



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

## Maestría en Biotecnología

**Caracterización química de proteasas del veneno de  
*Scolopendra viridis* y *Scolopendra polymorpha*.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A

**INGENIERO EN FARMACOBIOLOGÍA  
MISAEEL CORONA RAMÍREZ**

**Dir. Tesis: Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte**



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

**Cuernavaca, Morelos, mayo 2023**

## DEDICATORIAS

Esta tesis se la quiero dedicar

**A Dios**, por siempre cuidarme en donde quiera que voy, por toda la sabiduría que me brinda para afrontar los problemas y por todas las bendiciones que hace llegar a mi vida.

### **A mis padres:**

**A mi Mamá:** Eres la mujer más importante de mi vida, no solo por traerme al mundo sino por apoyarme en todos los ámbitos de mi vida. Este trabajo te lo dedico y claro que también es tuyo, muchas gracias por todo el apoyo. Te amo.

**A mi Papá:** Gracias por apoyarme siempre. Te dedico este trabajo puesto que también fuiste importante durante este proceso. Te amo.

### **A mis hermanas:**

**Lidia, Eli, Paola y Saira**, por apoyarme siempre de alguna u otra forma y aunque a veces peleamos o discutimos siempre serán mis hermanas y tendrán mi apoyo cuando lo necesiten.

### **A mi cuñado (amigo):**

**Marcos**, eres una gran persona y un gran amigo, siempre es un gusto platicar y aprender algo de ti, sé que seguirás triunfando como hasta ahora lo has hecho, enhorabuena y felicidades por tus logros.

### **A mi novia:**

**Damaris**, gracias por llegar a mi vida. Eres una persona muy especial y te dedico esta tesis porque te conocí durante este proceso y llegaste a alegrar mis días cuando todo se ponía difícil, siempre escuchándome y alentándome para que siguiera adelante. Te amo con todo mi corazón.

## AGRADECIMIENTOS

**Primeramente, doy gracias a mi directora de tesis:**

**A la Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte**, estoy muy agradecido por la oportunidad que me dio de entrar en su laboratorio desde aquella vez en 2018 cuando vine de estancia, así mismo gracias por su apoyo durante todo el trabajo de tesis y por todos aquellos consejos y regaños con los cuales aprendí bastante sobre el tema y pude mejorar el proyecto.

**A la comisión revisora:**

**Dr. José de Jesús Arellano García**

**Dra. María Eugenia Núñez Valdez**

**Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís**

**Dra. Susana Valencia Díaz**

Gracias por el tiempo prestado para la revisión del escrito de tesis y en cada uno de los tutorales, así como también agradezco todas las observaciones y sugerencias que ayudaron a mejorar el proyecto.

**Al Laboratorio de Neurofarmacología**

Primeramente, a la **TLIF. Lucero Valladares Cisneros**, por su valiosa ayuda durante la realización del proyecto de tesis y por cada uno de sus consejos dentro y fuera del laboratorio.

A cada uno de mis compañeros y amigos de laboratorio y del CEIB **Arturo, Pavel, Sara, Irving, Gaby, Martín, Héctor, Dulce, Josué**; por todos esos momentos de convivencia dentro y fuera del laboratorio, y por sus consejos y ayuda no solo académica si no de amistad.

Gracias a la **Maestra Carolina Abarca**, por alentarme siempre con sus palabras antes y después de mis tutorales.

Agradezco de igual manera a la **Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero** y el **Dr. Gerardo Corzo Burguete** por prestarnos y apoyarnos con el uso del Cromatógrafo de HPLC.

Un agradecimiento especial a cada uno de los doctores profesores que formaron parte de mi aprendizaje en las materias que cursé, además agradezco al **Centro de Investigación en Biotecnología** de la UAEM y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la oportunidad, espacio y ayuda que me brindaron para poder obtener un grado más en mi vida profesional.

**CONTENIDO**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1. PROTEASAS .....	4
2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS .....	5
2.2.1. SERÍN-PROTEASAS .....	7
2.2.2. CISTEÍN-PROTEASAS .....	7
2.2.3. METALOPROTEASAS .....	8
2.2.4. ASPARTIL-PROTEASAS .....	12
2.3. RELEVANCIA COMERCIAL DE LAS PROTEASAS .....	12
2.4. FUENTES DE OBTENCIÓN DE PROTEASAS .....	13
2.5. ANIMALES CON VENENO .....	13
<b>2.6. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE SCOLOPENDROMORPHA</b> .....	15
2.7. BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>SCOLOPENDRA</i> .....	15
2.7.1. <i>Scolopendra viridis</i> .....	16
2.7.2. <i>Scolopendra polymorpha</i> .....	16
2.8. ALIMENTACIÓN DE <i>S. viridis</i> y <i>S. polymorpha</i> .....	17
2.9. REPRODUCCIÓN SEXUAL DE <i>S. viridis</i> y <i>S. polymorpha</i> .....	17
2.10. DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO <i>Scolopendra</i> .....	18
2.11. ANTECEDENTES .....	19
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	22

<b>VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	23
<b>VII. METODOLOGÍA</b> .....	24
7.1. Colecta de especies en estudio ( <i>S. viridis</i> y <i>S. polymorpha</i> ). .....	24
7.2. Mantenimiento de los organismos de estudio. ....	24
7.3. Extracción del veneno.....	24
7.4. Liofilización. ....	25
7.5. Cuantificación de proteína. ....	25
7.6. Electroforesis en SDS- PAGE .....	25
7.7. Electroelución .....	26
7.8. Diálisis. ....	26
7.9. Determinación de la Actividad Proteasa.....	27
7.9.1. Zimograma. ....	27
7.9.2. Actividad directa en caja Petri.....	27
7.10. Determinación de tipo de proteasas.....	28
7.11. Determinación de pureza de proteasas mediante HPLC .....	28
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	29
8.1. Obtención del veneno. ....	30
8.2. Perfil proteico de los venenos de <i>S. viridis</i> y <i>S. polymorpha</i> . ....	31
8.3. Estandarización de la técnica de zimograma .....	33
8.4. Zimograma (Actividad de proteasa de los venenos de <i>S. viridis</i> y <i>S. polymorpha</i> ).....	35
8.5. Determinación tipo de proteasa mediante inhibidores específico. ....	38
8.6. Purificación e identificación de las proteínas con actividad proteasa .....	41
8.7. Determinación de la actividad de proteasa directa en caja Petri. ....	43
8.8. Determinación de pureza de proteasas mediante RP-HPLC.....	44

<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	47
<b>X. PERSPECTIVAS</b> .....	47
<b>BIBIOGRAFIA</b> .....	48
<b>ANEXOS</b> .....	54
Anexo 1. Curva estándar de BSA, para el método de Lowry .....	54
Anexo 2. Soluciones método de Lowry .....	54
Anexo 3. Componentes y proporciones del gel concentrador y separador de poliacrilamida al 12% con SDS. ....	55
Anexo 4. Componentes para solución de Coomassie .....	56
Anexo 5. Componentes para 100 mL de solución desteñidora. ....	56
Anexo 6. Buffer de electroelución Tris- HCl 50mM pH 6.8. ....	56
Anexo 7. Zimograma con 0.2 % de gelatina para la actividad de proteasa. ....	57

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de las peptidasas.....	5
<b>Figura 2.</b> Sitio activo Serín Proteasas.....	7
<b>Figura 3.</b> Sitio activo Cisteín-Proteasas.....	8
<b>Figura 4.</b> Sitio activo Metaloproteasas.....	9
<b>Figura 5.</b> Sitio activo Aspartil-Proteasas.....	12
<b>Figura 6.</b> Anatomía del genero <i>Scolopendra</i> .....	116
<b>Figura 7.</b> Incubación de <i>S. polymorpha</i> .....	117
<b>Figura 8.</b> Distribución <i>Scolopendra viridis</i> en México.....	118
<b>Figura 9.</b> Perfiles proteicos en geles SDS-PAGE al 12% de <i>S. polymorpha</i> y <i>S. viridis</i> .....	31
<b>Figura 10.</b> Visualización de las bandas del veneno de serpiente con actividad proteasa.....	33
<b>Figura 11.</b> Protocolo óptimo para visualización de la actividad de proteasas del veneno de ciempiés y de proteínas puras. ....	34
<b>Figura 12.</b> Zimograma al 12% (0.2% de gelatina) de los venenos totales de ambas especies de ciempiés.....	35
<b>Figura 13.</b> Zimogramas al 12% (0.2% de gelatina como sustrato) de los venenos totales de ambas especies de ciempiés .....	36
<b>Figura 14.</b> Zimogramas al 12% (0.2% de gelatina como sustrato) del veneno de <i>S. polymorpha</i> con inhibidores .....	38
<b>Figura 15.</b> Zimogramas al 12% (0.2% de gelatina como sustrato) del veneno de <i>S. viridis</i> con inhibidores.....	39
<b>Figura 16.</b> Zimograma al 16% (0.2% de gelatina) de proteínas electroeluidas del veneno de <i>S. viridis</i> .....	42
<b>Figura 17.</b> Actividad directa de proteasa de las proteínas electroeluidas de ambos venenos.....	43
<b>Figura 18.</b> Cromatograma RP-HPLC de veneno de <i>Scolopendra viridis</i> .....	44



**Figura 19.** Cromatograma RP-HPLC de proteína de 45 KDa de *Scolopendra viridis*.  
 ..... 45

**Figura 20.** Cromatograma RP-HPLC de proteína de 216 KDa de *Scolopendra viridis*  
 ..... 45

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Características de las endoproteasas. .... 6

**Tabla 2.** Clasificación de metaloproteasas Clan MA.. .... 10

**Tabla 3.** Clasificación de metaloproteasas de la matriz ..... 11

**Tabla 4.** Reporte Metaloproteasas ..... 19

**Tabla 5.** Reporte de proteínas con actividad proteasa ..... 19

**Tabla 6.** Reporte de proteasas de *S. gigantea*..... 20

**Tabla 7.** Soluciones amortiguadoras probadas para la estandarización de la  
 técnica de zimograma. .... 33

**Tabla 8.** Proteínas electroeluidas de los venenos totales de *S. viridis* y *S.*  
*polymorpha* con actividad proteasa. .... 41





## ABREVIATURAS

<b>APS</b>	Ammonium persulfate (persulfato de amonio)
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin (seroalbúmina bovina)
<b>CEIB</b>	Centro de Investigación en Biotecnología
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	Sulfato cúprico
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
<b>IBT</b>	Instituto de Biotecnología
<b>KDa</b>	kiloDaltons
<b>L</b>	Litro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de Sodio
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PMSF</b>	fluoruro de fenilmetanosulfonilo
<b>RP-HPLC</b>	Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa)
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
<b>TEMED</b>	Tetrametilen-diamina
<b>TRIS</b>	Trisamina
<b>V</b>	Volts
<b>VT</b>	Veneno total
<b>UAEM</b>	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitros
<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grados Celsius

## RESUMEN

En la naturaleza, diversos animales incluidos los ciempiés han desarrollado la capacidad de producir veneno (Dhama *et al.*, 2016). Entre las moléculas que componen a los venenos de ciempiés se encuentran: serotonina, acetilcolina, histamina, lípidos, polisacáridos y enzimas como proteasas, hialuronidasas y esterases, en el caso de las proteasas estas realizan una actividad predigestiva 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 a través del torrente sanguíneo del presa (Menez, 2002; Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008). Las proteasas son un grupo de enzimas con diversas funciones biológicas lo que las convierte en moléculas industrialmente importantes (Heinz, 2014). Por tal motivo, el propósito de esta investigación fue determinar las enzimas responsables de la actividad proteolítica de los venenos de *S. viridis* y *S. polymorpha*, que son dos especies abundantes en el estado de Morelos. Primero se determinó el perfil electroforético por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, donde se encontró una amplia gama de proteínas para ambos venenos con pesos moleculares que oscilan entre 6 KDa y 250 KDa. Posteriormente, se identificó la actividad proteasa de ambos venenos mediante zimogramas que contenían 0,2% de gelatina como sustrato. Para *S. polymorpha*, se identificaron 6 proteínas con actividad proteasa con pesos moleculares de 206, 175, 66, 45, 20 y 10 KDa, respectivamente. Mientras que para *S. viridis* se identificaron 6 bandas con actividad proteolítica, con pesos moleculares de 216, 95, 66, 45, 20 y 10 KDa. También se determinó el tipo de proteasas adicionando inhibidores específicos en la técnica del zimograma, determinando que la mayoría de estas proteasas son metaloproteasas debido a la pérdida de actividad al contacto con el EDTA. De igual forma se encontró el tiempo de retención de las proteasas puras de 216 y 45 KDa de *S. viridis* mediante HPLC-RP, con tiempos de retención de 49 y 48.5 minutos respectivamente. Aunque no se logró obtener la secuenciación de ninguna proteasa, queda como perspectiva para poder obtener más información y complementar este estudio.

## ABSTRACT

In nature, various animals including centipedes have evolved the ability to produce venom (Dhama et al., 2016). Among the molecules that make up centipede venoms are: serotonin, acetylcholine, histamine, lipids, polysaccharides and enzymes such as proteases, hyaluronidases and esterases, in the case of proteases these perform a tissue predigestive activity, working together with phospholipases that digest the plasma membranes of the affected cells, and with hyaluronidases in charge of the diffusion of the toxic components of the venom through the bloodstream of the prey (Menez, 2002; Parrilla-Alvarez et al. , 2008). Proteases are a group of enzymes with diverse biological functions which makes them industrially important molecules (Heinz, 2014). For this reason, the purpose of this research was to determine the enzymes responsible for the proteolytic activity of the venoms of *S. viridis* and *S. polymorpha*, which are two abundant species in the state of Morelos. First, the electrophoretic profile was determined by electrophoresis in 12% SDS-PAGE polyacrylamide gels, where a wide range of proteins was found for both venoms with molecular weights ranging from 6 KDa to 250 KDa. Subsequently, the protease activity of both venoms was identified by zymograms containing 0.2% gelatin as substrate. For *S. polymorpha*, 6 proteins with protease activity were identified with molecular weights of 206, 175, 66, 45, 20 and 10 KDa, respectively. While for *S. viridis*, 6 bands with proteolytic activity were identified, with molecular weights of 216, 95, 66, 45, 20 and 10 KDa. The type of proteases was also determined by adding specific inhibitors in the zymogram technique, determining that most of these proteases are metalloproteases due to the loss of activity upon contact with EDTA. Similarly, the retention time of pure proteases of 216 and 45 KDa from *S. viridis* was found by HPLC-RP, with retention times of 49 and 48.5 minutes, respectively. Although it was not possible to obtain the sequencing of any protease, it remains as a perspective to obtain more information and complement this study.

## I. INTRODUCCIÓN

Los venenos animales son sustancias tóxicas que son introducidos a un organismo a través de un órgano especializado. Están constituidos por una mezcla compleja de compuestos entre los que destacan péptidos y proteínas con actividad neurotóxica, antimicrobiana y anticancerígena. De igual manera se han descrito algunos otros compuestos como aminas, alcaloides, sales y minerales en su composición (Hoffman & Jacobson, 1996; Fry *et al.*, 2009; Undheim & King, 2011; Wong & Belov, 2012). Algunas enzimas reportadas en estos venenos son: quitinasas, cistatinas, hialuronidasas, esfingomelininas D, fosfolipasas A2 y proteasas (Winningham *et al.*, 2004; Malta *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 2009). La presencia de proteasas se ha reportado en venenos de diferentes organismos como son: escorpiones (Almeida *et al.*, 2002), arañas (Veiga *et al.*, 2000), algunos insectos (abejas y avispas) (Hoffman & Jacobson, 1996), reptiles (serpientes) (Deshimaru *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 2000) y **escolopendras** (Malta *et al.*, 2008; Undheim *et al.*, 2014; Undheim *et al.*, 2015). En lo que concierne a proteasas reportadas en venenos de Scolopendromorfos se encuentran serín-proteasas y metaloproteasas (Undheim *et al.*, 2015). Estas enzimas rompen los enlaces peptídicos de proteínas, llegando a causar lisis de las células y liberación subsecuente de bioactivos inflamatorios (Sitprija & Suteparak, 2008). Las proteasas son un grupo de enzimas importantes desde el punto de vista biológico e industrial. Gran número de enzimas han tenido múltiples usos en el sector industrial, entre los que destacan: fabricación de detergentes y ablandadores de carnes; en el rubro de la investigación científica varias técnicas de biología molecular, bioquímica y biotecnología hacen uso de estas enzimas, ejemplo de ello son la utilización de tripsina y quimotripsina (Müller-Esterl *et al.*, 2008; Heinz, 2014). En el área de la salud se ha orientado hacia la producción de fármacos antiinflamatorios, disolventes de coágulos sanguíneos e inhibidores de la transcripción (Anwar & Saleemmudin, 1998). Por lo anteriormente descrito el presente trabajo de investigación se basó en el estudio de la actividad proteasa del veneno de dos especies abundantes del estado de Morelos (*S. viridis* y *S. polymorpha*) con la finalidad de encontrar proteasas que pudieran tener alguna actividad biológica y/o biotecnológica pudiendo ser utilizadas en distintos sectores industriales.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. PROTEASAS

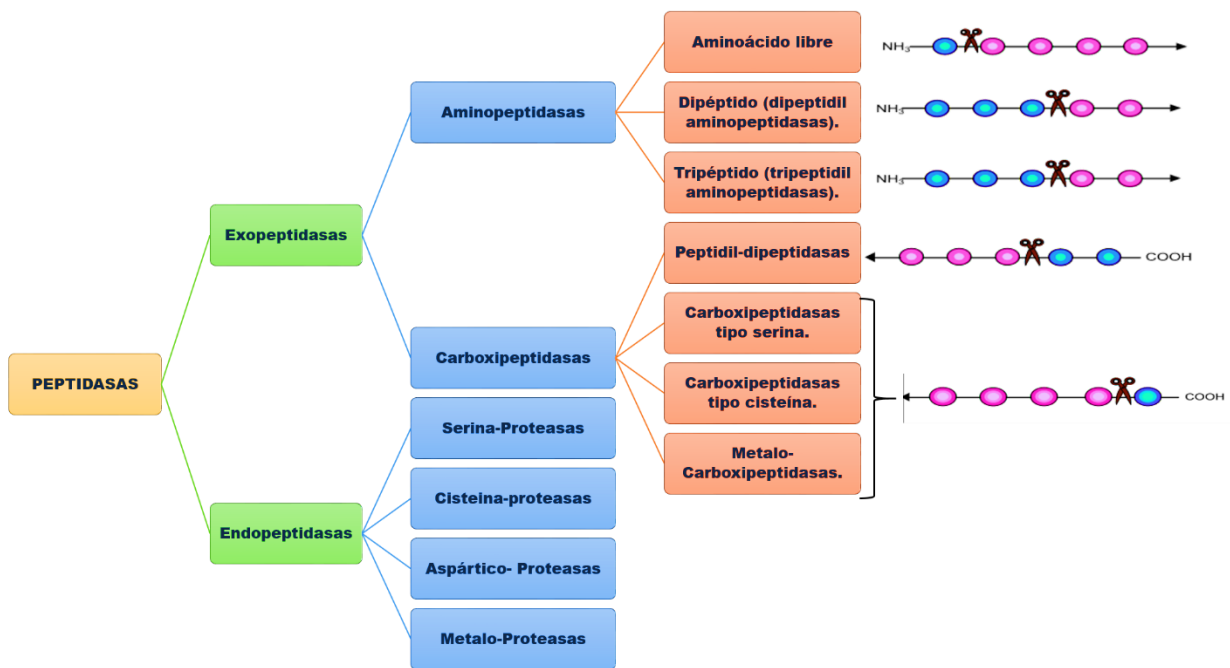
Las proteasas o peptidasas son enzimas proteolíticas, responsables de generar la reacción de hidrólisis de los enlaces peptídicos de otras proteínas, dando como resultado la obtención de péptidos de menor tamaño o incluso aminoácidos libres. La mayor parte de estas enzimas son relevantes en los procesos de modificación y procesamiento post-traduccionales, debido a su alta especificidad al sustrato, dando lugar a la ruptura selectiva de proteínas (Gupta *et al.*, 2002; Sabotic & Kos, 2012; Kamal *et al.*, 2017).

Estas enzimas están universalmente distribuidas en todos los organismos, donde cumplen diversas funciones, además de estar implicadas en el ciclo de vida de las proteínas, desde su síntesis, control de destino y activación, hasta su degradación. Cumplen funciones que abarcan la división celular, la transducción de señales, la esporulación, la digestión de las proteínas de la dieta, regulación de la presión arterial, la apoptosis, el procesamiento de hormonas polipeptídicas, la degradación de proteínas plegadas incorrectamente, la autólisis, la protección contra péptidos dañinos y enzimas, entre muchas otras (Avilés *et al.*, 1994; Barrett *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005; Tyndall *et al.*, 2005).

Estas enzimas se utilizan desde hace varios años en diversos procesos biotecnológicos. Como ejemplo de ello, se puede mencionar: la tiernización de carnes, la fabricación de cerveza, en la industria panificadora, la elaboración de quesos y en la obtención de proteínas modificadas para la industria alimentaria. También se utilizan como aditivos en detergentes, en el procesamiento de efluentes industriales, en la industria textil y más recientemente en la síntesis de péptidos (Uhlig, 1998, Guzmán *et al.*, 2007). Debido a las variadas aplicaciones de las proteasas, se ha mantenido el interés de los investigadores por encontrar y estudiar proteasas con potencial biotecnológico e industrial aisladas de distintas fuentes.

## 2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se sitúan en el grupo 3, subgrupo 4 en donde se encuentran las hidrolasas (Vigueras *et.al.*, 2019). Hoy en día, se manejan tres criterios principales para su clasificación los cuales son: sitio de acción, naturaleza química del sitio catalítico y pH (Barrett, 1994). En función de su sitio de acción, las proteasas se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas (Figura 1).



**Figura 1.** Clasificación de las peptidasas. Fuente: Theron & Divon, (2014).

Las exopeptidasas ejercen su acción cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas, rompiendo el enlace peptídico de uno o varios aminoácidos. Las enzimas que hacen esta actividad en el extremo amino son llamadas aminopeptidasas y pueden liberar aminoácidos simples, dipéptidos o tripéptidos. Este tipo de enzimas eliminan la metionina N-terminal de las proteínas secretadas y de aquellas que pueden ser expresadas heterológamente. Las aminopeptidasas

son producidas por una amplia variedad de especies microbianas, incluyendo bacterias y hongos (Rao *et al.*, 1998; Mótyán *et al.*, 2013; Theron & Divon, 2014).

Las endopeptidasas, por su parte, realizan la hidrólisis del enlace peptídico al interior de la proteína. Su clasificación es con base al tipo de aminoácidos que constituyen su sitio activo, así como a la presencia de metales en el mismo. Se han descrito cuatro grupos: serín-proteasas, aspartil-proteasas, cisteín-proteasas y metaloproteasas. Cada una de ellas con cierta especificidad para romper enlaces peptídicos (Ver Tabla 1) (Rawlings & Barrett, 2000; Tyndall *et al.*, 2005).

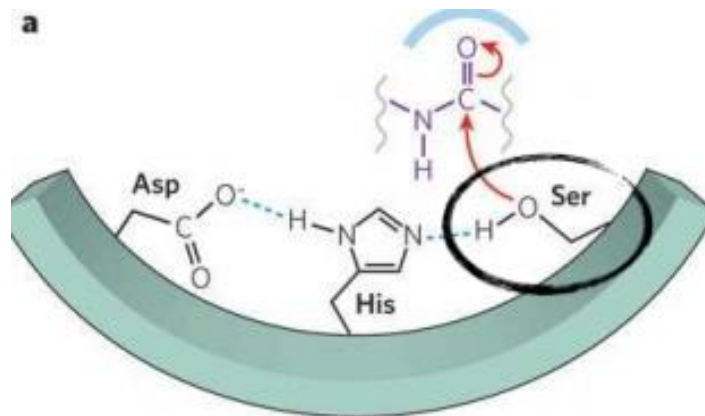
**Tabla 1.** Características de las endoproteasas. Fuente: Theron & Divon, (2014).

<b>Familia</b>	<b>Cofactores</b>	<b>Sitio activo</b>	<b>pH optimo</b>	<b>Inhibidores</b>	<b>Aplicaciones industriales</b>
<b>Serín-Proteasas</b>	Ca <sup>2+</sup>	Asp, Ser e His	7-11	PMSF, EDTA, Fenol, Ácido triaminoacético.	Detergentes, médica y farmacéutica
<b>Metallo-Proteasas</b>	Ca <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup>	Glu & Try	7-9	Agentes quelantes como: EDTA y EGTA.	Alimenticia, médica y farmacéutica.
<b>Cisteín-Proteasas</b>	ND	Cis, His, Asp	2-3	Indoacetamida p-CMB	Alimenticia, médica y farmacéutica.
<b>Aspartil-Proteasas</b>	Ca <sup>2+</sup>	Asp & Asp	2.5-7	Pepstatin EPNP DAN	Alimentos y bebidas.

DAN: diazoacetyl- dl éster metílico norleucina, DON: 5-diazo-4-oxonorvaline, PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo, pCMB: ácido cloromercuribenzoico, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, EGTA: ácido etilen glicol, EPNP: 1,2-epoxi-3- (p nitrofenoxi) propano), ND: no determinado.

### 2.2.1. SERÍN-PROTEASAS

Las serín-proteasas se definen por la presencia de un grupo serina en su sitio activo. Se encuentran en virus, bacterias y eucariotas, lo que indica que son de vital importancia para los organismos. Son activas a pH neutro y alcalino, con un pH óptimo entre 7 y 11. Poseen grandes especificidades de sustrato incluyendo actividad esterolítica y amidasa. Las masas moleculares de estas proteasas oscilan entre 18 y 35 kDa. Los puntos isoeléctricos se encuentran a pH entre 4 y 6. Las proteasas alcalinas representan el mayor subgrupo de serín-proteasas (Govind *et al.*, 1981; Barrett, 1994).

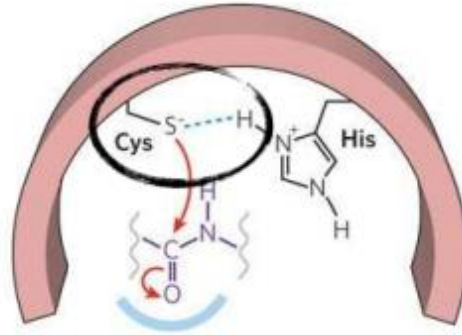


**Figura 2.** Sitio activo Serín-Proteasas. Fuente: Viguera *et al.* (2019).

### 2.2.2. CISTEÍN-PROTEASAS

Las cisteín-proteasas se encuentran presentes tanto en células procariontas como en eucariotas. Su actividad depende de la presencia de un residuo de cisteína y uno de histidina en su sitio activo. Estas enzimas, son sintetizadas primeramente como zimógenos: poseen un prodominio (regulador) y un dominio maduro (catalítico), el primero actúa como un inhibidor endógeno que debe ser suprimido para que la enzima pueda ser activada. En la mayoría de los casos, son activas sólo en presencia de agentes reductores tales como el cianuro de hidrógeno o la cisteína. Presentan pH óptimo neutro, aunque algunas de ellas, son más activas a pH ácido. La papaína es la proteasa de cisteína más distinguida (Barrett, 1994; Verma *et al.*, 2016).

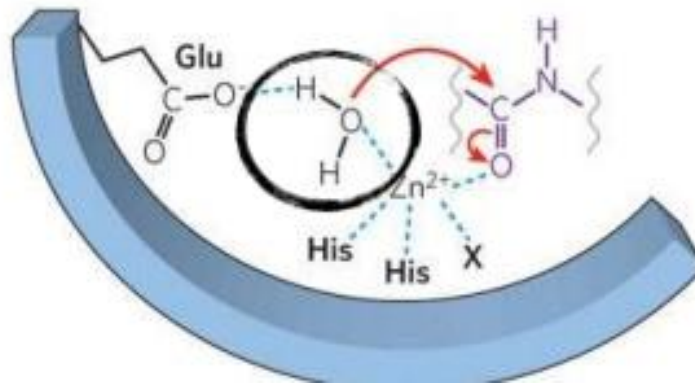




**Figura 3.** Sitio activo Cisteín-Proteasas. Fuente: Viguera *et al.*, (2019).

### 2.2.3. METALOPROTEASAS

Estas enzimas son hidrolasas que cortan enlaces peptídicos por acción de una molécula de agua que es activada por iones metálicos bivalentes como el zinc, el cobalto, el manganeso o el níquel, la cual sirve como nucleófilo en la catálisis y también se coordina con el ion metálico como cuarto ligando (Wu & Chen, 2011). El ion metálico catalítico generalmente está coordinado por tres ligandos de cadena lateral de aminoácidos conservados, tales como: His, Asp, Glu o Lys y al menos otro residuo, que puede desempeñar un papel electrofílico (Fukasawa *et al.*, 2011). Basándose en la especificidad de su acción, las metaloproteasas pueden dividirse en cuatro grupos: neutras, alcalinas, Myxobacter I, y Myxobacter II. Las primeras muestran especificidad para los aminoácidos hidrófobos, mientras que, para las segundas, esta misma propiedad no es restringida. Myxobacter proteasa I es específica para pequeños residuos de aminoácidos a cada lado del enlace de escisión, por otro lado, la proteasa Myxobacter II es específica para el residuo de lisina en el lado amino del enlace peptídico. Todas ellas son inhibidas por agentes quelantes tales como EDTA, pero no por agentes sulfhidrilos. Presentan propiedades como alta estabilidad (en rangos de pH y temperatura) y acción de corte en sitios específicos, lo cual permite explicar sus aplicaciones terapéuticas, patofisiológicas e industriales (Barrett, 1995).



**Figura 4.** Sitio activo Metaloproteasas. Fuente: Viguera *et al.*, (2019).

### 2.2.3.1. Clasificación e importancia de metaloproteasas

Las metaloproteasas abarcan un grupo diverso de endopeptidasas y exopeptidasas, tienen participación en diversos procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la morfogénesis, el procesamiento de hormonas peptídicas, la liberación de citoquinas y factores de crecimiento, la fusión celular, la adhesión y migración celular, la absorción intestinal de nutrientes, el procesamiento de poliproteínas virales, biosíntesis de la pared celular bacteriana y metabolismo de los antibióticos. Debido a su importancia en muchos de estos procesos anteriormente enlistados juegan un papel clave en muchos procesos biológicos normales, tan es así que su alteración está implicada en muchas enfermedades tales como artritis, cáncer, enfermedades cardiovasculares, nefritis, trastornos en el sistema nervioso central, fibrosis e infecciones, entre otras (Nagase, 2001).

Gran parte de las metalopeptidasas tienen el motivo de unión de iones metálicos catalíticos, **HEXXH**, donde **X** puede ser cualquier aminoácido. Las enzimas cuyo tercer ligando metálico es His, Glu o Asp se nombran como Clan MA (Rawlings & Barrett, 2000) y todas son metaloproteasas dependientes de zinc, mismas que se muestran en las Tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación de metaloproteasas Clan MA. Fuente: Nagase, (2001).

Familia	Subfamilia	Ejemplo (organismo)
<b>Clan MA:</b> Nucleófilo de agua; agua unida por un solo ion de zinc ligado a dos His (dentro del motivo HEXXH) y Glu, His o Asp		
<b>M1</b>	-	Alanil aminopeptidasa de membrana ( <i>Homo sapiens</i> )
<b>M2</b>	-	Peptidil-dipeptidasa A (enzima convertidora de angiotensina I; <i>Homo sapiens</i> )
<b>M4</b>	-	Termolisina ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> )
<b>M5</b>	-	Micolisina ( <i>Streptomyces cacaoi</i> )
<b>M6</b>	-	Inhibidor inmune A ( <i>Bacillus thuringiensis</i> )
<b>M7</b>	-	Snपालिसिना ( <i>Streptomyces lividans</i> )
<b>M8</b>	-	Leishmanolisina ( <i>Leishmania major</i> )
<b>M9</b>	A	Colagenasa de Vibrio ( <i>Vibrio alginolyticus</i> )
	B	Colagenasa de Clostridium ( <i>Clostridium perfringens</i> )
<b>M10</b>	A	Colagenasa 1 ( <i>Homo sapiens</i> )
	B	Serralisina ( <i>Serratia marcescens</i> )
	C	Fragilisina ( <i>Bacteroides fragilis</i> )
<b>M11</b>	-	Gametolisina ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )
<b>M12</b>	A	Astacina ( <i>Astacus fluviatilis</i> )
	B	Adamalisina ( <i>Crotalus adamanteus</i> )
	C	ADAM 17 ( <i>Homo sapiens</i> )
<b>M13</b>	-	Neprilisina ( <i>Homo sapiens</i> )
<b>M30</b>	-	Hiicolisina ( <i>Staphylococcus hyicus</i> )
<b>M36</b>	-	Fungalisina ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )
<b>M48</b>	-	Ste24 endopeptidasa ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )

Es importante mencionar que a nivel tóxico existen una serie de situaciones tanto fisiológicas como patológicas en las que se evidencia un aumento de producción de metaloproteasas. Ejemplo de ello es en la reparación de heridas, en el envejecimiento cutáneo, en las enfermedades ampollas, en la fibrosis dérmica y en la invasión tumoral (Pérez, 2004).

Una de las familias importantes de esta clasificación biológicamente hablando son las metaloproteinasas de la matriz (MMP), que son las encargadas del remodelado de la matriz extracelular y que en conjunto pueden degradar todos los constituyentes

de ésta, el criterio empleado para su clasificación es el tipo de sustrato sobre el que actúan de manera específica (Tabla 3) (Pérez, 2004). En condiciones normales, las MMP participan en diversos procesos fisiológicos y su actividad está regulada por inhibidores específicos, denominados TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases). No obstante, un aumento de la síntesis y de la actividad de las MMP puede dar lugar a la degradación excesiva de los diferentes componentes de la matriz extracelular y a la lesión tisular, como se ha observado en diferentes procesos tumorales e inflamatorios (Medina & Santana, 2004).

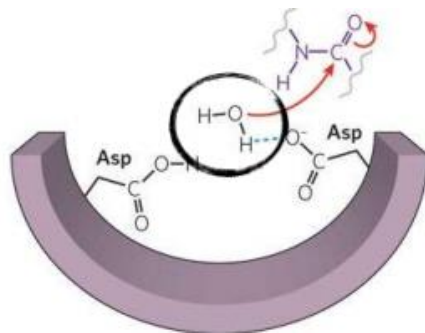
**Tabla 3.** Clasificación de metaloproteasas de la matriz (MMP). Fuente: Medina & Santana, (2004).

<b>Familia de MMP</b>	<b>Nombre</b>	<b>Número</b>	<b>Sustrato</b>
<b>Colagenasas</b>	Colagenasa intersticial Colagenasa neutrofílica Colagenasa-3	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Colágeno tipo I, II, III
<b>Gelatinasas</b>	Gelatinasa A Gelatinasa B	MMP-2	Colágeno tipo IV, V
<b>Estromelisinias</b>	Estromelisinina-1 Estromelisinina-2 Matrilisinina Estromelisinina-3	MMP-3 MMP-10 MMP-7 MMP-11	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, colágeno
<b>MMP-membrana</b>	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP MT5-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-21	Indefinido

Dentro de las MMPs se encuentran las astacinas y ADAMs/adamalisinas, proteasas que se han encontrado en algunos venenos animales. Estas desempeñan diversas funciones en procesos fisiológicos que implican remodelación y mantenimiento tisular, morfogénesis tisular, desarrollo embrionario, migración celular, reparación de heridas, desarrollo del hueso; y en procesos patológicos tales como cáncer, enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares, EPOC, entre otras (Egeblad & Werb, 2002; Hernández *et al.*, 2014).

## 2.2.4. ASPARTIL-PROTEASAS

Las proteasas de ácido aspártico (APs), comúnmente conocidas como aspartil-proteasas o proteasas ácidas, son endopeptidasas que requieren de la presencia de dos residuos de ácido aspártico para ejercer su actividad catalítica, localizados en dos tramos cortos de aminoácidos que tienen alta homología de secuencia y similitud de estructura tridimensional. Son funcionales a pH's bajos, presentan una preferencia de escisión entre aminoácidos hidrófobos, son inhibidas por la pepstatina, presentan puntos isoeléctricos en el intervalo de pH 3 a 4.5 y sus masas moleculares son de 30 a 50 kDa (Fitzgerald *et al.*, 1990; Blundell & Johnson, 1993; Barrett, 1995; Shah *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Sitio activo Aspartil-Proteasas. Fuente: Viguera *et al.*, (2019).

## 2.3. RELEVANCIA COMERCIAL DE LAS PROTEASAS

Estos catalizadores presentan un gran interés industrial, por lo que, en el mercado mundial de enzimas, conforman uno de los tres grupos con mayor índice de ventas y comprenden alrededor del 60% de las ventas totales (Banerjee & Raya, 2017). Para el año 2021 el mercado de enzimas fue valorado en USD 6000 millones y para el caso de proteasas se proyecta que en el periodo de 2020-2025 el mercado tenga un crecimiento anual de 5.8%. Estas proteínas son el grupo más grande de enzimas que tienen un papel relevante en muchas industrias, especialmente en el campo de los alimentos, los detergentes y los productos farmacéuticos. (Theron & 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 (Poldermans, 1990; Fox *et al.*, 1991).

## 2.4. FUENTES DE OBTENCIÓN DE PROTEASAS

Estas enzimas están ampliamente distribuidas y pueden extraerse de diversas fuentes como lo son venenos animales, plantas o microorganismos, en donde participan en una gran cantidad de procesos fisiológicos, además de estar involucradas en todo el ciclo de vida de las proteínas, desde su biosíntesis, control de destino y activación, hasta su degradación (Sandhya *et al.*, 2005; Tyndall *et al.*, 2005).

## 2.5. ANIMALES CON VENENO.

En la naturaleza coexisten organismos con la capacidad de producir veneno; el cual, es utilizado generalmente con la finalidad de inmovilizar y capturar a sus presas (Currier *et al.*, 2012), además de servir como mecanismo de defensa frente a sus depredadores naturales (Fry *et al.*, 2009).

Los animales relacionados con la producción de veneno son reconocidos por el ser humano por generar un efecto adverso sobre la salud. Al ocurrir una picadura y/o mordedura y estar el veneno en circulación se pueden producir diversos síntomas que pueden ser leves, severos o incluso letales (Tiago *et al.*, 2011). No obstante, muchos de estos venenos presentan varios compuestos bioactivos, muchos de los cuales pueden ser utilizados como potenciales terapéuticos (González-Morales *et al.*, 2009).

Entre los grupos biológicos con mayor número de especies con alta producción de veneno se encuentran: réptiles (serpientes) (Deshimaru *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 2000), organismos acuáticos (equinodermos, cefalópodos, cnidarios, medusas, caracoles de mar) (Fry *et al.*, 2009), artrópodos entre los que se encuentran alacranes (Zlotkin *et al.*, 1971), arañas (Hagaki *et al.*, 1997; Huari *et al.*, 2016), abejas, avispas (Parkinson *et al.*, 2002; Choo *et al.*, 2010) y escolopendras (Cooper *et al.*, 2014; González-Morales *et al.*, 2009).

Dentro del Phylum Arthropoda, algunos miembros del subphylum Miriapoda tienen la capacidad de producir veneno. A este subphylum pertenecen cuatro grupos o clases: Quilópodos (ciempiés), Diplópodos (milpiés), Sífilos y Paurópodos. Actualmente están descritas alrededor de 11,460 especies, de las cuales 69, están reportadas en México y se calcula que 13 pertenecen al género *Scolopendra* (Foddai *et al.*, 2002).

## 2.6. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE SCOLOPENDROMORPHA.

De acuerdo con Foddai *et al.* (2002), los ciempiés se clasifican taxonómicamente de la siguiente manera:

**Phyllum:** Arthropoda

**Clase:** Chilopoda

**Orden:** *Scolopendromorpha*

**Familia:** Scolopendridae

**Género:** *Scolopendra*

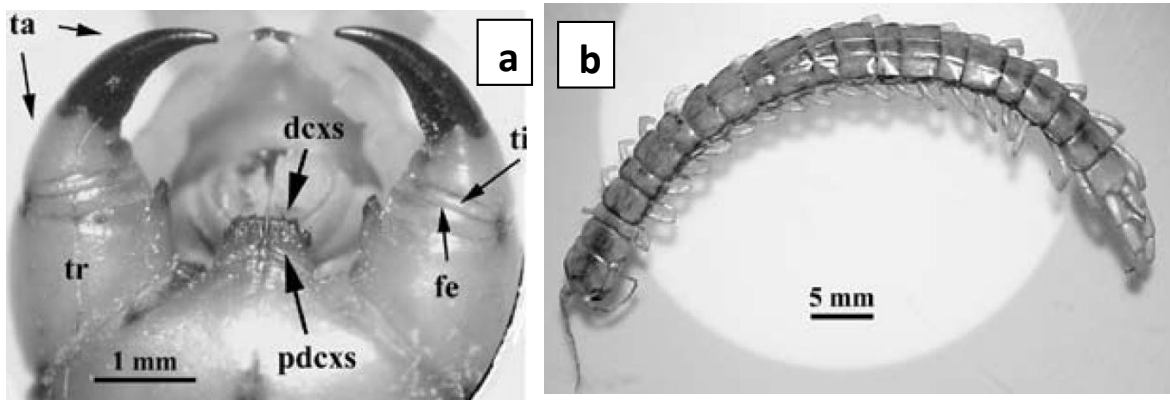
**Especies:** *viridis* Say y *polymorpha* Wood.

## 2.7. BIOLOGÍA DEL GÉNERO SCOLOPENDRA.

Las principales características de este género son la presencia de 21 o 23 pares de patas, cuerpo comprimido dorsoventralmente y ligeramente alargado, con o sin cuatro ocelos a cada lado de la cabeza, antenas relativamente largas con al menos 17 artejos o segmentos y con una medida que oscila entre los 9 mm a 30 cm. Se han descrito 678 especies (Edgecombe & Bonato 2011).

Para la generación de su veneno utilizan sus glándulas venenosas, mismo que posteriormente es transportado a través de un canal hacia las estructuras denominadas forcípulas, que son utilizadas para herir y producir picaduras dolorosas, ambos pares de maxilas pueden estar fusionadas. Estos apéndices de caza son ventrales con respecto al campo bucal y los utilizan para sujetar a la presa e inyectar veneno. El veneno es producido en glándulas que se localizan en los artejos basales de las forcípulas (Brusca & 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 al exterior o al tejido de la víctima, por una abertura que se encuentra cercana a la punta de la forcípula (Chao & Chang, 2006), su último par de patas presenta una longitud mucho mayor que las demás, y se cree que posee función sensorial (Hickman *et al.*, 2008) (Figura 6).





**Figura 6.** Vista ventral de la placa cefálica que expone las forcípulas: pdcxs = placa dental del coxosternum, dcxs = diente del coxostrenum, tr = trocanteroprefémur, fe = fémur, ti = tibia, ta = tarsungulum; b) cuerpo segmentado de un ejemplar adulto (Cupul, 2010).

### 2.7.1. *Scolopendra viridis*

Esta especie de ciempiés se distribuye en Costa Rica, El Salvador, Estados Unidos, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá (Cupul, 2014; Shelley, 2002). En época de sequía se desplazan a zonas húmedas como cuevas e incluso se entierran en zonas profundas de la tierra para mantener su humedad (Shelley, 2002).

### 2.7.2. *Scolopendra polymorpha*

*Scolopendra polymorpha* (*S. polymorpha*), es una especie de ciempiés que recibe múltiples nombres entre ellos: ciempiés del desierto, ciempiés tigre o ciempiés del desierto de Sonora, se puede encontrar en el suroeste de los Estados Unidos y al norte de México, al norte de la costa del Pacífico. Su hábitat natural son pastizales secos, bosques y desiertos; generalmente se encuentran debajo de las rocas, aunque se conoce que construyen sus madrigueras comúnmente dentro de troncos podridos (Flores *et. al.*, 2018).

Alcanzan longitudes de entre 10 a 18 cm. La coloración es variable, de ahí el nombre de la especie *polymorpha*, que significa "muchas formas". Los segmentos del cuerpo tienen una franja lateral oscura, de ahí el nombre de ciempiés tigre. Generalmente, esta especie presenta su cabeza de color marrón, rojo o naranja más oscuro y los segmentos de su cuerpo de color marrón, tostado o naranja más claro con patas amarillas.

## 2.8. ALIMENTACIÓN DE *S. viridis* y *S. polymorpha*.

Por naturaleza la mayoría de los ciempiés son carnívoros, depredadores agresivos y activos, por lo que son capaces de inyectar 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 (roedores) e incluso se llegan a alimentar de otros ciempiés (Brusca & Brusca, 2005).

## 2.9. REPRODUCCIÓN SEXUAL DE *S. viridis* y *S. polymorpha*

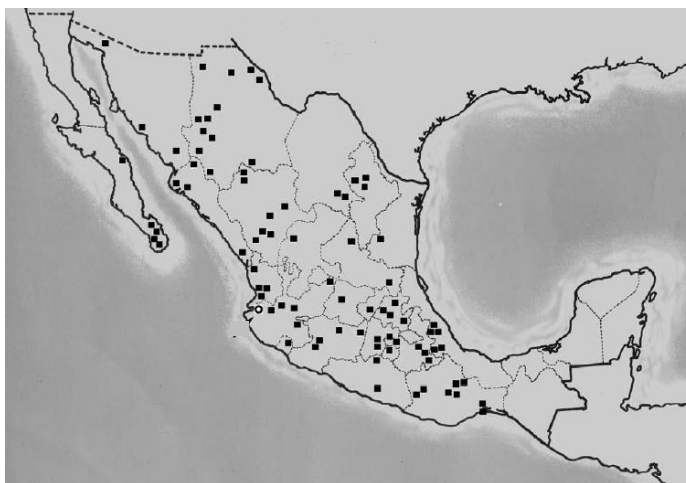
Para llevar a cabo el apareamiento, en algunas ocasiones existe un baile de cortejo por parte del macho hacia la hembra, sin embargo, la mayoría de las veces los ciempiés masculinos colocan un espermatóforo (una cápsula o masa que contiene las células reproductoras masculinas o denominados espermatozoides) para que las hembras los encuentren. En las zonas templadas, la reproducción se produce en primavera y verano, pero en las zonas subtropicales y tropicales parece haber poca estacionalidad para la cría de ciempiés. Las hembras colocan los huevos en grupos que puede variar de 50 a 80; se enrollan sobre ellos para el proceso de incubación, y los vigilan hasta el periodo de eclosión y dispersión de las crías (Figura 7) (López, 2021).



**Figura 7.** Incubación de *S. polymorpha* (López, 2021).

## 2.10. DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO *Scolopendra*.

Los ciempiés (pertenecientes al orden *Scolopendromorpha*) se encuentran diseminados prácticamente por todo el mundo, puesto que se adaptan en el mayor número de ecosistemas terrestres y sólo están ausentes en las regiones más frías del planeta. Sin embargo, el mayor número de especies se localizan en las regiones tropicales y subtropicales del globo terráqueo, incluyendo México que es un país con amplia diversidad de ecosistemas (Bonato & Zapparoli, 2011; Cupul, 2013). En México están descritas cuatro de las cinco familias que se conocen de este orden: *Scolopendridae*, *Cryptopidae*, *Plutoniumidae* y *Scolopocryptopidae* y se han reportado cuarenta y un especies: veinte en la familia *Scolopendridae*, tres en la *Cryptopidae*, una en la *Plutoniumidae* y diecisiete en la *Scolopocryptopidae* todas ellas distribuidas en diez géneros (*Arthrorhabdus*, *Cormocephalus*, *Cryptops*, *Hemiscolopendra*, *Newportia*, *Otostigmus*, *Rhysida*, ***Scolopendra***, *Scolopocryptops* y *Theatops*) y de las cuales veintitrés de estas especies son endémicas del país (Edgecombe *et al.*, 2012). El género ***Scolopendra*** cuenta con trece especies reportadas dentro del territorio nacional. siendo *Scolopendra heros*, *Scolopendra morsitans*, *S. polymorpha* y *S. viridis* las especies de este género que se encuentran con mayor frecuencia en distintas localidades del país, cuya distribución incluye 31 estados, con excepción del estado de Tlaxcala (Cupul, 2010) (Fig. 8).



**Figura 8.** Distribución *Scolopendra viridis* en México (Cupul, 2010).

## 2.11. ANTECEDENTES

Actualmente existen pocas investigaciones acerca de la presencia de actividad proteasa en miriápodos. Malta *et al.* (2008), mediante ensayos con zimogramas utilizando caseína, gelatina y fibrinógeno como sustratos, compararon la actividad proteasa del veneno de tres especies de ciempiés brasileños: *Scolopendra viridicornis*, *Otostigmus pradoi* y *Cryptops iheringi*. Encontraron que los componentes de estas tres especies, eran diferentes, presentaban bandas de proteínas que oscilaban entre 7 y 190 kDa de peso molecular. Así mismo, se logró determinar la actividad de proteasa en el veneno de las tres especies, reportando los datos de la Tabla 4:

**Tabla 4.** Reporte Metaloproteasas (Malta *et al.*, 2008)

Especie	Metaloproteasas (kDa)
<i>S. viridicornis</i>	44
<i>O. pradoi</i>	35, 23 y 15
<i>C. iheringi</i>	121, 44 y 25

Por otro lado, Undheim y colaboradores (2014), compararon el veneno de cinco especies de ciempiés, reportando la presencia de metaloproteasas y serín-proteasas (Ver tabla 5). Mencionan que las endoproteasas S1 y S2 están involucradas en la activación de toxinas. La metaloproteasa M12A dependiente de zinc, degrada la matriz extracelular alrededor de la sinapsis y facilita el acceso de las toxinas a su sitio blanco.

**Tabla 5.** Reporte de proteínas con actividad proteasa (Undheim *et al.*, 2014; Undheim *et al.*, 2015). X: indica la presencia de proteína; -: Indica ausencia de proteína.

Proteínas Familia HMW	<i>S. alternans</i>	<i>S. morsitans</i>	<i>C. westwoodi</i>	<i>E. rubripes</i>	<i>T. longicornis</i>
M12A	X	X	-	-	X
Putativa M12A	X	X	X	X	-
Proteasa S1	X	X	X	X	X
Proteasa S2	X	X	X	X	X

Las endoproteasas S1 y S2 no son abundantes en los venenos de ciempiés mientras que las metaloproteasas parecen predominar la composición en estos venenos (Undheim *et al.*, 2015).

En el año 2014, Granado realizó el estudio del perfil proteico y actividad enzimática del veneno de *Scolopendra gigantea*, mediante SDS-PAGE y ensayos de zimografía, donde identificó ocho proteasas, de las cuales, cinco tuvieron actividad serín- proteasa, con pesos moleculares aproximados de: dos bandas  $\geq 250$  KDa, 116 KDa, 100 KDa y 51 KDa. Asimismo, dos proteínas tuvieron actividad metaloproteasa con pesos moleculares aproximados de 26 KDa y 22 KDa. En este estudio también se reportó una banda que probablemente tenga actividad de aspartil-proteasa o cisteín- proteasa con peso molecular aproximado de 34 KDa.

**Tabla 6.** Reporte de proteasas de *S. gigantea* (Granado, 2014).

<b>Especie</b>	<b>Metaloproteasas (kDa)</b>	<b>Serín-Proteasas (kDa)</b>
<b><i>S. gigantea</i></b>	26 y 22	250, 116,100, 51

### III. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la composición proteica del veneno de *Scolopendra*, fundamentaría las bases para posibles tratamientos farmacológicos, ya que algunas de las proteínas que componen al veneno tienen diversas actividades biológicas y pueden ser usadas como blancos terapéuticos (Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008). El coctel de compuestos en estos venenos es amplio, y dentro de las enzimas que se han reportado están: quitinasas, cistatinas, hialuronidasas, esfingomelininas D, fosfolipasas A2 y proteasas (Winningham *et al.*, 2004; Malta *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 2009). En este contexto, en el rubro de proteasas reportadas en venenos de *Scolopendromorfos* se encuentran serín-proteasas y metaloproteasas (Undheim *et al.*, 2015).

La mayoría de estas enzimas tienen importancia comercial, ocupan el tercer lugar en ventas mundiales de enzimas. Sus aplicaciones son principalmente en las áreas médicas y farmacéuticas en la producción de fármacos antiinflamatorios, disolventes de coágulos sanguíneos, inhibidores de transcripción y activación de algunas hormonas (Anwar & Saleemudin, 1998), así como en la industria alimentaria y de detergentes (Heinz, 2004).

Por este motivo, el presente trabajo de investigación tuvo como finalidad caracterizar químicamente a las enzimas responsables de la actividad proteolítica de los venenos de *S. viridis* y *S. polymorpha*, que son dos especies abundantes en el estado de Morelos. Los resultados permitieron obtener información detallada de estas proteasas para que posteriormente puedan ser purificadas y utilizadas con algún fin médico y/o biotecnológico, tal como lo han realizado investigadores del Sur de Asia con otras especies del género *Scolopendra* (Yang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Por último, se logró ampliar la información que se tenía de los ciempiés en estudio.

## IV. HIPÓTESIS

Las proteasas purificadas de los venenos de *S. viridis* y de *S. polymorpha* serán de tipo metaloproteasas o serín-proteasas.

## V. OBJETIVOS

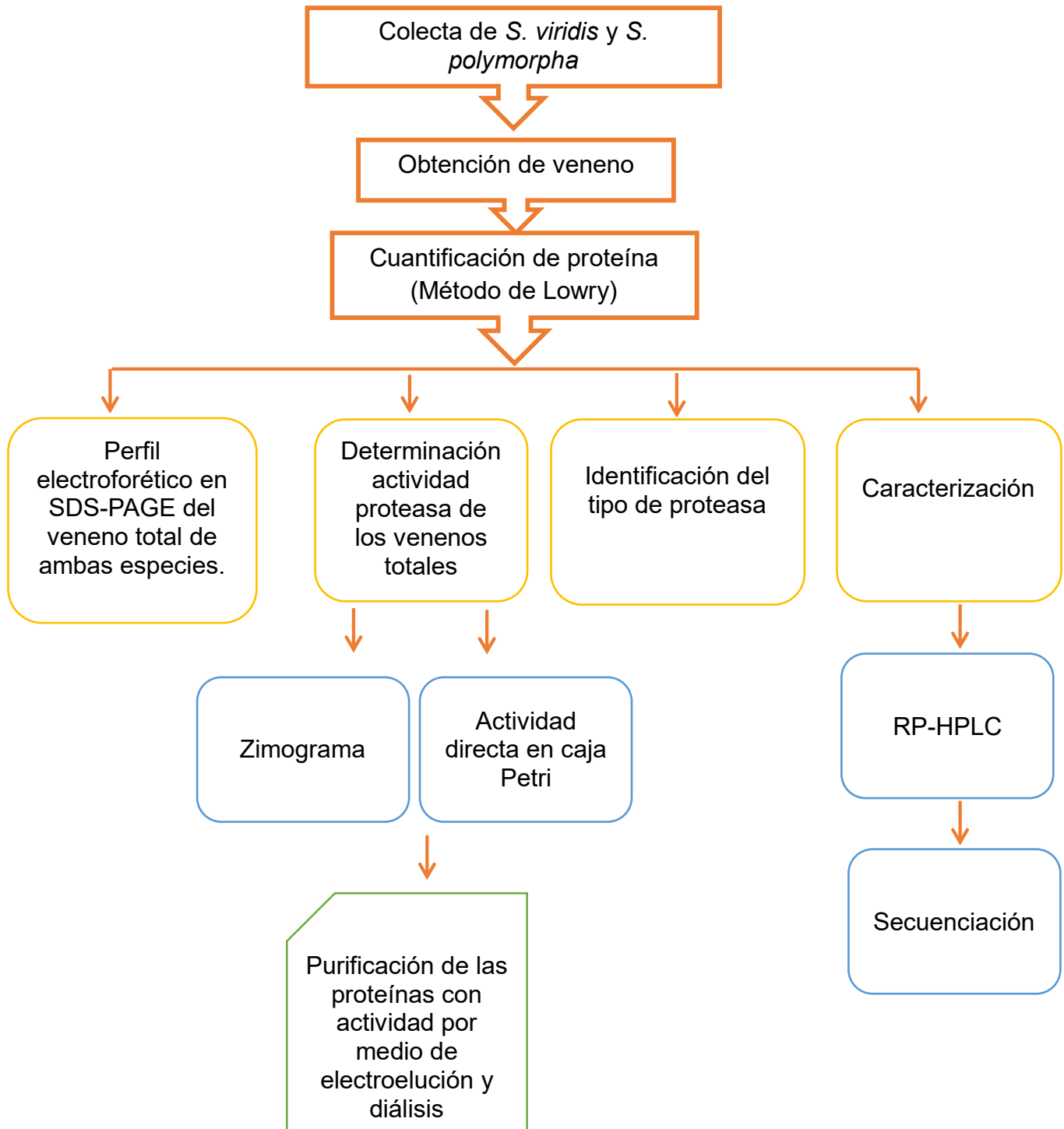
### 5.1. General

Caracterizar químicamente al menos una de las proteasas del veneno de *S. viridis* y de *S. polymorpha*.

### 5.2. Específicos

- Purificar las proteasas encontradas en el veneno de *S. viridis* y *S. polymorpha*.
- Determinar el tipo de proteasas presentes en los venenos de *S. viridis* y *S. polymorpha*.
- Secuenciar las proteasas encontradas en los venenos de *S. viridis* y *S. polymorpha*.

## VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## VII. METODOLOGÍA

### 7.1. Colecta de especies en estudio (*S. viridis* y *S. polymorpha*).

Los ejemplares de *S. viridis*, fueron colectados al norte del Estado de Morelos, (coordenadas 18°59'13.2"N 99°14'06.7"W); se buscó especialmente en terrenos con tierra suelta y pedregoso, en horarios matutinos con la finalidad de evitar el sol e impedir que estos se enterraran más, mientras que los especímenes de *S. polymorpha* fueron capturados en zonas cálidas en el centro y sur del Estado de Morelos.

### 7.2. Mantenimiento de los organismos de estudio.

Los ciempiés colectados fueron preservados para posteriormente ser ordeñados en el Laboratorio de Neurofarmacología del CEIB de la UAEM. Fueron puestos en pequeños contenedores de plástico con suficiente tierra húmeda del lugar de donde fueron colectados y con suficiente ventilación (con 10 a 15 orificios pequeños en la tapa del recipiente). La alimentación fue llevada a cabo una vez por semana, y se les daba la mitad de una larva de *Tenebrio*, y fueron ordeñados una vez al mes, dejándolos sin alimento una semana antes de la extracción de veneno.

### 7.3. Extracción del veneno.

De ambas especies de ciempiés (*S. viridis* y *S. polymorpha*) se obtuvo veneno, para lo cual, los ciempiés fueron inmovilizados a una temperatura de 4°C durante 5 minutos. Posteriormente, los ciempiés se estimularon de manera manual en la base de sus forcípulas, el veneno se recolectó por capilaridad empleando una punta amarilla de micropipeta y enseguida fue colocado en un tubo Eppendorf que contenía 20 µL de H<sub>2</sub>O mili Q.

#### 7.4. Liofilización.

Con la finalidad de preservar la integridad y actividad de las proteínas de los venenos hasta su posterior uso, el veneno colectado fue sometido al proceso de liofilización (fue retirada el agua y se mantuvo seca la muestra), haciendo uso del equipo MAXI-Dry Iyo (tipo Heto FD1.0). Este equipo liofilizador opera a una presión de 0.2 atm y a  $-45^{\circ}\text{C}$  en la trampa para vapores.

#### 7.5. Cuantificación de proteína.

La cuantificación de proteína de los venenos y de las proteínas fue realizada mediante el método colorimétrico de Lowry *et al.* (1957), el cual tiene alta sensibilidad que está en un rango de entre 1 a 100  $\mu\text{g}$ . Para esta técnica fue realizada una curva estándar de una concentración conocida de Albumina de Suero Bovino (BSA) (**Anexo 1**). Posteriormente se agregaron 2 mL de una mezcla de solución 1, tartrato de sodio y potasio más  $\text{CuSO}_4$  (**Anexo 2**); tomando 250  $\mu\text{L}$  de tartrato de sodio y potasio y  $\text{CuSO}_4$ , por cada 25 mL de solución 1. Enseguida se agregan 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin puro a cada tubo e inmediatamente se agita en el vortex No. 8 y se dejó corriendo la reacción durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se leyó a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific. Cabe mencionar que la intensidad de color es proporcional a la concentración de proteína. El procedimiento fue el mismo para la muestra, solo cambiando el volumen de agua (999.60  $\mu\text{L}$ ) con respecto al volumen de muestra (0.4)  $\mu\text{L}$  para obtener 1 mL.

#### 7.6. Electroforesis en SDS- PAGE

La electroforesis en gel SDS-PAGE, es una técnica que permite separar las proteínas de acuerdo con su peso molecular en una matriz de poliacrilamida, utilizando un campo eléctrico. Las proteínas de los venenos totales fueron separadas en geles SDS-PAGE (gel separador al 12% y gel concentrador al 4%). La masa de proteína utilizada para el perfil proteico del veneno fue de entre 18-20  $\mu\text{g}$ , los venenos se mezclaron con el tampón de carga (que contiene 2.5 mL de solución de SDS 10%; 0.5 mL de azul de bromofenol 0.05%; 0.3 mL de tampón de

electroforesis; 1 mL de glicerol y 0.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8) utilizando una relación 1:1 v/v. Primeramente se corre el gel a un voltaje de 55 V durante 20 minutos para pasar del gel concentrador al gel separador, posteriormente el voltaje se incrementa a 75 V por aproximadamente 120 minutos. Se hace uso de marcadores de tamaño molecular (MPM) para cada gel electroforético. Una vez finalizada la corrida del gel, es teñido mediante su inclusión en solución de tinción que contiene Azul de Coomassie (**Anexo 6**) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se destiñe con solución desteñidora (**Anexo 7**) por 15 minutos, si es necesario se realizan más de dos cambios de solución para eliminar el exceso del colorante, y de esa forma poder visualizar las bandas de interés.

## 7.7. Electroelución

Una vez observadas las bandas proteicas en el gel SDS-PAGE al 12%, cada banda fue cortada de forma individual, y colocada en un tubo sellado en la parte inferior con una membrana de diálisis (corte de 6 – 8 KDa.), estos tubos fueron llenados con buffer Tris 50 mM pH 6.8, la parte superior fue sellada con tapón de plástico. La corrida se realizó en frío durante 2 h, bajo un flujo de corriente de 75 V. Culminado el tiempo de corrida los polos son invertidos durante 1 minuto.

## 7.8. Diálisis.

La técnica de diálisis es realizada inmediatamente después de haber concluido el método de electroelución, con el propósito de eliminar el exceso de sales que pudiera tener la proteína. En este método, es retirado el gel de la membrana de diálisis de manera cuidadosa con la finalidad de evitar perder el buffer que contiene a la proteína. A continuación, la bolsa es sellada con pinzas y ligas para evitar la pérdida de la muestra, posterior a ello es sometida a proceso de agitación constante en un recipiente de 5 L que contiene agua mili-Q fría, realizando un cambio de agua cada hora durante 3-4 h, en el cuarto frío (-4° C) para evitar que la proteína se desnaturalice. Como último paso, el buffer que contiene la proteína es colocado en tubos Eppendorf para después ser liofilizado y obtener la proteína seca que es conservada hasta su posterior cuantificación y uso.

## 7.9. Determinación de la Actividad Proteasa

### 7.9.1. Zimograma.

Esta es una técnica electroforética-cualitativa. Esta actividad se llevó cabo en un gel de SDS-PAGE al 12% adaptado con la integración de gelatina comercial como sustrato a una concentración final de 0.2 mg/mL. Fueron colocados 20 µg de cada veneno en los diferentes pozos. Seguido a esto, se corrió el gel a un voltaje de 55 V por 20 minutos para empaquetar las muestras en el gel concentrador, y posteriormente se cambió el voltaje a 75 V durante 2 horas. Seguido la electroforesis, el gel es lavado dos veces durante 30 minutos a temperatura ambiente en Tritón X-100 al 2.5% para eliminar el SDS, posteriormente se realizó la incubación a 37 ° C durante 18 horas en el buffer Tris-HCl 20 mM pH 6.8. Pasado el tiempo de incubación, el gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 (40% de metanol, 10% de ácido acético en agua), y como paso final, el gel se destiño con solución en 40% metanol y 10% ácido acético durante 30 minutos. Las zonas que presentaron halos blancos fueron interpretadas como proteínas con actividad de proteasa.

### 7.9.2. Actividad directa en caja Petri

Este procedimiento fue llevado a cabo, pesando 2.25 g de gelatina comercial y disolviendo en 30 mL de buffer de incubación Tris-HCl 20 mM pH: 6.8 (concentración final 7.5%), para posteriormente dar calentamiento en microondas por 1 minuto y permitir la correcta disolución del sustrato, una vez disuelta la gelatina fue colocada en una caja Petri permitiendo su solidificación (15-20 minutos aproximadamente). Una vez solidificada la gelatina, se colocaron entre 3-6 µg de muestra (volumen variado entre 2-4 µL) con ayuda de una micropipeta y punta tratando de no perforar el sustrato y solo dejando caer la gota. Posterior a ello, se dejó en incubación 18 horas y se tiñó con azul de Coomassie por 15 minutos, la actividad es interpretada positiva en aquellas muestras que presentan un orificio profundo de la gelatina (degradación del sustrato). Se utiliza H<sub>2</sub>O como control negativo y veneno de serpiente concentrado como control positivo.

### 7.10. Determinación de tipo de proteasas.

El tipo de enzimas proteolíticas presentes en los venenos fue evaluado con base a su actividad proteolítica sobre gnetina comercial en presencia de dos inhibidores específicos. Se utilizaron fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) como inhibidor específico de serín-proteasas (Sigma-Aldrich: # de catálogo: 329-98-6, peso molecular: 174.19 g/mol) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como inhibidor específico de metaloproteasas (Sigma-Aldrich: # de catálogo: 60-00-4, peso molecular: 292.24 g/mol). Esta técnica fue llevada a cabo de la misma forma que el apartado anterior, con la modificación de que al buffer de incubación se le adicionaron los inhibidores por separado, EDTA 0.1 M y PMSF 10 mM. La inhibición fue determinada con la ausencia de los halos blancos respecto al zimograma al cual no se le adicionó ningún inhibidor.

### 7.11. Determinación de pureza de proteasas mediante HPLC

Una vez aisladas las proteínas con actividad se liofilizaron y posterior a ello se resuspendieron en 100  $\mu$ L de agua HPLC, y se cuantificó por el método de Lowry. Posteriormente, una muestra de veneno total (40  $\mu$ g) y de las proteínas con actividad de proteasa (5-9  $\mu$ g) se corrieron por separado por RP-HPLC en un gradiente de 0 a 60% acetonitrilo y un flujo de 1mL/min durante 60 minutos (columna C18 y cromatógrafo Agilent 1100 Seves en el laboratorio del grupo del Dr. Gerardo Corzo; IBT, UNAM). Las fracciones se colectaron en tubos Eppendorf y falcón, en seguida se colocaron en la campana de extracción para evaporar el disolvente, y en la liofilizadora para eliminar el exceso de agua.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los venenos que se presentan en una gran variedad de organismos ponzoñosos tienen componentes proteicos asociados a alteraciones fisiológicas que podrían ser mortales. 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. Por la alta mortalidad que ocasionan en el hombre los estudios realizados se enfocan más en los venenos de escorpiones, serpientes y tarántulas.

Actualmente todavía existe una falta de interés en el estudio de la composición bioquímica y actividades biológicas del veneno del género *Scolopendra*, lo que provoca que haya muy pocos antecedentes de estudios realizados, de igual manera esta falta de información e interés por el estudio del veneno de ciempiés está influenciada por el bajo índice de mortalidad relacionado con sus mordeduras, en comparación a otros animales como lo son los alacranes, serpientes y arañas, además de la escasa sintomatología que pueden ocasionar (Rates *et al.*, 2007).

Con la finalidad de identificar y posteriormente purificar las proteínas con actividad de proteasas de los venenos de *S. viridis* y *S. polymorpha*, fue utilizado veneno total de ambas especies y se efectuaron diferentes técnicas que permitieron la identificación del perfil proteico, la identificación de las proteínas con actividad de proteasa y la purificación de las proteínas con actividad de proteasa. En promedio para correr y visualizar correctamente en un gel de electroforesis el perfil de proteínas del veneno se necesita una cantidad aproximada de 20 µg para cada especie; mientras que para realizar los cortes y purificación se necesitan 80 µg de veneno en cada pozo del gel dando como resultado un aproximado de 480 µg de cada veneno (resultado de 6 pozos que se cargan para la corrida).

## 8.1. Obtención del veneno.

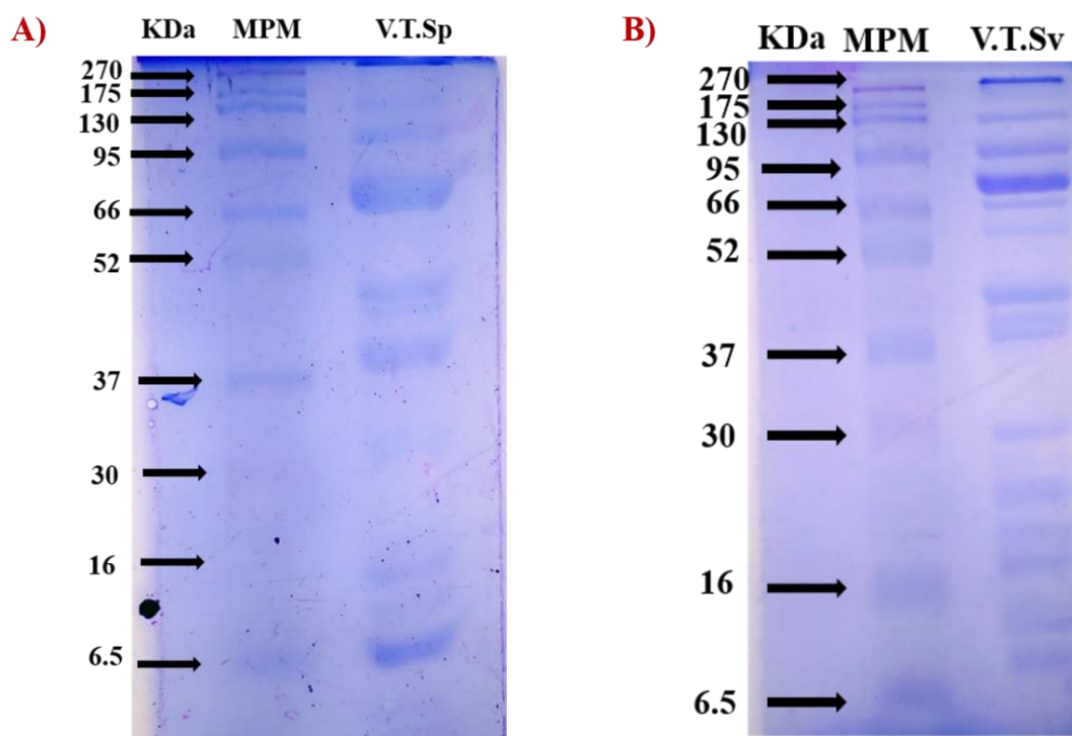
En la obtención del veneno de *S. viridis*, fueron ordeñados alrededor de 200 ejemplares en diferentes tiempos (una vez por mes) sin importar el tamaño del ciempiés, y se obtuvieron entre 500-600  $\mu\text{g}$  de veneno por ordeña. En el caso de *S. polymorpha*, se ordeñaron 10 especímenes con lo cual se obtuvo un aproximado de 500  $\mu\text{g}$  de veneno por ordeña. Con base en la experiencia de las ordeñas y perfiles proteicos de cada especie, se determinó que la cantidad de veneno que se llega a obtener depende de la cantidad de especímenes; no obstante, es necesario resaltar que no todos los ciempiés proporcionan veneno al momento de ordeñarlos mientras que otros llegan a dar más del esperado.

La cantidad de veneno obtenida fue diferente entre *S. viridis* y *S. polymorpha*, esto como consecuencia del número de ejemplares y del tamaño de los mismos, si se comparan estos resultados con los de otros trabajos de *Scolopendra*, como los de Granado (2014) y Parrilla-Álvarez *et al.* (2008) quienes obtuvieron de *S. gigantea* 243  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ /18 individuos y 375  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  respectivamente de veneno crudo haciendo uso de la técnica de electroestimulación.

Por otro lado, se ha obtenido de *S. viridicornis* mediante electroestimulación una cantidad de 2,000  $\mu\text{g}$  de veneno total/10 individuos (Malta *et al.*, 2008). Lo anterior evidencia que el rendimiento de ordeña que se obtuvo en el presente trabajo para ambas especies es menor, debido principalmente a que la técnica de obtención del veneno fue diferente (se realizó por estimulación manual), sin embargo, también pudieran estar influyendo algunos otros factores como el tamaño de la especie de estudio, el tamaño de los especímenes de cada especie, el origen geográfico, el sexo, el tiempo en cautiverio y el historial de ordeña (Cooper *et al.*, 2014).

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

El primer método que se utilizó fue la electroforesis en SDS-PAGE para la identificación del perfil proteico y que sirvió para determinar los pesos aproximados de las proteínas presentes en los venenos de *S. viridis* y *S. polymorpha* (**Anexo 3**). El gel fue preparado con una concentración de acrilamida al 12%, en el gel separador, mientras que en el gel concentrador fue del 4%, Se colocaron 18  $\mu\text{g}$  de proteína de ambos venenos en carriles diferentes y 1.8  $\mu\text{L}$  de marcadores de peso molecular marca BIORAD Cat. #PM001-0500 de amplio rango (270-6.5 kDa).



**Figura 1.** Perfiles proteicos en geles SDS-PAGE al 12% de *S. polymorpha* y *S. viridis*, en condiciones no desnaturalizantes de venenos totales: A) *S. polymorpha* (18  $\mu\text{g}$ ) y B) *S. viridis* (18  $\mu\text{g}$ ). En el carril MPM se encuentran los marcadores de peso molecular. Tinción con azul de Coomassie.

La figura **9-A** detalla el perfil proteico de *S. polymorpha*, con 12 bandas que tienen pesos moleculares ubicados en el rango de 169-6.85 KDa.

Por otra parte, el esquema **9-B** muestra el perfil proteico de *S. viridis*, en el cual se lograron identificar 16 bandas proteicas cuyo peso molecular oscila entre los 175 y 6.85 KDa.



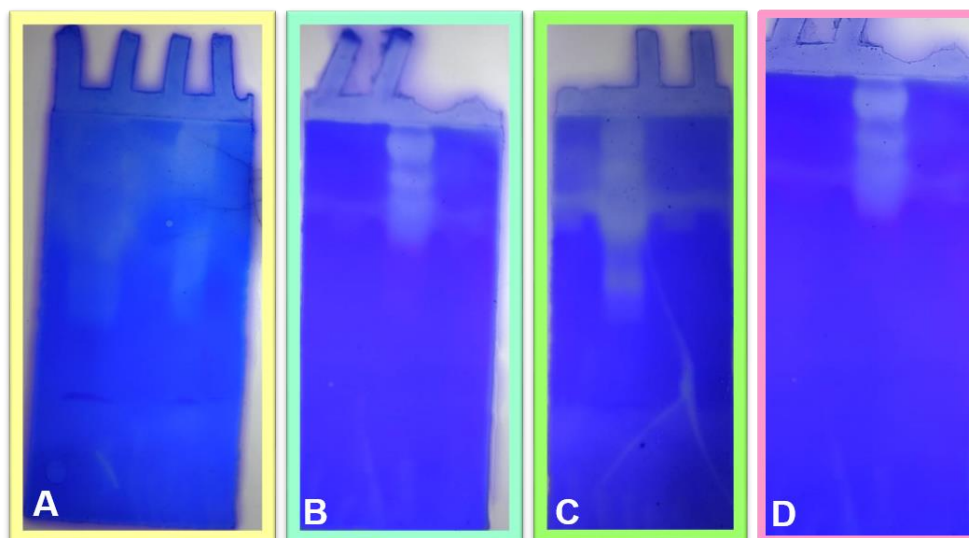
Con ayuda de esta técnica se logró identificar las diferentes proteínas presentes en los venenos de ambas especies, así como sus pesos moleculares aproximados. Este ensayo permitió identificar el perfil proteico del veneno de ambas especies, (Figura 9), y fue realizado por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE permitiendo visualizar e identificar cada una de las proteínas contenidas en los dos venenos, en ambos casos dichas proteínas se encuentran dentro de un rango de marcadores de peso molecular de 6 a más de 250 KDa, para *S. viridis* se lograron observar alrededor de 16 bandas mientras que para *S. polymorpha* fueron visualizadas 12 bandas proteicas. Perfiles proteicos de otras especies, pertenecientes al género *Scolopendra*, muestran semejanzas en el rango de los pesos moleculares de las bandas visualizadas en este trabajo. Granado (2014) reporta el perfil proteico obtenido para el veneno de *S. gigantea* el cual mostró un total de 28 bandas de proteínas, mientras que el reportado por Parrilla-Álvarez *et al.* (2008), donde para esta misma especie, solo obtuvo 10 bandas de proteínas de pesos moleculares de entre 190 KDa a 6 KDa. Para la especie *S. viridicornis*, se ha descrito que posee un perfil de bandeo proteico que va desde los 114 KDa hasta 88 KDa, en condiciones no reductoras, mientras que en condiciones desnaturizantes aparecen un rango de bandas entre 82-40 KDa (Malta *et al.*, 2008). Rates *et al.* (2007), reportaron para *S. viridicornis nigra* un total de 62 proteínas en un rango de 3 KDa a 20 KDa, mientras que el perfil electroforético de *S. cingulata* mostró 65 proteínas de bajo peso molecular de entre 1.3 KDa y 22 KDa. Todos los reportes anteriormente descritos aunados a los encontrados en este trabajo de investigación evidencian una amplia gama de proteínas para genero *Scolopendra*, y en nuestro caso particular de *S. viridis* y *polymorpha* se identificó que el veneno tiene una gran variedad proteica, mismas que pueden ser evaluadas en diferentes ensayos biológicos para una muy posible aplicación biotecnológica.

### 8.3. Estandarización de la técnica de zimograma

Con la finalidad de evitar el desperdicio de veneno de las especies de *Scolopendra*, se optó por probar la técnica de zimografía utilizando veneno de serpiente *Crotalus durissus* para la familiarización del ensayo (ver Fig. 10). En el caso de la concentración de sustrato (gelatina) se probaron las concentraciones de 0.3% y 0.2% siendo la concentración de 0.2% la que presentó una mayor resolución de la actividad de proteasa. De acuerdo con la literatura los protocolos indicaban que el zimograma tenía que incubarse a 37°C por 18 horas en buffer, sin embargo, el siguiente parámetro a determinar era determinar el buffer correcto, razón por lo cual se determinó probar 4 soluciones amortiguadoras, las cuales se resumen en la tabla siguiente:

**Tabla 7.** Soluciones amortiguadoras probadas para la estandarización de la técnica de zimograma.

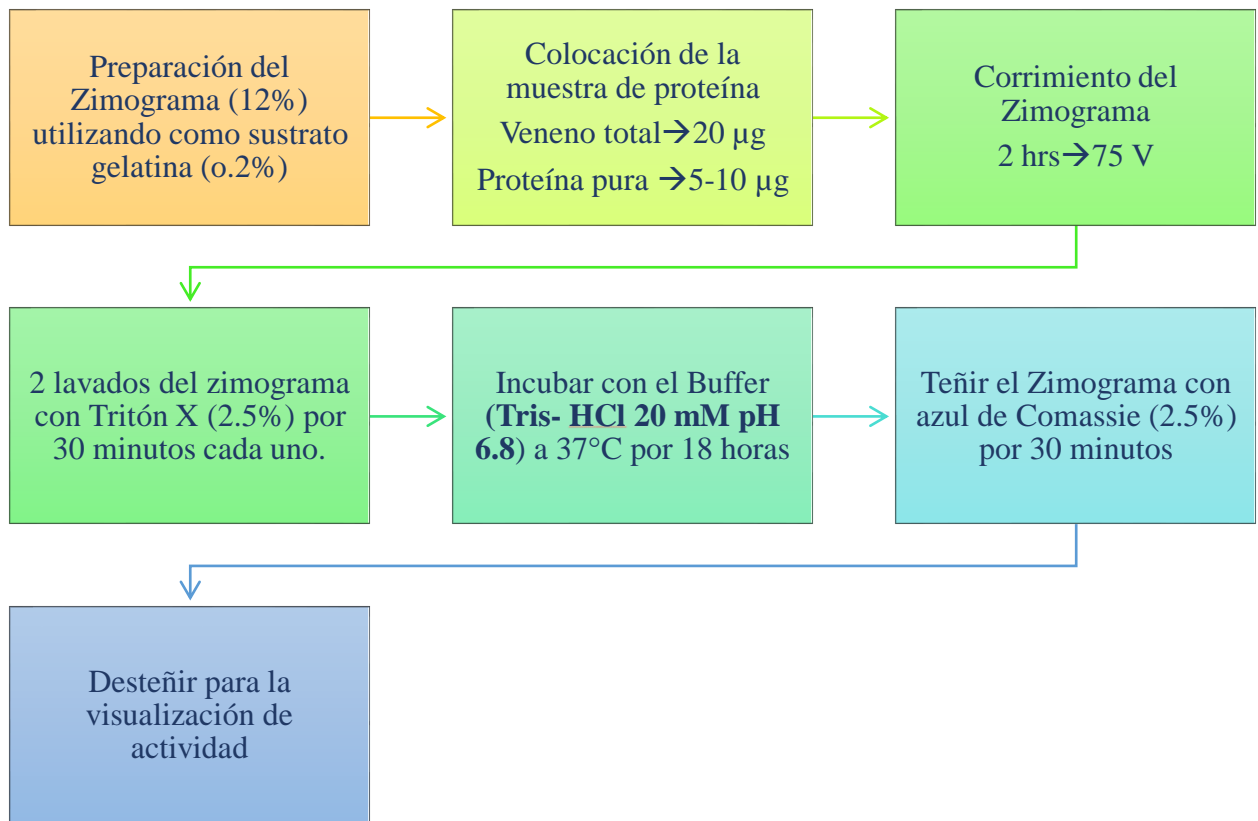
Buffer	pH
Tris 50 mM; 5 mM de CaCl <sub>2</sub>	8
Citratos: Ácido cítrico; Citrato de Na <sup>+</sup>	4
Tris 20 mM	6.8
Tris- HCl 50 mM, NaCl 150 mM y CaCl <sub>2</sub> 10 mM	7.6



**Figura 2.** Visualización de las bandas del veneno de serpiente con actividad proteasa. Zimograma al 16%, (0.2% de gelatina). Tinción azul de Coomassie. A) Buffer Tris 50 mM 5 mM de CaCl<sub>2</sub> pH 8, B) Buffer Citratos pH 4, C) Buffer Tris 20 Mm pH 6.8 y D) Buffer Tris-50 mM, NaCl 150 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM.

De acuerdo con la figura 10, las soluciones amortiguadoras que presentaron una mejor resolución de las bandas de actividad de proteasas fueron la de la figura 10-B, 10-C y 10-D, razón por lo cual se probaron estos tres buffers con los venenos totales de *S. viridis* y *S. polymorpha*.

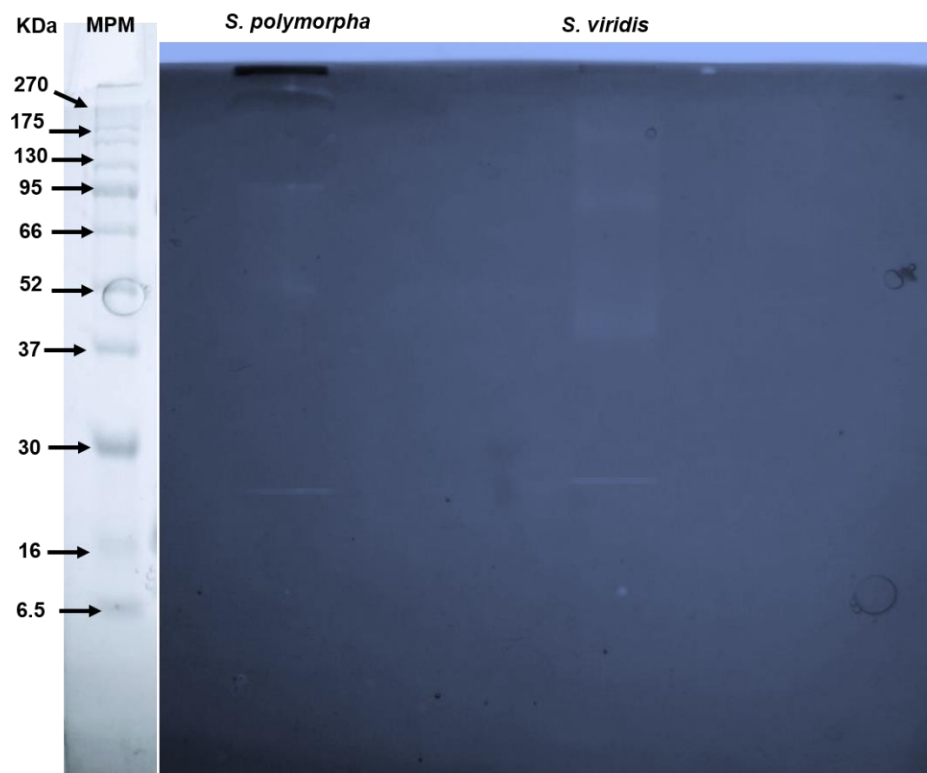
Una vez evaluadas las diferentes condiciones, se logró determinar el protocolo óptimo para la visualización de la actividad de proteasa para los venenos totales que se resume en la figura siguiente:



**Figura 3.** Protocolo óptimo para visualización de la actividad de proteasas del veneno de ciempiés y de proteínas puras.

#### 8.4. Zimograma (Actividad de proteasa de los venenos de *S. viridis* y *S. polymorpha*)

Luego de haberse obtenido el perfil proteico de los venenos se llevó a cabo la evaluación de posibles actividades proteolíticas mediante zimogramas al 12% de acrilamida-bisacrilamida copolimerizado con gelatina al 0.2% p/v como sustrato enzimático. Con este método se determinó la presencia o ausencia de proteínas con actividad de proteasa de los venenos totales. Fue analizada la aparición o ausencia de zonas blancas o de degradación del sustrato, que indican la actividad enzimática en los zimogramas. (Figura 12).

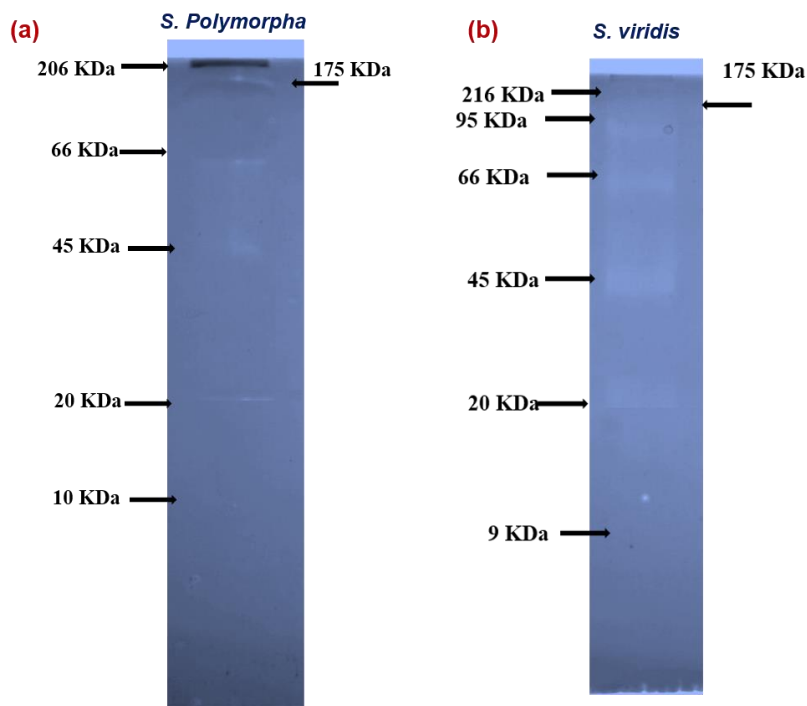


**Figura 4.** Zimograma al 12% (0.2% de gelatina) de los venenos totales de ambas especies de ciempiés (20 µg), se observa la presencia de bandas con actividad de proteasa tanto para el veneno de *S. polymorpha*, como para el veneno de *S. viridis*. Tinción con azul de Coomassie. (Valladares, 2022).

En la **Figura 12** se muestra el zimograma general de las muestras de los venenos totales de ambas especies de ciempiés *S. viridis* y *S. polymorpha*, donde se observan 6 actividades proteolíticas evidenciadas por las zonas blancas observadas en los geles. Las zonas donde se presentó digestión enzimática fueron: 2 bandas

por encima de 100 KDa, 2 bandas de peso molecular entre 100 y 65 KDa, 1 banda cercana a 45 KDa, 1 banda de 20 KDa, y 2 bandas pequeñas de 20 y 10 KDa.

A su vez, se presentaron algunas zonas con más actividad que otras, siendo en *S. viridis* las bandas de 45, 95 y 66 KDa las que presentaron una mayor digestión proteolítica, esto se observa en las zonas blancas evidenciadas en la fotografía, estas proteasas son seguidas, con respecto a actividad, por la banda de 20 y 10 KDa, y el resto de las bandas por encima de 100 KDa. Por otro lado, para *S. polymorpha* las bandas que tuvieron mayor actividad proteasa son las de 20 y 45 KDa, estas proteasas son seguidas, con respecto a actividad, por las bandas de 45, 66 y el resto de las bandas por arriba de 100 KDa. A pesar de que no se evidencia una zona de digestión notable en estas bandas de alto peso molecular, el hecho de que esa sección del gel esté muy clara y que dichas bandas proteicas no se observen en comparación con el gel normal de electroforesis, se toma como una evidencia de que están llevando a cabo un rol degradativo de la gelatina presente en el gel.

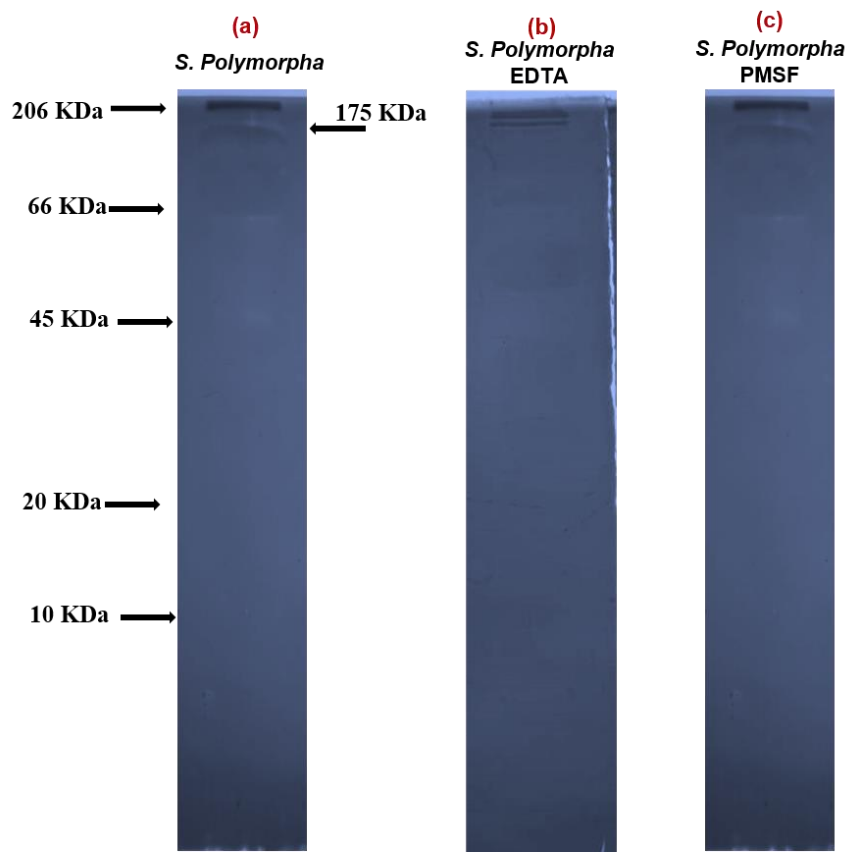


**Figura 5.** Zimogramas al 12% (0.2% de gelatina como sustrato) de los venenos totales de ambas especies de ciempiés (20 µg de muestra), se observa la presencia de bandas con actividad de proteasa tanto para el veneno de *S. polymorpha* (a) como para el veneno de *S. viridis* (b). Tinción con azul de Coomassie.

Los resultados anteriormente detallados presentan cierta similitud con trabajos anteriores realizados con otras especies de ciempiés; el primer trabajo es el de Granado (2014), quien reporta 8 proteasas presentes en el veneno de *S. gigantea*, de las cuales 5 presentaron actividad serín-proteasa (51 KDa, 100 KDa, 116 KDa y dos bandas  $\geq 250$  KDa), además 2 de ellas mostraron actividad metaloproteasa (22 KDa y 26 KDa respectivamente). En el trabajo realizado por Malta *et al.* (2008), se identificaron para *S. viridicornis*, dos bandas con actividad proteolítica (caseína) de 22 KDa y 44 KDa. Además, se corroboró lo reportado por López (2021), quien previamente había reportado actividad de proteasas en los venenos completos de *S. viridis* y *S. polymorpha*.

## 8.5. Determinación tipo de proteasa mediante inhibidores específico.

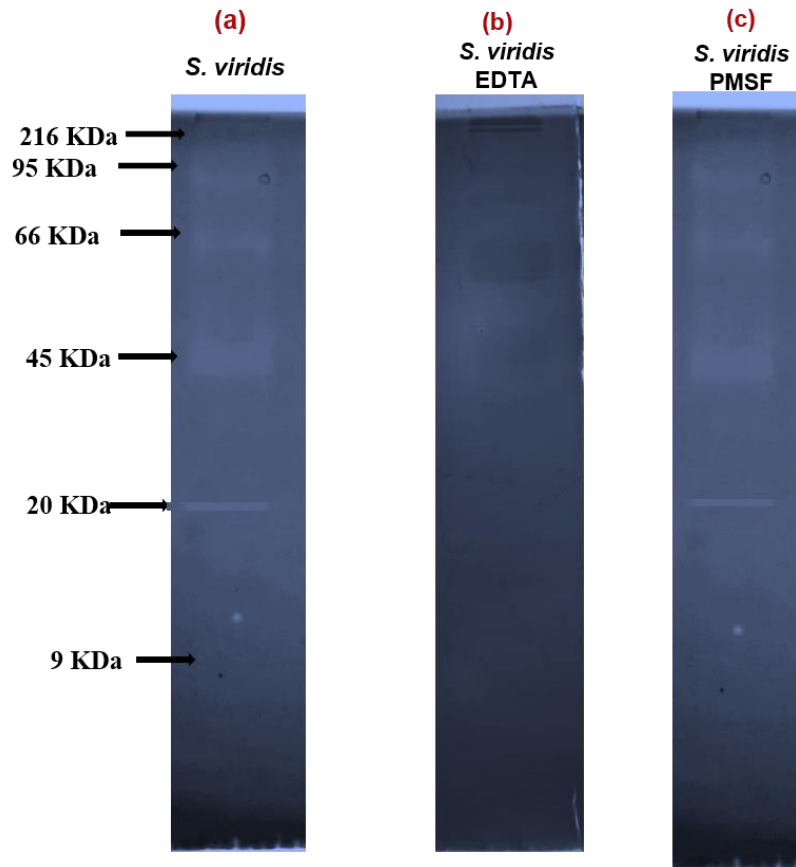
Con el zimograma general obtenido de la sección anterior, se procedió a investigar la naturaleza enzimática de las bandas que presentaron degradación enzimática. Para ello, se usaron inhibidores enzimáticos específicos que permitieron corroborar que tipo de actividad enzimática presentaron esas bandas.



**Figura 6.** Zimogramas al 12% (0.2% de gelatina como sustrato) del veneno de *S. polymorpha* con inhibidores. (20  $\mu$ g de muestra); Buffer 20 mM Tris-HCl pH: 6.8), (a) Se observa la presencia de bandas con actividad de proteasa en el veneno de *S. polymorpha*; (b) Inhibición total de las bandas de actividad total por el EDTA 0.1 M (inhibidor específico de metaloproteasas) y (c) No se observa inhibición por parte del inhibidor PMSF 10 mM (Inhibidor específico de serín-proteasas). Tinción con azul de Coomassie.

En la Figura 14b, en donde al zimograma le fue colocado EDTA (inhibidor de metaloproteasas) se logra observar que las bandas con actividad proteasa detectadas anteriormente para el veneno de *S. polymorpha* dejaron de ejercer su actividad enzimática. Esto se dedujo debido a que no se observaron zonas de

degradación enzimática y además solo se vieron bandas proteicas similares a la de un SDS-PAGE normal, lo que indica que el inhibidor EDTA ejerció su acción sobre esas enzimas. Este resultado sugiere que dichas enzimas pertenecen a la familia de las metaloproteasas.



**Figura 7.** Zimogramas al 12% (0.2% de gelatina como sustrato) del veneno de *S. viridis* con inhibidores. (20  $\mu$ g de muestra); Buffer 20 mM Tris-HCl pH: 6.8), (a) Se observa la presencia de bandas con actividad de proteasa en el veneno de *S. viridis*; (b) Inhibición total de las bandas de actividad total por el EDTA 0.1 M (inhibidor específico de metaloproteasas) y (c) Se observa una inhibición parcial de algunas proteínas por parte del inhibidor PMSF 10 mM (Inhibidor específico de serín-proteasas). Tinción con azul de Coomassie.

Con respecto a los zimogramas de *S. viridis* (Figura 15), se observa que al igual que el caso anterior, el inhibidor EDTA para metaloproteasas ejerció efecto sobre la actividad degradativa de las enzimas anteriormente encontradas (Figura 15b), puesto que después de la incubación y revelado solo se observan las bandas de proteína, pero no la actividad degradativa (zonas blancas) vistas con un zimograma normal (Figura 15a), mientras que el PMSF no tuvo efecto sobre la degradación de



la gelatina y se observó un perfil degradativo similar al del zimograma normal del veneno.

Haciendo el análisis de los resultados para este ensayo, se concluye que las proteasas observadas en ambos venenos son metaloproteasas, es importante señalar que la familia de metaloproteasas son un componente integral del veneno en muchos linajes venenosos, comprendidos los ciempiés (Malta *et al.*, 2008; Undheim *et al.*, 2014, 2015). Las metaloproteasas dependientes de zinc de ciempiés reportadas en la mayoría de los trabajos se limitan a las proteasas M12A o conocidas como metaloendoproteasas similares a la astacina (Undheim *et al.*, 2014, 2015; Ward & Rokyta, 2018). Sin embargo, en el trabajo de Ellsworth, *et al.*, (2019), se encontraron 5 metaloproteasas pertenecientes a la familia M12A en *S. sexspinosus*; no obstante, la principal clase de toxinas detectadas en esta especie de ciempiés pertenece a las metaloproteasas M12B, también conocidas como adamalisinas, que hasta el día de hoy son las primeras que se informan en cualquier linaje de ciempiés. Por todo lo anteriormente descrito, las metaloproteasas de *S. viridis* y *polymorpha* pudieran pertenecer a la familia M12A o M12B, sin embargo, se requieren estudios más profundos para determinar esta última información.

Las proteínas que presentan actividad de proteasa y que pertenecen a la familia de metaloproteasas participan principalmente en la degradación de la matriz extracelular y evitan la formación de coágulos de sangre, como consecuencia se presenta una alta actividad hemorrágica (Undheim & King, 2011). A nivel de la matriz celular las metaloproteasas alteran de forma específica a proteínas como la laminina, nidógeno, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos de la membrana basal endotelial, además también han sido reconocidas por su papel en la modificación postraducciona que permite la activación de otras proteínas del veneno (Chen *et al.*, 2012; Undheim *et al.*, 2014), lo que facilita la propagación y la función de los componentes sinérgicos del veneno. Se conoce que las metaloproteasas son las enzimas responsables de causar edema, necrosis, ampollas e inflamación, que son síntomas comunes del envenenamiento por ciempiés (Malta *et al.*, 2008; Undheim & King, 2011; Undheim *et al.*, 2015b; Hakim

*et al.*, 2015), lo cual sugiere que las metaloproteasas son ubicuas en los venenos de ciempiés. Con base a lo anteriormente descrito, los resultados de este trabajo de investigación respecto las proteínas que presentaron actividad metaloproteasa en los venenos de *S. viridis* y *S. polymorpha*, podrían constituir un blanco de estudios farmacológicos destinados a contrarrestar de forma específica las afecciones clínicas producidas por este tipo de proteasas.

### 8.6. Purificación e identificación de las proteínas con actividad proteasa

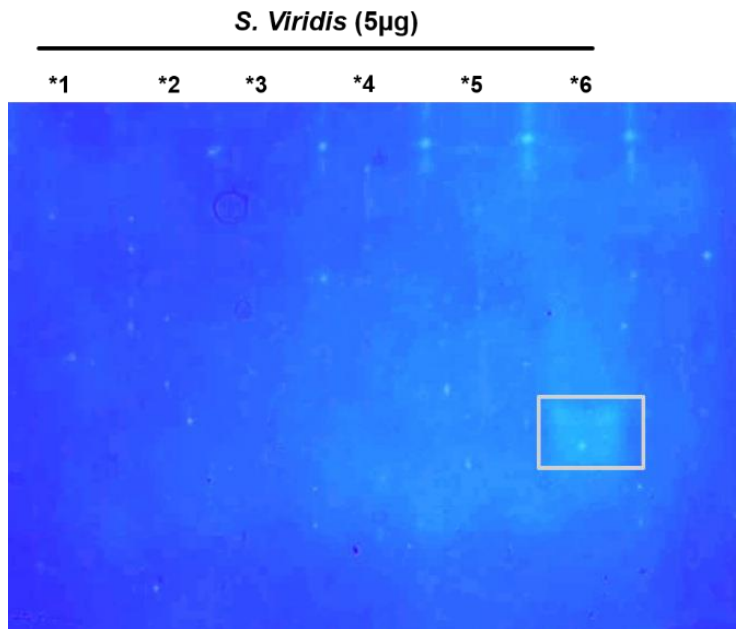
Una vez realizado el perfil proteico, los zimogramas de los venenos totales y determinado los tipos de proteasas presentes, se procedió purificar las bandas con actividad. Para ello, se cortaron cada una de las bandas de los venenos de ambas especies de ciempiés a partir de un gel SDS-PAGE al 12%, posteriormente por medio de la técnica de electroelución seguida de diálisis se recuperaron 4 proteínas del veneno de *S. viridis* y 2 proteínas del veneno de *S. polymorpha* que presentaron actividad de proteasa, las cuales se muestran en la tabla 5:

**Tabla 8.** Proteínas electroeluidas de los venenos totales de *S. viridis* y *S. polymorpha* con actividad proteasa.

<b>Especie</b>	<b>Peso molecular KDa</b>
<b><i>S. viridis</i></b>	45
	216
	66
	20
<b><i>S. polymorpha</i></b>	20
	206

Una vez electroeluidas las diferentes proteínas marcadas en la tabla anterior, se realizó la cuantificación y como primer punto se efectuó un zimograma en las mismas condiciones que como se hizo para los venenos totales, logrando visualizar solo una actividad muy marcada en la proteína de 20 KDa de *S. viridis* (Figura 16),

y en otro zimograma realizado posteriormente se encontró actividad de la proteína de 66 KDa (Figura 17).

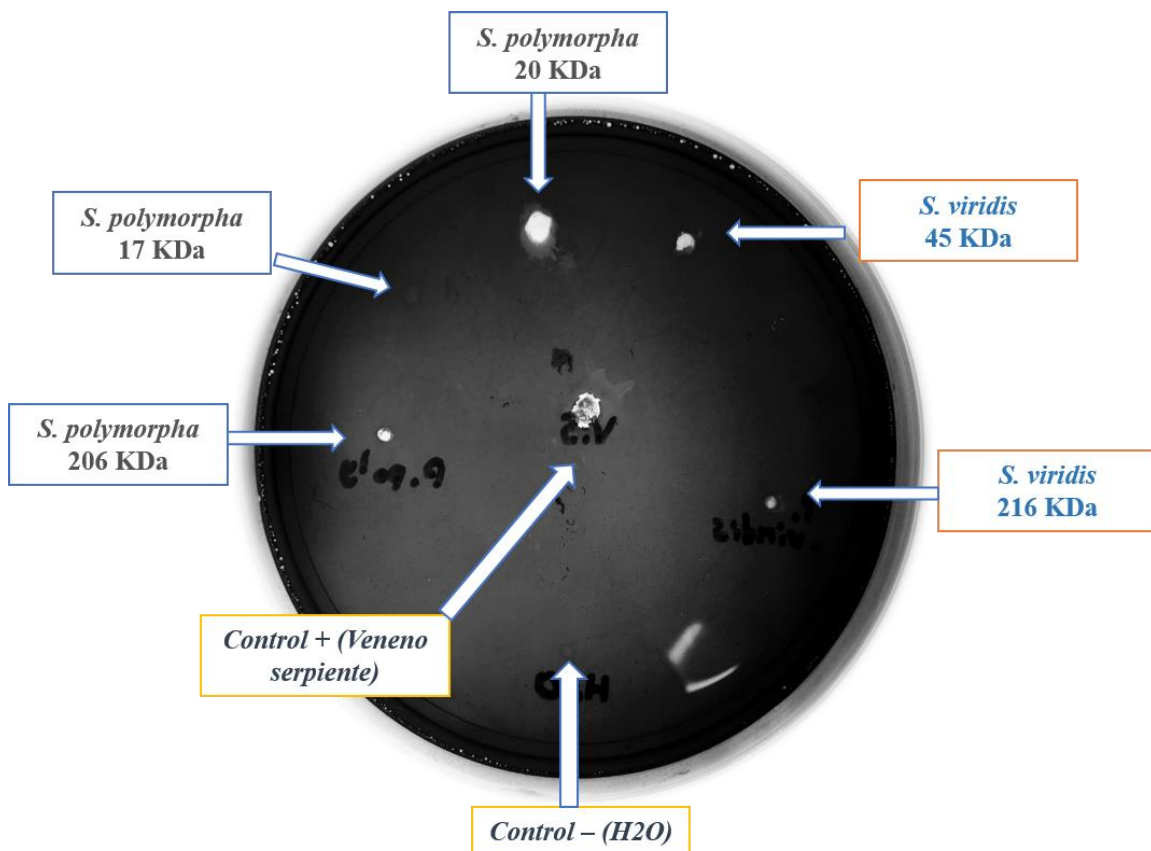


**Figura 8.** Zimograma al 16% (0.2% de gelatina) de proteínas electroeluidas del veneno de *S. viridis*. \*1: 175 kDa; \*2: 161 KDa; \*3: 89 KDa; \*4: 58 KDa; \*5: 49 KDa y \*6: 20 KDa. Tinción azul de Coomassie.

Este ensayo permitió observar la aparente pureza de las proteasas, sin embargo, la cantidad de muestra que se necesitó para visualizar la actividad de ambas muestras fue alta, y el rendimiento de recuperación de proteínas muchas veces es bajo, razón por lo cual se optó por un ensayo alternativo pero que también permite observar la actividad de las proteínas recuperadas con una menor cantidad de muestra. Cabe mencionar que debido a la poca disponibilidad del veneno de *S. polymorpha* las proteínas que se lograron recuperar, se probaron por el método descrito a continuación.

### 8.7. Determinación de la actividad de proteasa directa en caja Petri.

Derivado del inconveniente para visualizar la actividad de proteasa con la técnica de zimograma de las proteínas previamente identificadas y purificadas, debido a que se requiere una mayor concentración de éstas para una mejor visualización, se optó por utilizar este ensayo alternativo que permite visualizar la actividad de proteasa utilizando una menor concentración de muestra.

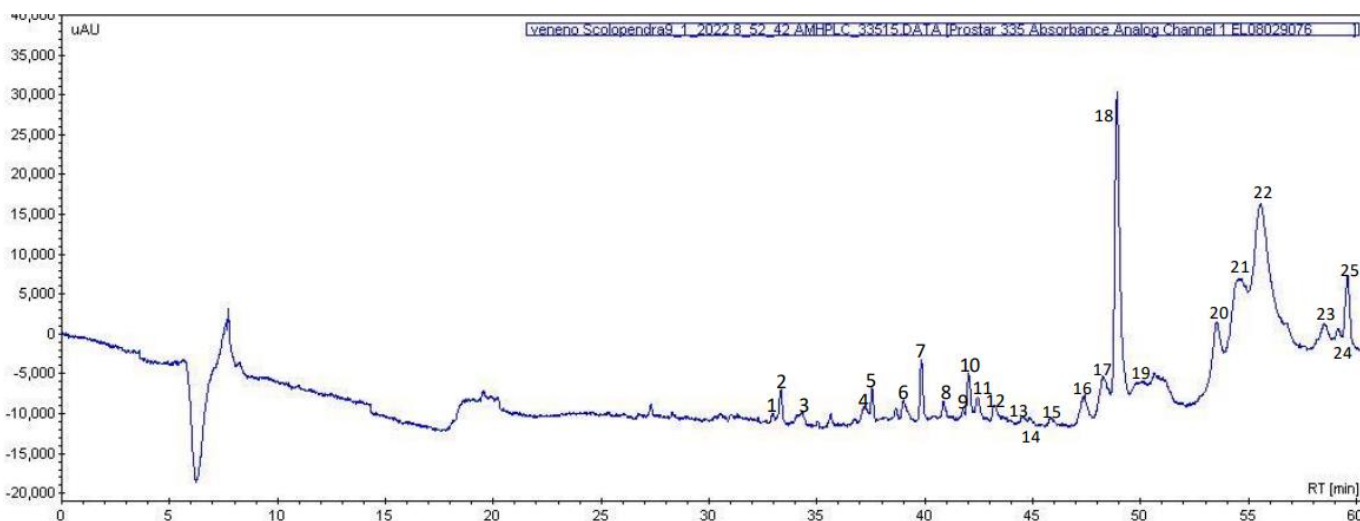


**Figura 9.** Actividad directa de proteasa de las proteínas electroeluidas de ambos venenos. (Sustrato: Gelatina comercial 7.5%, Muestra: 7.5 µg). Tinción Azul de Coomassie.

Gracias a esta prueba, se logró comprobar la actividad de proteasa de las proteínas electroeluidas de ambos venenos, que posteriormente se llevaron a RP-HPLC para determinar su pureza.

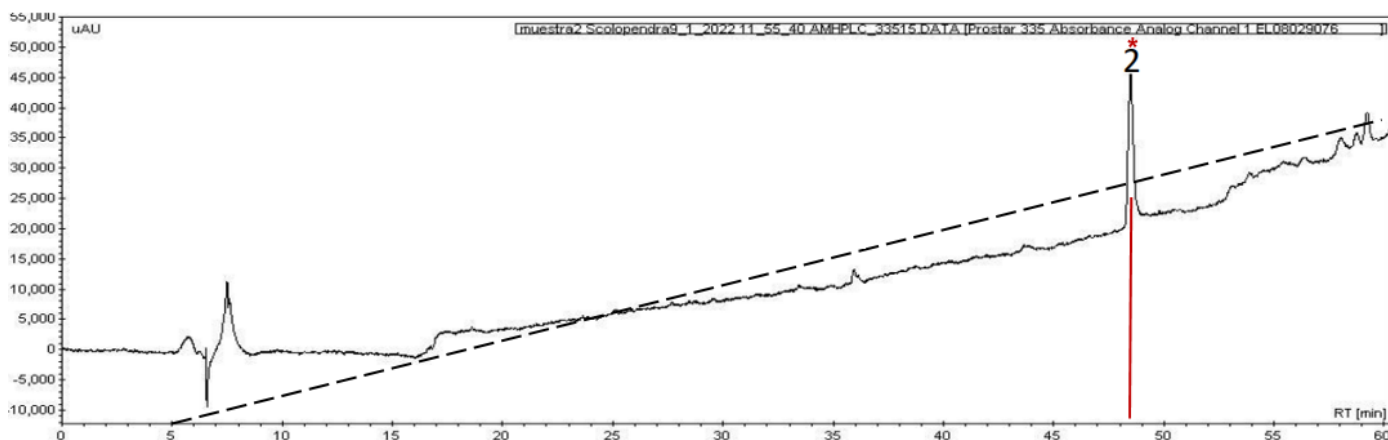
## 8.8. Determinación de pureza de proteasas mediante RP-HPLC

Con la finalidad de verificar la pureza de las proteínas electroeluidas y que presentaron actividad de proteasa en el método directo en caja Petri, se optó por verificarlas a través de la técnica de HPLC en fase reversa, para obtener los tiempos de retención y posteriormente pudieran ser mandados a secuenciación.



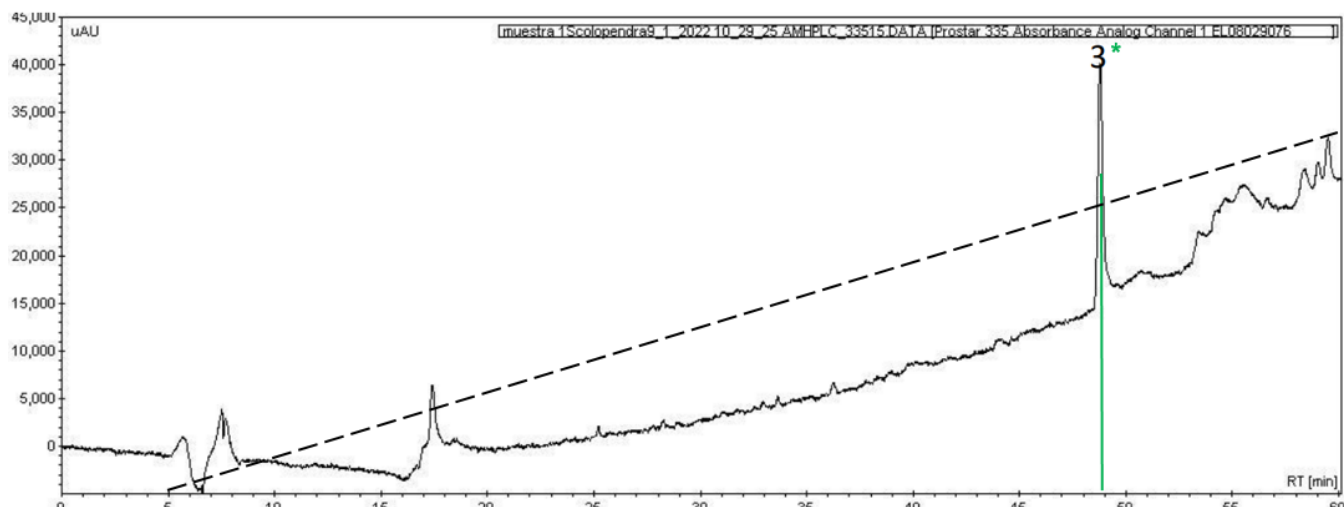
**Figura 10.** Cromatograma RP-HPLC de veneno de *Scolopendra viridis*. Columna C18 analítica (Supelco 504971), Gradiente 0-60% en 60 min. Flujo 1mL/min.

La Figura 18, muestra el cromatograma del veneno total de *S. viridis*, en donde se encontraron 25 picos cuyos tiempos de retención empiezan a partir de los 30 minutos hasta los 60 minutos, siendo el pico más abundante el número 18 cuyo tiempo de retención es de 49 minutos, seguido de los picos 7, 10 y 22. Lo anterior indica que la mayor parte de las proteínas del veneno tienen características más hidrofóbicas, puesto que comenzaron a eluir de la columna conforme se incrementó el porcentaje de solvente (Acetonitrilo). Este perfil, sirvió de referencia para los tiempos de retención de las proteínas purificadas y que de igual forma se procesaron por RP-HPLC.



**Figura 11.** Cromatograma RP-HPLC de proteína de 45 KDa del veneno de *Scolopendra viridis*. Columna C18 analítica (Supelco 504971), Gradiente 0-60% en 60 min. Flujo 1mL/min.

En la figura 19, se muestra el resultado de la cromatografía en fase reversa de la proteína de 45 KDa de *S. viridis*, donde se observan dos picos, siendo el pico más abundante y representativo el número 2, cuyo tiempo de retención aproximado es de 48.5 minutos, realizando la interpolación respecto al veneno total, este pico vendría siendo el número 17.



**Figura 12.** Cromatograma RP-HPLC de proteína de 216 KDa de *Scolopendra viridis*. Columna C18 analítica (Supelco 504971), Gradiente 0-60% en 60 min. Flujo 1mL/min

Por su parte, la figura 20 muestra la cromatografía RP-HPLC de la proteína de 216 KDa de *S. viridis*, donde se obtuvieron 3 picos, observándose que el pico abundante es el pico 3 cuyo tiempo de retención es de 49 minutos, y que al realizarse la

interposición con respecto al cromatograma de veneno total, sería el pico número 18.

En ambos casos, los cromatogramas de las proteínas purificadas tienen un pico abundante y con tiempos de retención similares, por lo cual se puede deducir que al menos comparten la característica de hidrofobicidad, pero amplia diferencia en pesos moleculares. Estos datos obtenidos se pueden comparar con proteínas purificadas de otras especies de ciempiés, por ejemplo, el trabajo reportado por Peng *et al.*, (2010), aisló y purificó por RP-HPLC dos péptidos del veneno de *S. subspinipes mutilans*, cuyos tiempos de retención fueron de estuvieron entre 45-48 y 65-70 minutos. Otro reporte de *S. subspinipes mutilans* hecho por Wang *et al.*, (2017), purificó un péptido también por RP-HPLC en el cual obtuvo cuatro picos cuyos tiempos de retención oscilaron entre 34.8-38 minutos, siendo el pico más abundante el del tiempo 35 minutos, cuya actividad resultó ser analgésica en modelos murinos. Siguiendo con reportes de esta misma especie, Yang *et al.*, (2013), indican que el péptido denominado como Ssm6a que actúa como inhibidor selectivo de Nav1.7 tuvo un tiempo de retención de 30 minutos. Además, estudios previos han demostrado que varios péptidos de ciempiés con actividades biológicas a menudo eluyen alrededor del 40 % de Acetonitrilo, por lo que pueden clasificarse con características hidrofóbicas (Chaparro & Da silva, 2016). Se puede deducir por lo anteriormente expuesto que los tiempos de retención encontrados en este trabajo para las proteínas de 216 y 45 KDa de *S. viridis* son similares a los reportados para otras proteínas de especies diferentes que de igual forma presentan alguna actividad biológica.

## X. CONCLUSIONES

- Se corroboró la actividad proteasa del veneno de las dos especies de ciempiés *S. viridis* y *S. polymorpha*.
- Identificamos 6 proteasas para cada veneno; *S. viridis* (216, 175, 95, 45, 20 y 9 KDa) y *S. polymorpha* (206, 175, 66, 45, 20 y 10 KDa).
- Las proteasas identificadas en ambas especies pertenecen a la familia de las metaloproteasas.
- De *S. viridis* se tienen los tiempos de retención (48.5 y 49 min respectivamente) de dos proteasas (216 y 45 KDa) por RP-HPLC.

## X. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios complementarios de caracterización de las proteasas (pH, temperatura, punto isoelectrico).
- Purificar y caracterizar las proteínas con actividad proteasa restantes en ambos venenos.
- Secuenciación parcial de al menos una de las proteínas puras.



## BIBLIOGRAFIA

- Abd El-Wahed, A., Yosri, N., Sakr, H. H., Du, M., Algethami, A. F. M., Zhao, C. & El-Seedi, H. R. (2021). Wasp Venom Biochemical Components and Their Potential in Biological Applications and Nanotechnological Interventions. *Toxins*, 13(3), 206. doi:10.3390/toxins13030206
- Almeida, F., Pimenta, S., De Figueiredo, M. Santero, M., Martín, M.C. & De Lima, M. (2002). Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 40: 1041-1045.
- Anwar A., Saleemuddin M. (1998) Alkaline proteases: A review. *Bioresouce Technology*. 64: 175-183.
- Avilés, X., Guasch, A., y Vendrell, J. (1994). Activación de precursores de proteínas. *Investigación y Ciencia*. 210:74–81.
- Banerjee, G., y Raya, A.K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 31:3–27.
- Barret, A.J., Rawlings, N.D., y O'Brien, E.A. (2001). The MEROPS database as a peptidase information system. *Journal of Structural Biology*. 134:95–102.
- Barret, A.J., Tolle, D.P., y Rawlings, N.D. (2003). Managing peptidases in the genomic era. *The Journal of Biological Chemistry*. 384:873–882.
- Barrett, A. J. (1994). *Methods Enzymology*. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases Vol. 244. Academic Press Inc. San Diego California USA. pp. 1–15.
- Barrett, A. J. (1995). *Methods Enzymology*. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. Vol. 248. Academic Press Inc. San Diego California USA. pp. 183.
- Blundell, T.L., & Johnson, M.S. (1993). Catching a common fold. *Protein Science*. 2:877–883.
- Blundell, T.L., y Johnson, M.S. (1993). Catching a common fold. *Protein Science*. 2:877–883.
- Bonato, L. & M. Zapparoli. (2011). Chilopoda – Geographical distribution. (pp. 327-337). In: Minelli, A. (Ed.). *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology: The Myriapoda*. Brill, Leiden.
- Brusca R. C., Brusca G. J. (2005). *Invertebrados*. 2da Edición. Ed. McGraw- Hill/Interamericana de España S. A. P.p. 691-705.
- Cifuentes, J.L. & F.G. Cupul. 2010. Venenos: armas químicas de la naturaleza. *Fondo de Cultura Económica*, México.
- Chaparro, E. & Da Silva, PI (2016). Lacrain: el primer péptido antimicrobiano del extracto corporal del ciempiés brasileño *Scolopendra viridicornis*. *Revista Internacional de Agentes Antimicrobianos*, 48(3), 277–285. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.05
- Chao, J.L. & Chang, H.W. (2006) Variation of the poison duct in Chilopoda centipedes 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 fibrinogenolytic enzyme in mammals. *PLoS ONE* 5 (5): e10393.

Cooper, AM, Fox, GA, Nelsen, DR & Hayes, WK. (2014). Variación en el rendimiento de veneno y la concentración de proteína de los ciempiés *Scolopendra polymorpha* y *Scolopendra subspinipes*. *Toxicon*, 82, 30–51. doi:10.1016/j.toxicon.2014.02.003.

Cruz, L. E. (2014). Determinación de la actividad antimicrobiana de proteínas del veneno de *Scolopendra viridis* Say en bacterias multirresistentes. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Cupul, F. G. (2010). El ciempiés: un bicho que se parece al borde de un petate viejo. *Biodiversitas*, 88: 8-11.

Cupul, F. (2013). *La diversidad de los ciempiés (Chilopoda) de México Mexican Diversity of Centipedes (Chilopoda)*. 20, 17–41

Cupul, F. (2014). *Los ciempiés escolopendromorfos (Chilopoda: Scolopendromorpha) de México : clave para géneros*. 40(203), 286–291.

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.,

Dhama, K., Mohanty, I., Arunvikram, K., Behera, D., Milton, A.A.P., Elaiyaraja, G. & Rajesh, G. (2016). Immunomodulatory and therapeutic potential of zootoxins (venom and toxins) on the way towards designing and developing novel drugs/medicines: an overview. *Int. J. Pharmacol.* 12 (2), 126–135. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.126.135>.

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 Lett* 397: 83-88.

Edgecombe, G. D. (2011). Fossil history. (pp. 355-361). In: Minelli, A. (Ed.). *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology: The Myriapoda*. Brill, Leiden.

Edgecombe, G.D., V. Vahtera, S.R. Stock, A. Kallonen, X. Xiao, A. Rack and G. Giribet. (2012). A scolopocryptopid centipede (Chilopoda: Scolopendromorpha) from Mexican amber: synchrotron microtomography and phylogenetic placement using a combined morphological and molecular data set. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166: 768-786.

Egeblad M. & Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*.2(3):161-174.

Ellsworth, S. A., Nystrom, G. S., Ward, M. J., Freitas de Sousa, L. A., Hogan, M. P., & Rokyta, D. R. (2019). Convergent recruitment of adamalysin-like metalloproteases in the venom of the red bark centipede (*Scolopocryptops sexspinosus*). *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2019.06.021.

Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., Van Middlesworth., J.F., Springer, J.P., Heimbach, J.C., Chih-Tai, L., Herber, W.K., Dixon, R.A.F. & Darke, P.L. (1990). Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. 265:14209–14191.

- Flores-Guerrero, U. S., Huerta de la Barrera, I. E. & Cupul-Magaña, F. G. (2018). Registro del ciempiés *Scolopendra polymorpha* Wood, 1861 (Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopendridae) en la Isla María Cleofas, Océano Pacífico de México. *Acta zoológica mexicana*, 34, e3411194. <https://doi.org/10.21829/azm.2018.3411194>
- 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.
- Fox, J.W., Shannon, J.D. & Bjarnason, J.B. (1991). Proteinases and their inhibitors in biotechnology. *Enzymes in biomass conversion. ACS Symposium Series*. 460:62–79.
- 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.
- Fukasawa, K.M., Hata, T., Ono, Y., & Hirose J. (2011). Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. *Journal of Amino Acids*. 2011:1–7.
- Govind, N.S., Mehta, B., Sharma, M., y Modi, V.V. (1981). Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry*. 20:2483–2485.
- 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.
- 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).
- Gupta R., Beg Q.K. & Lorenz P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:15–32.
- Guzmán, F., Barberis, S. & Illanes, A. (2007). "Peptide synthesis: chemical or enzymatic". *Electronic Journal of Biotechnology*, 10: 279-314.
- 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.
- Hakim, M. A., Yang, S. & Lai, R. (2015). Centipede venoms and their components: resources for potential therapeutic applications. *Toxins* 7:4832–4851.
- Heinz M. K. (2004) Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology* 15(4): 330-334.
- Hernández, J., Pérez, G., Pérez, J., Montaña, M., Ramos, C., Ramírez, A., Camarena, Á., Sansores, R. & Falfán, R. (2014). Participación de las metaloproteinasas de matriz extracelular en la EPOC. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 73(2), 128-137. Recuperado en 13 de noviembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0028-37462014000200005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462014000200005&lng=es&tlng=es).
- Hickman, C., L. Roberts, S. Keen, A. Larson, H. l'Anson & D. Eisenhour (2008). Principios integrales de zoología. McGraw-Hill- Interamericana de España S.A.U. Madrid, España. 414-148 p.
- Hoffman, D. R. & Jacobson R. S. (1996) Allergens in Hymenoptera venom XXVII: Bumblebee venom allergy and allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 97: 812–821.

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.

Kamal, S., Rehman, S. & Iqbal, H.M.N. (2017). Biotechnological valorization of proteases: from hyperproduction to industrial exploitation: *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 36:511–522.

López, E.A. (2021). Identificación De Proteínas Con Actividad De Proteasa De Los Venenos De *Scolopendra viridis* Say y *Scolopendra polymorpha*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

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.

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

Medina, C & Santana A. (2004). Metaloproteinasas en la inflamación intestinal. Servicio de Aparato Digestivo y Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Tenerife. España. Vol. 3 N° 4.

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

Meunchan, M., N., Uawonggul & P., Incamnoi & Sukprasert, Sophida & Rungsa, Prapenpuksiri & Somdee, Theerasak & Roytrakul, Sittiruk & S., Thammasirirak & S., Daduang. (2016). Identification of Bioactive Molecules from Thai Centipede, *Scolopendra subspinipes dehaani*, Venom.. *Chiang Mai Journal of Science*. 43.

Mótyán, J.A., Tóth, F. & Tözsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*. 3:923–942.

Müller-Esterl W., Brandt U., Anderka O., Kiehl 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.

Nagase, H. (2001). Metaloproteasas. *Protocolos actuales en ciencia de proteínas*, 21.4.1–21.4.13. doi:10.1002/0471140864.ps2104s24.

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.

Parrilla, A.P., Navarrete, L. F., Girón, M. E., Aguilar, I. & Rodríguez, A. (2008). Use of hen egg derived immunoglobulin against *Scolopendra* (*Scolopendra gigantea*) venom. *Revista Científica*, 18(4), 385-392. Recuperado en 20 de enero de 2023, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592008000400007&lng=es&tlng=en](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592008000400007&lng=es&tlng=en).

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.

- Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Jia, P., Liu, J., & Yu, H. (2010). Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. *Toxicon*, 55(2-3), 274–279. doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.040.
- Pérez-García L. (2004). Metaloproteinasas y piel. Servicio de Dermatología. Complejo Hospitalario de Albacete. España; 95(7):413-23.
- Poldermans, B. (1990). Proteolytic enzymes. En: Proteolytic enzymes in industry: production and applications. Ed. Gerhartz, W. Weinheim, Germany: VCH Publishers. pp. 108–123.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., y Deshpande, V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:597–635.
- Rates, B., Bemquerer, MP, Richardson, M., Borges, MH, Morales, RAV, De Lima, ME, & Pimenta, AMC. (2007). Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon*. 49: 810-826.
- Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (2000). MEROPS: The peptidase database. *Nucl. Acids Res*. 28:323-325.
- Sabotic, J. & Kos J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:1351–1375.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 40:2689– 2694.
- Shah, M.A., Mir, S.A. & Paray, M.A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science & Technology*. 94:5–16.
- Shelley, R.M. (2002). A synopsis of the North American centipedes of the orden Scolopendromorpha (Chilopoda). *Virginia Museum of Natural History*, 5: 1-108.
- Sitprija, V. & Suteparak S. (2008) Animal toxins: an overview. *Asian Biomedicine* 2: 451–457.
- Theron, L.W. & Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98:8853–8868.
- 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.
- Tyndall, J.D.A., Nall, T. & Fairlie, D.P. (2005). Proteases universally recognize  $\beta$ -strands in their active sites. *Chemical Reviews*. 105:973–1000.
- Uhlig, H. (1998). Industrial enzymes and their applications. Nueva York: Willey & Sons, pp.: 1-11, 146-179.
- Undheim, E. A. B., & King, G. F. (2011). On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon*, 57(4), 512–524. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.004>

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., & King, G. F. (2011). On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon*, 57(4), 512–524. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.004>

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

Veiga, S., Da Silveira, R.B., Dreyfuss, J., Haoach J, Pereira A, Mangili O. & Gremski, W. (2000). Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*.38(6): 825-839.

Verma, S., Dixit, R. & Pandey, K. C. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in pharmacology*. 7:107.

Vigueras, M., Yajaira, S., Tovar, J.X., Ramirez, V., M.R. & Mercado, F.Y. (2019). Capítulo I Enzimas proteolíticas: Generalidades y la importancia de las aspartil proteasas fúngicas. *La ciencia y las mujeres en México*. Universidad Politécnica de Pachuca Handbooks-©ECORFAN-México, Querétaro.

Wang, Y., Li, X., Yang, M., Wu, C., Zou, Z., Tang, J. & Yang, X. (2017). Centipede venom peptide SsmTX-I with two intramolecular disulfide bonds shows analgesic activities in animal models. *Journal of Peptide Science*, 23(5), 384–391. doi:10.1002/psc.2988

Ward, M.J. & Rokyta, R.D. (2018). Transcripción de las glándulas venenosas y proteómica del veneno del ciempiés azul gigante de Florida, *Scolopendra viridis*. *Toxicon*, 152, 121–136. doi:10.1016/j.toxicon.2018.07.030.

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

Wong E. S. W. & Belov K. (2012) Venom evolution through gene duplications. *Gene* 496: 1-7.

Wu, W. & Chen, X.L. (2011). Extracellular metalloproteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92:253–262.

Yang S., Z. Liu, Y. Xiao, Y. Li, M. Rong, S. Liang, Z. Zhang, H. Yu, G. King & R. Lai. (2012). Chemical punch packed in venoms makes centipedes excellent predators. *Mol. Cell. Prot.* 11: 640-650.

Yang, S., Xiao, Y., Kang, D., Liu, J., Li, Y., Undheim, EAB & King, G.F. (2013). Descubrimiento de un inhibidor selectivo de NaV1.7 del veneno de ciempiés con una eficacia analgésica superior a la morfina en modelos de dolor de roedores. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 110(43), 17534–17539. doi:10.1073/pnas.13062851.

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.

## ANEXOS

### Anexo 1. Curva estándar de BSA, para el método de Lowry

Tubos	Volumen H <sub>2</sub> O (μL)	Volumen BSA (μL)
Blanco	1000	0
1 μg	999.66	0.33
3 μg	999	1
7.5 μg	997.5	2.5
15 μg	995	5

### Anexo 2. Soluciones método de Lowry

Soluciones
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2%
NaOH 0.1M
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O 1%
CuSO <sub>4</sub> 1%
Reactivo de Folin puro

**\*Preparación de solución 1:** Pesar juntos 2g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 0.4g de NaOH, se disuelven en 100 mL con agua miliQ.

**\*Preparación de KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O 1%:** Pesar 0.1g de KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O en 10 mL de agua miliQ.

**\*Preparación de CuSO<sub>4</sub> 1%:** Pesar 0.1g de CuSO<sub>4</sub> y disolver en 10 mL de agua miliQ.

Se obtiene el resultado a través de una regresión lineal para obtener los valores de la ecuación de la recta (r, m y b). La fórmula para el cálculo es  $y = mx + b$  que ya despejada queda  $x = \frac{y-b}{m}$  donde el valor de "y" es la absorbancia obtenida para la muestra.

### Anexo 3. Componentes y proporciones del gel concentrador y separador de poliacrilamida al 12% con SDS.

**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	16%	Gel concentrador	4%
H <sub>2</sub> O Mili-Q	820 µL	H <sub>2</sub> O Mili-Q	850 µL
Acrilamida	2.13 mL	Acrilamida	208 µL
Tris pH 8.8	1.04 mL	Tris pH 6.8	156 µL
SDS 10 %	56 µL	SDS 10 %	12.5 µL
APS 10%	56 µL	APS 10%	12.5 µL
TEMED	8 µL	TEMED	8 µL



**Anexo 4. Componentes para solución de Coomassie**

<b>Reactivo</b>	<b>Porcentaje en volumen</b>
<b>Metanol</b>	45.45%
<b>Ácido acético</b>	9.2%
<b>Agua</b>	45.1%
<b>Azul de Coomassie R-250</b>	0.25%

**Anexo 5. Componentes para 100 mL de solución desteñidora.**

<b>Reactivos</b>	<b>Porcentaje en volumen</b>
<b>Metanol</b>	30%
<b>Ácido acético</b>	10%
<b>Agua</b>	60%

**Anexo 6. Buffer de electroelución Tris- HCl 50mM pH 6.8.**

Pesar 12.114g de Tris para 2 L de solución, ajustando el pH a 6.8 con HCl concentrado.

**Anexo 7. Zimograma con 0.2 % de gelatina para la actividad de proteasa.****NOTA:** Se utiliza un gel SDS-PAGE 12% ver anexo 11.2

**Reactivos:** Gelatina comercial  
 Tritón X-100  
 Tris  
 NaCl  
 CaCl<sub>2</sub>

**Soluciones:** Gelatina 0.2%  
**Buffer:**  
 Tris 50 mM pH 7.6  
 NaCl 150 mM  
 CaCl<sub>2</sub> 10 mM  
 Tritón X-100 2.5%

**PREPARACIÓN DEL GEL**

<b>Gel separador</b>	<b>16%</b>	<b>Gel concentrador</b>	<b>4%</b>
<b>H<sub>2</sub>O Milli-Q</b>	820 µL	<b>H<sub>2</sub>O Milli-Q</b>	850 µL
<b>Acrilamida</b>	2.13 mL	<b>Acrilamida</b>	208 µL
<b>Tris pH 8.8</b>	1.04 mL	<b>Tris pH 6.8</b>	156 µL
<b>SDS 10 %</b>	56 µL	<b>SDS 10 %</b>	12.5 µL
<b>APS 10%</b>	56 µL	<b>APS 10%</b>	12.5 µL
<b>TEMED</b>	8 µL	<b>TEMED</b>	8 µL

Primeramente, el agua se calienta y en ella se disuelven 0.2% (0.008 g) de gelatina previamente pesados, a continuación se incorporan el resto de los reactivos del gel separador, una vez acabada la corrida el gel es sometido a 2 lavados de 30 min cada uno con Tritón-X100 (2.5%), posteriormente el gel se incuba en Tris- HCl 50 mM, NaCl 150 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.6, durante 18 horas a una temperatura de 37°C, finalmente se teñirá con azul de coomassie R-250 para la visualización de las bandas con actividad de proteasa.



Cuernavaca, Morelos, a 24 de abril del 2023.

### VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: "**Caracterización química de proteasas del veneno de *Scolopendra viridis* y *Scolopendra polymorpha***", que presenta el **C. Misael Corona Ramírez**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección de la DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

#### Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE (CEIB UAEM)

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA (CEIB UAEM)

DRA. MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ (CIDC-UAEM)

DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS (CEIB UAEM)

DRA. SUSANA VALENCIA DIAZ (CEIB UAEM)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ | Fecha:2023-04-24 17:20:07 | Firmante**  
DB35ld7N3oPuwZrUIRe92dlokAbXYh6BeY42v7580sNIIlQ+vVW06U8XZ7QPgXOLLfaQIRdn2QWoeapbnXGEJgfbgJTEyx7HfEjrlGlgllkn4qtv9n7Cll/yK0TJAybZ/8hyaNGp9P  
MMBS2ODNkAw1yAfVcQuXrpS7UZ6Ue9r0m/yfV0JEeLayW1R0YITJy2pO+eJyKvOILY/XhOkygtWCQwk6+pf5f6q0ABfbnNLv28M4wYtMxcrghY47i6Uts1manm9sbGG1ExyNCi  
QJZdAs4ME2DexKDPmUlfy8AMxl55UcqifoHNPoTIKryuYIShWVp+RwBsw+eeMcg==

**ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2023-04-24 17:39:52 | Firmante**  
ZMb7B297UUGgrMnKsE8860tkMQz2/yuvghwqWj+Rsl4kOQLmPykICgwk9xBcCIX+IHgp1sFvmucxjeABGnJhS+gus4VnCNjz9Phw1uWIByBBm9Lg+oeq5+NCwMwIoYhNFKkC  
RCMwrpmp1kbnw6029VuxJV05lgrBBFe0JDg0IEsMoYsPPVWkS5U0U0gjqETnScrC7k7rTzcKOG3BeFrZvwa6w1j5W7Qz4+Wwsx2Ru9sJnXnTYrDufM0M0c17Bs7nllN37iO  
D9aC1W8dbRn8Ccvd+deZefwFncd8TZIF4ex/325P6YiAu6a/uNh4mEctEJH1mVQN2xTuNfKw==

**JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2023-04-25 07:07:30 | Firmante**  
TtSKHT71GByzLXbJ+DdqBSXsyngTC6mlDoosHAKCYWielMq/UocIMU1gp4+D7QUquWyibExOhY8xsrtY2tQL6oRRNthw8ZwrhD+wAK3LpAxw9AWWKMxCvx40tzUZNP/Pe81  
Pk84Kc4AjepH3v0WbmuPTOWWaiJfTVIQHaX0H4ncEs45v8sslyd2OgJEap49vymOfOMBa2TOjCxxea11Y6l64L+n13+3/C4BvLJvXC25VMEX/kBjWiKeIr9aols9z8O4gw8b  
ma5SZ5TldkHK5L9FIE6fOHkYRrTjDrVeZIEW+HHbQ2ZoXvte15j1jUvPj3YhR0g8Z8O2C63/w==

**SUSANA VALENCIA DIAZ | Fecha:2023-04-25 07:44:49 | Firmante**  
USgVuEjntfuQtlIgh+KGYmNaPt3V6WPzcdKtyHqcvNOH614bMINT4V+uDvp4PMIQNSbN8TLD8jmEIOFvYQywfpiCZhiSgF5BHRGdFPC0nk/MDfaw4QVDB3o1sWgUznp43ApalNO/  
G5caxJpHDEmXDULWQ+JWhra/kT+IrozvOS3+9Y+okb/ue67AoE8wKlJjXQnz/+V8qncsQXirTQqzjNipGoBsbXncDL3gXRNrbjTgyChdpnNinOLM0SSbyJjmhAslz0T3zmNG  
R7KqtY5xvYKW51174l2T95+sGll7zsaqLVMKGj9sY8blh+Er4/iCUDedqTJdT3NTRIFVg==

**MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2023-04-25 10:35:33 | Firmante**  
YhQLTtQvVTrvSnEzjWsbFjFH02cr8/2ITm+V6TikLds6GZalNJ/sI2ZUeSoCU2b858Sc0SdPmSum8Ri9vbF0r2o6ArKl3GWP63vp6l0mSSEbnv29GRtyUrsbTPxf2J79gLE4pgyCh  
tDgX688de2euG9Sa7JVWHKtZQEPL0TWzFUZ2+OByGOEXJo81UchJHEM03LofBwACSKIH44gqSfNfvtupO26V6vylMXj5vuq8b54bHCeR92qKelKpNouw5c3mcmZ55orcsa  
MmTYifb/fs+XhO/Hg5cFNCUehxJHuv+2i70T1dQQWcxjeAqBmZq3w9i+7+ezBkRfw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FHBiwpRst

<https://efirma.uaem.mx/noRepudia/30Og1znebi2IXcdzOu4cmVO9Yj0bZL00>

