6.8  
Tritón X-100 0.5%  
Tritón X-100 0.05%

#### PREPARACIÓN DEL GEL

Gel separador	12%
H <sub>2</sub> O Milli-Q	1.36 ml
Acrilamida	1.6 ml
Tris pH 8.8	1.04 ml
SDS 10 %	56 µl
APS 10%	56 µl
TEMED	8 µl

Gel concentrador	4%
H <sub>2</sub> O Milli-Q	850 µl
Acrilamida	208 µl
Tris pH 6.8	156 µl
SDS 10 %	12.5 µl
APS 10%	12.5 µl
TEMED	8 µl

Para la preparación de este gel, el agua se mezcla con 1.5% de gelatina por separado, y se calienta para poder disolver, después se incorpora el resto de los reactivos del gel separador, al gel obtenido, se le realizan 2 lavados de 30 min. cada uno, donde el primer lavado será con Tritón X-100 0.5%, después, el segundo lavado será con Tritón X-100 0.05%, el gel se incubará en buffer de Tris 20 mM pH 6.8, se incuba en cámara húmeda a 34° C durante 1 hr. para después dejarla incubada a temperatura ambiente 12 hrs. o más, según lo requerido, finalmente se teñirá con azul de coomassie R-250.

### 13.7. Cálculo del Rf de las bandas.

(Distancia migrada por la proteína / distancia migrada por el frente.)

Para calcular el peso molecular aproximado de cada una de las bandas encontradas en el veneno total del ciempiés por regresión lineal, se hace lo siguiente:

Marcadores	LOGS marcadores (x)	Distancia recorrida de los marcadores	Distancia de corrida del gel	Distancia de corrida del gel/ Distancia de los marcadores (y)	Valores r m b

Muestra	Distancia de corrida del gel	Distancia recorrida de la proteína	Valores r m b	PM

### 13.8. Solución para electroelusión.

**Reactivos:** Tris Base HCl

**Soluciones:** Tris 50 mM pH 6.8

**NOTA:** El buffer que se coloca dentro del tubo, tiene que ser limpio, lo que está en la cámara se puede reutilizar.

### 13.9. Condiciones para la determinación de la actividad de proteasa por ensayo turbidimétrico.

La turbidimetría es una técnica óptica que se sustenta básicamente en los fenómenos ópticos que ocurren durante el paso de un haz de luz a través de un medio, tiene la ventaja de permitir la valorización cuantitativa, sin separar el producto de la solución, las mediciones pueden efectuarse con cualquier espectrofotómetro.

**Reactivos:** Tris Base HCl  
 Ácido tricloroacético (TCA)  
 Gelatina comercial.

**Soluciones:** Tris 0.2 M pH 4,6 y 8  
 Ácido tricloroacético 0.44 M  
 Gelatina 0.3% en Tris (4,6 y 8)

Curva estándar de hidrólisis.

□ Gelatina 0.3%	Tris con gelatina 0.3%	Agua	ABS 280 nm	TCA 0.44 M	Vol. final
30 µg	10 µl	190 µl		120 µl	320 µl
75 µg	25 µl	175 µl			
150 µg	50 µl	150 µl			
250 µg	83.5	116.5 µl			
600 µg	200 µl	---			

**NOTA:** Los cálculos cambiarán dependiendo de la concentración deseada.

Muestra	Tris	Tris con gelatina 0.3 %	Veneno de serpiente	Veneno total S.vS	Veneno total S.p	TCA 0.44M	ABS 280 nm
<b>Blanco</b>	200 µl	-----	-----	-----	-----	120 µl	
<b>Control –</b>	-----	200 µl	-----	-----	-----		
<b>Control + VTS 2 µg</b>	-----	180 µl	20 µl	-----	-----		
<b>VTvS 10 µg</b>	-----	199.6 µl	-----	0.4 µl	-----		
<b>VTp10µg</b>	-----	199.7 µl	-----	-----	0.3 µl		

**NOTA:** Este ensayo se realizó bajo condiciones de temperatura controladas de 30, 40 y 50 °C y con un pH de 4, 6 y 8 cada una, el buffer con la enzima se dejó durante 15 min en la temperatura deseada (para que se llevara a cabo la hidrólisis enzimática), pasado el tiempo, la reacción se detuvo con 120 µl de TCA 0.44 M, dejándolo 15 min en frío, posteriormente se centrifugo durante 15 min a 13000 rpm, para finalmente leer las lecturas a 280 nm.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad Acreditado por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 9 de noviembre de 2021

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **ADRIANA LÓPEZ ESTRADA**, con el título del trabajo: **Identificación de proteínas con actividad de proteasas de los venenos de *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el **voto de calidad** y pueda optar por la Modalidad de **Titulación Profesional por Etapas** como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**ATENTAMENTE**  
*Por una humanidad culta*

JURADO REVISOR	FIRMA
PRESIDENTE: M. EN C. CAROLINA ABARCA CAMACHO	_____
SECRETARIO: M. EN B. JOSÉ MANUEL CASTRO GARCÍA	_____
VOCAL: DRA. MA. DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE	_____
SUPLENTE: BIÓL. LETICIA PEÑA CAMACHO	_____
SUPLENTE: BIÓL. SALVADOR MORALES CORTÉS	_____

Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Tel-fax: (777) 329 7047

[www.uaem.mx/organizacion\\_institucional/unidades\\_academicas/facultades/vecepas\\_biologicas](http://www.uaem.mx/organizacion_institucional/unidades_academicas/facultades/vecepas_biologicas)

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA

