

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POST GRADO

**Aislamiento y propiedades de una Insecto
Toxina del Veneno del Escorpión
Centruroides Margaritatus Gervais, 1841
(Scorpiones: Buthidae)**

TESIS para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Luz Dora Velásquez Ramos

Lima – Perú 2005

A todos aquellos que investigan.

Toda investigación demanda de esfuerzo y el aportar con un granito de arena en la adversidad es más valioso que tener todo y no hacer nada.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero reconocimiento a todas las personas que de uno u otro modo contribuyeron a la culminación exitosa de la presente investigación. Particularmente quiero manifestar mi agradecimiento:

A mi asesor amigo Mg. Enrique Escobar quien me dio la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, por compartir su tiempo conmigo con disciplina, responsabilidad, y por enseñarme que frente a la adversidad se puede hacer investigación.

Al Doctor José Ochoa, por su valiosa ayuda en el reconocimiento de la especie "*Centruroides margaritatus*".

A los laboratorios de Ficología Marina y Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, así como también al Centro de Investigaciones de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina, por su apoyo con el préstamo de algunos equipos.

A los chicos del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a Carlos Rivera, por su apoyo en la colecta de insectos.

A quienes el tiempo y el espacio no les permitió compartir conmigo estos momentos, mi Abuela Victoria y mi tía Dora, así como a mis Padres, por su cariño, confianza y sobre todo paciencia. Particularmente cuando te decía "Papá tenemos que cazar cucarachas" y sin estar enterado, te hice parte del equipo de trabajo.

Al jurado integrado por las profesores Doris Huerta, Raquel Oré, Silvia Suárez y Nancy Rojas, por su completa disposición en la evaluación del trabajo.

A mis compañeros de estudios y aquellos con quienes compartimos ideales nobles, Elsa Béjar, Jorge Herrera, Oscar Huamán, Carola Salas y Julián López, por sus orientaciones y a la vez poner la cuota de humor en los momentos más trágicos de las clases. A Los profesores amigos Mercedes Soberón y Mario Monteghirfo, quienes solían preguntarme " Y como va la tesis".

Finalmente a todos aquellos que sin estar involucrados directamente con este trabajo supieron darme animo para seguir adelante.

CONTENIDO

	Pag.
• Resumen.....	01
• Abstract.....	02
• Introducción.....	03
• Antecedentes.....	05
• Material y Métodos.....	08
• Resultados.....	13
• Discusión.....	15
• Conclusiones.....	19
• Bibliografía.....	20

ABREVIATURAS:

PAGE SDS: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

CM:	carboximetil
cm:	centímetro
g:	gramo
kDa:	kilodalton
M:	molar
mg/mL:	miligramo por mililitro
mg:	miligramo
ml/h:	mililitro por hora
mL:	mililitro
mm:	milímetro
N:	normalidad
Nm	nanómetro
°C:	centígrados
rpm:	revoluciones por minuto
TEMED:	tetra metil etilen diamino
V:	voltios
µg:	microgramo
µL:	microlitro

RESUMEN

En el presente trabajo se ha aislado y caracterizado parcialmente una insecto toxina del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*. La separación se hizo utilizando una columna de CM Sephadex C-25 con buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 7,0.

La insecto toxina aislada es de naturaleza básica y por PAGE-SDS muestra dos bandas proteicas de 6.6 y 5,2 kDa. Además no posee actividad proteolítica ni fosfolipásica.

Por otro lado, al evaluar su toxicidad en insectos, resultó ser letal a *Schistocerca piceifrons peruviana*, *Grillus* sp. y *Periplaneta americana* en dosis de 1, 2 y 4 μ g de proteína, respectivamente.

Este es el primer aislamiento y caracterización bioquímica de una insecto toxina de veneno de escorpión en el Perú

ABSTRACT

In this work an insect toxin scorpion was isolated and partially characterized from the venom of *Centruroides margaritatus*. It was isolated using ion exchange CM Sephadex C-25 column chromatography with 0,05M ammonium acetate buffer at pH 7,0.

The isolated insect toxin is a basic protein and by PAGE-SDS showed two protein bands of 6.6 and 5,2 kDa. In addition has no proteolytic and phospholipase activity.

The toxicity activity showed that is highly toxic in insects. *Schistocerca piceifrons peruviana*, *Grillus* sp. and *Periplaneta americana* was killed with 1, 2 and 4 μ g of protein, respectively.

This is the first isolation and biochemical characterization of an insect toxin from scorpion venom in Perú.

INTRODUCCIÓN

Los escorpiones son arácnidos que viven en regiones tropicales y subtropicales, tanto en zonas desérticas como de abundante vegetación. En el mundo, se ha estimado la existencia de aproximadamente 1500 especies de escorpiones, todos los cuales son venenosos.

El veneno de escorpión es elaborado por dos glándulas ubicadas en el último segmento del post-abdomen, denominado telsón, que termina en una espina curva llamada aculeus ó aguijón, a través del cual discurre un canal único que comunica las glándulas venenosas con el exterior.

El veneno es un fluido viscoso elaborado por células epiteliales de la pared de la glándula venenosa, cuyo color varía según la especie entre transparente, blanco lechoso y amarillo.

La composición química del veneno de escorpión está dada por una variedad de compuestos protéicos (neurotoxinas, enzimas como la hialuronidasa, fosfolipasa A₂, acetilcolinesterasa, proteasas, etc. y proteínas estructurales), indoles y aminoazúcares (Zavaleta, 1983).

Las neurotoxinas son los principales compuestos tóxicos del veneno de escorpión, capaces de actuar sobre una amplia variedad de seres vivos, produciendo la parálisis de presas como insectos, arañas y crustáceos; sin embargo en el hombre, el efecto del veneno puede ser inocuo o fatal, dependiendo de la especie que se trate. Es así que, los escorpiones más peligrosos para el hombre pertenecen a los géneros *Tityus* (Norte y Sudamérica), *Centruroides* (México), *Androctomus*, *Buthacus*, *Leiurus*, *Buthotus* y *Buthus* (Mediterráneo y norte de África) y *Parabuthus*

(Sudáfrica). En México la especies de *Centruroides* son reponsables de la muerte de personas, especialmente de niños menores de 9 años Zavaleta (1983).

Particularmente, *Centruroides margaritatus* es un escorpión de la familia Buthidae, que está distribuido desde México hasta el norte de Sudamérica en Venezuela, Colombia y Ecuador. Su presencia en el Perú, siempre fue considerada dudosa, y sólo muy recientemente ha sido confirmada la presencia de esta especie en la provincia de Zarumilla - Tumbes (Escobar y Ochoa, 2003). Esta especie puede llegar a alcanzar fácilmente los 11cm de longitud y su color varía de café oscuro a negro, mientras que sus patas son ligeramente amarillentas, siendo el veneno, de apariencia transparente o turbio lechoso (figura 1).

Se sabe que la picadura de *Centruroides margaritatus* ocasiona en el hombre problemas neurotóxicos; sin embargo su dieta se basa principalmente en insectos, como cucarachas, a las cuales caza y paraliza con su veneno durante la noche.

En este trabajo se ha estudiado el veneno de *Centruroides margaritatus*, de nuestro país y se ha caracterizado la toxina responsable de la parálisis de insectos. El interés general en el estudio de las insectotoxinas radica no sólo en dilucidar la manera como actúan durante el envenenamiento, sino además en el potencial uso que pueden tener como agentes para el control biológico de plagas de insectos que frecuentemente afectan la agricultura.

En este sentido los objetivos de la siguiente investigación fueron:

- Aislar la insectotoxina del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*.
- Determinar su peso molecular y naturaleza ácido - básica.
- Determinar su probable actividad proteolítica y fosfolipásica.
- Determinar su toxicidad sobre *Periplaneta americana*, *Grillus* sp y *Schistocerca piceifrons peruviana*.

ANTECEDENTES

En general, las toxinas aisladas de venenos de escorpiones han mostrado tener acción sobre insectos, crustáceos y roedores, y la mayoría de ellas son toxinas que afectan los canales de sodio o de potasio (Garcia, *et al.*, 2001). Considerando el efecto tóxico del veneno hacia los insectos, algunos estudios se han realizado con la finalidad de aislar estas toxinas y evaluar su potencial uso bioinsecticida. Así por ejemplo, Zlotkin *et al.* (1971) aislaron la AaIT, una insecto toxina del veneno de *Androctonus australis* que aparentemente es específica para insectos ya que no afecta a crustáceos ni roedores. De la misma especie Nagakawa *et al.* (1997) purificaron y determinaron la secuencia de aminoácidos de otra potente insecto toxina, la AaIT5.

Del veneno del escorpión *Buthus martensii* Karsch, se han purificado y cristalizado tres insecto toxinas. Dos de ellas, la BmKI1 y BmKI4, muestran fuerte toxicidad en insectos, mientras que la BmKI6 es relativamente débil. Todas ellas tienen un evidente efecto analgésico en ratones, siendo ésta una función biológica nueva de las insecto toxinas (Guan *et al.*, 2000).

Así también se han aislado nuevas toxinas la TbIT-1 y la Tb2-IT, a partir del veneno de *Tityus bahiensis*, una de ellas específica para insectos y la otra con acción sobre insectos y roedores (Pimenta *et al.*, 2001).

Los primeros estudios sobre los escorpiones del Perú se iniciaron en 1968 y ellos fueron importantes porque permitieron identificar el efecto de algunos venenos, especialmente de *Hadruidoidea lunatus*, así como conocer la distribución geográfica y diversidad de estos animales. De estos estudios se llegaron a considerar hasta 31 especies para nuestro país, entre las que se incluía, de manera incierta, a *Centruroides margaritatus*. Igualmente se consideraron también algunas especies del

género *Tityus*. Como se sabe, los géneros *Centruroides* y *Tityus*, que pertenecen a la familia Butrhidae incluyen a las únicas especies peligrosas para el hombre (Aguilar, 1968; Aguilar y Meneses, 1970; Maury, 1978; Franke, 1977).

Los venenos de escorpión de la familia Buthidae se caracterizan por tener acción paralizante, bloquear por completo la transmisión neuromuscular, producir secreción abundante y obstrucciones en los bronquiólos, generar contracciones de los músculos laríngeos y bronquiales que contribuyen a una parálisis respiratoria, lo que puede producir la muerte por inhibición del diafragma (Bucherl, 1969).

Recientemente la presencia de *Centruroides margaritatus* ha sido confirmada en la provincia de Zarumilla del departamento de Tumbes (Escobar y Ochoa, 2003).

Sin embargo, los venenos de escorpiones de nuestro país, fueron muy poco estudiados; y desde 1965 hasta 1988 sólo se habían estudiado, de manera muy general, los venenos de únicamente tres especies. Así por ejemplo, en el caso del veneno de *Hadruidoles lunatus*, que es el que tiene mayor distribución, desde Ancash a Arequipa, se llegó a describir algunos de sus efectos tóxicos luego de ser inoculados en roedores por diferentes vías, intramuscular, intraperitoneal e intradérmica. Se encontraron diferentes efectos como parálisis, desequilibrio al caminar y necrosis en la piel. (Cáceres *et al.*, 1972) y además se reportó la presencia de compuestos farmacológicos como la serotonina y la histamina (Zavaleta, 1983). En los venenos de *Hadruidoles charcasus* y *Brachistosternus ehrenbergii*, se dieron reportes únicos y por lo mismo muy preliminares y genéricos (Arboleda *et al.*, 1973; Calderón y Aguilar, 1981). Además en todos estos estudios solo se trabajó con el veneno total y por lo tanto las proteínas responsables de los efectos del veneno no fueron aisladas ni identificadas.

Más recientemente, a partir del año 2000, Acosta y Ochoa han reportado la presencia de nuevas especies de escorpiones para nuestro país (Acosta y Ochoa, 2000, 2001; Ochoa y Acosta, 2002; Ochoa, 2002), y actualmente, se considera la

existencia de más de 40 especies distribuidas en 6 familias (Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Euscorpiidae, Ischnuridae e Iuridae). Por otro lado, recién durante el año 2002 se han iniciado los primeros estudios sobre el aislamiento y caracterización de las proteínas de venenos de escorpiones de nuestro país, y en este sentido los primeros estudios de este tipo se han realizado con los venenos de *Hadruidoidea lunatus*, *Hadruidoidea mauryi* y *Brachistosternus ehrenbergii* (Escobar *et al.*, 2002; Velásquez y Escobar, 2004; Rivera *et al.*, 2004).

Actualmente se sabe que las toxinas de venenos de escorpión que afectan a insectos, se caracterizan por unirse a canales de sodio y tener de 60 a 76 aminoácidos estabilizados por cuatro puentes disulfuro. Además esta familia de proteínas mantiene una estructura conservada que está dada por un núcleo compacto formado por una α hélice y tres hojas β plegadas (figura 2 a).

Así por ejemplo las insecto toxinas Lqh α IT, CsEv3 y LqqIII, de los venenos de *Leirus quinquestriatus hebracus* (Lebreton *et al.*, 1994), *Centruroides sculpuratus* (Babin *et al.*, 1974) y *Leirus quinquestriatus quinquestriatus* (Krimm *et al.*, 1999), respectivamente, mantienen esta estructura. Una excepción a esta regla es la toxina Bj_xtrIT del veneno del escorpión *Buthotus judaicus*, la cual presenta una estructura compuesta por 2 α hélices y tres hojas β plegadas (figura 2 b) (Oren *et al.*, 1998; Possani *et al.*, 1999).

Por otro lado en algunos casos, a partir de la secuencia de aminoácidos de la insecto toxina, se ha establecido la correspondiente secuencia nucleotídica del gen y se ha logrado expresar en *E. coli*. Tal es el caso de la toxina recombinante AaIT del veneno del escorpión *Androctonus australis*, la cual ha mostrado toxicidad y especificidad en cultivos celulares de insectos, más no en células humanas (Ji *et al.*, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

- **Escorpiones:** Un total de 55 escorpiones adultos de *Centruroides margaritatus* de ambos sexos, fueron colectados en algunas viviendas de la provincia de Zarumilla (Tumbes - Perú). En el laboratorio, los especímenes fueron mantenidos individualmente en cubetas de plástico de 10 x 10 cm. Los escorpiones fueron alimentados con *Grillus* sp. y/o *Periplaneta americana* y 15 días antes de la extracción de veneno se les mantuvo en ayuno.

Insectos adultos de: *Periplaneta americana*, *Grillus* sp y *Schistocerca piceifrons peruviana*.

- **Ratones:** 15 ratones machos (*Mus musculus*) de 20 g de peso.

2. Equipos

- Agitador magnético Precisión Scientific Co.
- Balanza Ohaus
- Baño de temperatura Homef
- Cámara para electroforesis vertical y fuente de poder Techward
- Centrífuga clínica Sorvall
- Congeladora MIRAY
- Equipo para cromatografía en columna
- Espectrofotómetro UNICO
- Esterilizador HV OVENS
- Fotocolorímetro Spectronic 20
- Refrigeradora Infrisa
- Vortex Matheson Scientifican

3. Obtención y preparación del veneno

El veneno fue obtenido mediante estimulación eléctrica de 33 voltios y fue colectado con microcapilares de 1,2 mm de diámetro (Zlotkin and Shulov, 1969). El veneno extraído fue desecado y luego pesado, obteniéndose un total de 52,9 mg que se disolvieron en 2 mL de buffer acetato de amonio 0,05M pH 7,0. Para separar los restos insolubles, se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos.

4. Fraccionamiento del veneno y aislamiento de la toxina

El sobrenadante (2mL) fue aplicado a una columna de intercambio catiónico de CM Sephadex C-25 (1,1 x 17 cm) equilibrada en buffer acetato de amonio 0,05M pH 7,0. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente y a un flujo de 10 mL/h. Se colectaron fracciones de 2 mL y la elución de las proteínas retenidas en la columna se realizó con el mismo buffer conteniendo NaCl 0,25M y 0,6M (Escobar *et al.*, 2002).

5. Cuantificación de proteína

El perfil proteico fue estimado por la absorbancia a 280nm (Warburg and Christian, 1941). Adicionalmente la concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry *et al.* (1951). Se mezcló 0,2mL de muestra con 0,3mL de agua bidestilada y 2mL de la solución alcalina (carbonato de sodio 4%: sulfato de cobre 2%: tartrato de sodio y potasio 4%, 100:1:1), incubándose a temperatura ambiente por 15 minutos, luego de lo cual se añadió 0,5ml del reactivo de Folin Ciocalteus 1:6, continuándose la incubación por 15 minutos más. Finalmente se midió la absorbancia a 750nm y se determinó la concentración de proteína con respecto a un estándar de albúmina bovina 5 mg/mL.

6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE - SDS)

Se ensayaron 2 protocolos:

6.1 PAGE-SDS de acuerdo al método de Laemmli, (1970).- Este método se empleó con la finalidad de evaluar la pureza de la toxina. Para la preparación del gel

de resolución se mezcló 0,6ml de agua bidestilada, 1,2mL de solución stock de acrilamida (30% de acrilamida, 0,8% bisacrilamida), 1,8mL de buffer de resolución, 5 μ L de TEMED y 20 μ L de persulfato de amonio al 10%. Inmediatamente se vertió en la cámara de electroforesis y se cubrió con una delgada capa de agua hasta conseguir su polimerización. Formado el gel, el agua fue retirada con papel absorbente y se agregó el gel de stacking, el cual se preparó con 0,2mL de solución stock de acrilamida, 0,4mL de agua destilada, 0,8mL de buffer de stacking, 5 μ L de TEMED y 10 μ L de persulfato de amonio al 10%.

El veneno crudo (115 μ g) y la insecto toxina (7,0 μ g) fueron tratadas, por separado, con 20 μ L de buffer de muestra conteniendo SDS y mercaptoetanol, y fueron calentadas a 100°C por 5 minutos, antes de su aplicación al gel. Como proteínas estándares se utilizaron albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (68 V) durante 90 minutos. Concluida la corrida el gel de stacking fue eliminado y el gel de resolución se tiñó con azul brillante de coomassie 0,1% por 5 minutos y se decoloró en una solución conteniendo metanol, ácido acético y agua (3:1:8,5) hasta visualizar las bandas de proteína.

6.2 PAGE-SDS de acuerdo al método de Schägger y von Jagow (1987).- Este método se empleó para determinar la pureza y el peso molecular de la toxina. Para la preparación del gel de resolución se mezcló 1mL de solución stock de acrilamida (48% de acrilamida, 1,5 % bisacrilamida), 1mL de buffer de gel, 0,3mL de glicerol, 0,7mL de agua bidestilada, 4 μ L de TEMED y 10 μ L de persulfato de amonio al 10%. Seguidamente se vertió en la cámara de electroforesis e inmediatamente se agregó el gel espaciador, el cual se preparó a partir de 0,6mL de solución de stock de acrilamida, 0,26mL de buffer de gel 0,38mL de agua bidestilada, 4 μ L de TEMED y 4 μ L de persulfato de amonio al 10%. Finalmente se cubrió con una capa de agua hasta conseguir su polimerización. Luego de formado el gel, el agua fue retirada y se agregó el gel de stacking, el cual se preparó con 0,1mL de solución stock de

acrilamida, 0,3mL de buffer de gel, 0,5mL de agua bidestilada, 4 μ L de TEMED y 4 μ L de persulfato de amonio al 10%.

La insecto toxina (7,0 μ g) y una mezcla de proteínas estándares (citocromo b 12,400 kDa, insulina 5,800 kDa) fueron tratadas por separado, con 20 μ L de buffer de muestra (0,24mL de glicerol, 0,04 mL de mercaptoetanol, 0,8 mL de SDS 10%, 0,1 ml tris HCl 1M pH 6,8 y azul brillante de coomasie), y luego fueron calentadas a 100 °C por 5 minutos, antes de su aplicación al gel. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (68 V) durante 120 minutos. Concluida la corrida el gel de stacking fue eliminado y el gel restante se colocó en una solución fijadora de metanol y ácido acético por 30 minutos. Luego el gel se tiñó con azul brillante de coomassie 0,1% por 5 minutos y finalmente se procedió a su decoloración en una solución de metanol, ácido acético y agua (3:1:8,5) hasta visualizar las bandas de proteína.

El peso molecular fue estimado comparando el logaritmo del peso molecular de los estándares, versus la movilidad relativa de las bandas de proteína en el gel.

7. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

Adicionalmente, con la finalidad de evaluar la pureza de la toxina, se realizó una electroforesis en condiciones nativas a pH 4,5 para proteínas básicas de acuerdo al método de Reisfeld *et al.* (1962). Para la preparación del gel de resolución se mezcló 0,5mL del buffer de resolución, 1,2mL de solución stock de acrilamida (30% acrilamida, 0,8% bisacrilamida), 1,2mL de agua bidestilada, 40 μ L de TEMED y 60 μ L de persulfato de amonio al 20%. Inmediatamente se vertió en la cámara de electroforesis cubriéndose con una capa de agua hasta conseguir su polimerización. Luego de formado el gel, el agua fue retirada y se agregó el gel de stacking, el cual se preparó con 0,2mL del buffer de stacking, 0,3mL de solución stock de acrilamida, 1mL de agua destilada, 5 μ L de TEMED y 10 μ L de persulfato de amonio al 20%.

La insecto toxina (7,0 μ g) y una proteína estándar (citocromo b) fueron tratadas con 10 ó 20 μ L de buffer de muestra (0,5mL de buffer de gel de stacking, 0,2mL de

glicerol, fucsina 50mg/mL y 2mL de agua bidestilada), antes de su aplicación al gel. La electroforesis se realizó a voltaje constante (99 V) durante 3 horas. Concluida la corrida el gel de stacking se eliminó y el gel de resolución se tiñó con azul brillante de coomassie 0,1% por 5 minutos. Luego se decoloró en una solución decolorante (metanol, ácido acético y agua, 3:1:8,5) hasta visualizar las bandas de proteína.

8. Ensayos de toxicidad

En los ensayos de toxicidad con *Grillus sp*, se inoculó 10 μ L del veneno crudo o de cada fracción colectada, a nivel de la cavidad celómica. Para los ensayos sobre *Periplaneta americana* y *Schistocerca piceifrons peruviana*, se inoculó 20 μ L de cada fracción a nivel del tercer y primer segmento torácico, respectivamente.

En todos los casos los ensayos fueron por triplicado, midiéndose el tiempo en el que se produjo la parálisis del insecto.

9. Actividad de fosfolipasa

Se empleó 1ml de una emulsión de yema de huevo (100 μ L de yema de huevo en 80 ml de buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7,0). Luego de aplicar 10 μ L del veneno crudo (13,92 mg/mL) o de la insecto toxina (7,64mg/mL), se midió la disminución de la absorbancia a 920 nm durante 2 minutos (Marinetti, 1965).

10. Actividad proteolítica

La probable actividad proteolítica del veneno crudo y de la insecto toxina, fue evaluada por el método de Chavira *et al.* (1984), para lo cual utilizó como sustrato el Azocoll, el cual esta formado por un grupo Azo unido al colágeno. Se mezcló 0,1mL de Azocoll 0,025 mg/mL, 0,2 ml de buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7,0 y 10 μ L del veneno crudo (13,92 mg/mL) o de la insecto toxina (7,64mg/mL). Luego se incubó a 37 °C por 30 minutos y se agitó cada tubo para favorecer la reacción. Finalmente para detener la reacción se adicionó 2,5mL de NaOH 0,1N y se midió la absorbancia a 540 nm.

RESULTADOS

1. Aislamiento de la insecto toxina

Al pasar el veneno crudo de *Centruroides margaritatus* por la columna de CM Sephadex C-25, se obtuvieron 7 picos principales de proteína, de los cuales 2 fueron eluidos directamente, mientras que al utilizar el buffer de elución conteniendo NaCl 0,25M, se obtuvieron 3 picos y finalmente al emplear NaCl 0.6M se eluyeron 2 picos más. La actividad insectotóxica se encontró entre los picos III y IV, representando un 1,98% del total de proteína (Figura 3).

2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS).

El patrón electroforético del veneno crudo de *Centruroides margaritatus*, de acuerdo al método de Laemmli, mostró la presencia de 5 bandas proteicas, 4 de las cuales aparecieron débilmente teñidas, mientras que una quinta se mostró fuertemente coloreada. En el caso de la insecto toxina, el patrón electroforético mostró una banda proteica, de aproximadamente 14 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Figura 4).

Por otro lado, el patrón electroforético de la insecto toxina por el método de Schagger and von Jagow mostró la presencia de 2 bandas proteicas de 6,6 kDa y 5,2 kDa respectivamente (Figura 5 y 6).

Finalmente el patrón electroforético de la insecto toxina en condiciones nativas, de acuerdo al método de Reisfeld, mostró la presencia de una sola banda proteica (Figura 7).

3. Ensayos de toxicidad

Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación de 57 μ g de veneno total produjo la parálisis y muerte de *Grillus* sp, *Periplaneta americana* y *Schistocerca*

piceifrons peruviana. Con relación a las fracciones con actividad de insecto toxina, se encontró, que 2 μg de proteína produjeron la parálisis de *Grillus*. sp, en un tiempo de 20 segundos; mientras que en *Schistocerca piceifrons peruviana*, la parálisis se produjo en 2 minutos con cantidades desde 0,8 μg hasta 1 μg de proteína. Finalmente al determinar la toxicidad en *Periplaneta americana*, se encontró que 4 μg de proteína produjeron la parálisis del insecto en un tiempo de 2 minutos.

En todos los casos la toxicidad se evidenció por la parálisis de las patas posteriores, previo estiramiento y contracción de las mismas.

4. Actividad fosfolipasa y proteolítica

Tanto el veneno crudo como la insecto toxina del veneno de *Centruroides margaritatus* no mostraron actividad de fosfolipasa ni proteolítica.

DISCUSIÓN

La insecto toxina del veneno de *Centruroides margaritatus* ha sido aislada mediante cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-25 a pH 7,0. En este sistema, la insecto toxina, interactuó con el gel y sólo fue posible separarla después de adicionar al buffer de elución NaCl 0.25M. Esto significa que la insecto toxina a pH 7,0, tiene carga neta positiva, lo que le permite interactuar con la carga negativa de los grupos carboximetil del gel, y por lo tanto su punto isoeléctrico (pI) debe ser mayor a 7, tratándose así de una proteína básica.

La naturaleza básica de estas proteínas es una característica común de varias toxinas aisladas de venenos de escorpión y esto se aprovecha para separarlas en sistemas de intercambio catiónico. Así por ejemplo del veneno de *Buthus martensi* karsh, ha sido purificada la insecto toxina BmKIT por medio de 2 pasos cromatográficos en Sephadex G-50 y CM Sephadex C-25 (Ji, *et al.*, 1996 and Lou *et al.*, 1997). Igualmente de los venenos de *Hadruidoidea lunatus* y *Hadruidoidea mauri* se han aislado algunas toxinas básicas por cromatografía de intercambio catiónico (Escobar *et al.*, 2002; Velásquez y Escobar, 2004). Del veneno de *Buthus judaicus* también se han purificado dos insecto toxinas de naturaleza básica denominadas, Bj ITI (pI = 8.2) y Bj ITII (pI = 8.3) (Zlotkin *et al.*, 1982).

Otras insecto toxinas de venenos de escorpión han sido aisladas también mediante métodos cromatográficos que incluyen HPLC. Así por ejemplo Zlotkin *et al.* (1971) aislaron la insecto toxina AaIT del veneno de *Androctonus australis*, mediante cromatografía en fase reversa. Igualmente del veneno de *Tityus bahiensis*, se han aislado dos insecto toxinas, la TbIT-1 y la TbIT-2, a través de dos pasos cromatográficos, empleando una cromatografía líquida, rápida de proteína (FPLC) y una cromatografía líquida de alta performance (HPLC) (Pimenta *et al.*, 2001). Por último una potente insecto toxina la BotIT6, del veneno del escorpión *Buthus*

occitanus tunetanus, fue purificada también por cromatografía líquida de alta performance (Mejri *et al.*, 2003).

Cabe señalar que en este trabajo, la insecto toxina ha sido separada parcialmente, representando el 1,98% de la proteína total del veneno de *Centruroides margaritatus*.

Por otro lado, el patrón electroforético de la insecto toxina, en condiciones denaturantes (método de Laemmli) o en condiciones nativas (método de Reisfeld), mostró en ambos casos la presencia de una sola banda proteica, lo que aparentemente indicaba que la insecto toxina correspondía a una cadena polipeptídica de aproximadamente 14 kDa.

Sin embargo la electroforesis, de acuerdo al método de Schägger y von Jagow, la cual ofrece una gran resolución para proteínas de bajo peso molecular, mostró que la fracción insectotóxica presenta 2 bandas proteicas de 6,6 kDa y 5,2 kDa. Esto significa que la insecto toxina, no corresponde a una proteína pura.

Respecto a cuál de las 2 bandas es la insecto toxina, se puede especular hasta tres posibilidades:

Una primera opción es suponer que la insecto toxina corresponde a la proteína de 6,6 kDa, ya que la gran mayoría de insecto toxinas aisladas de venenos de escorpión son proteínas con pesos moleculares entre 6,0 y 7,0 kDa. En este sentido cabe mencionar que la insecto toxina AalT, de *Androctonus australis*, tiene 70 aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro (Darbon *et al.*, 1982), y la AalT5, del mismo veneno, tiene un peso molecular de 6,882 Da (Nagakawa *et al.*, 1997). Igualmente del veneno de *Bothus judaicus* se han purificado dos insecto toxinas de 7,5 kDa aproximadamente, y del veneno de *Buthus martensi karsh*, ha sido purificada la insecto toxina BmKIT que tiene 72 residuos y actividad analgésica en roedores (Ji *et al.*, 1996 and Lou M.J. *et al.*, 1997).

Una segunda posibilidad, implicaría que la insecto toxina corresponda a la cadena de 5,2 kDa. En este sentido, si bien no es lo usual, algunas insecto toxinas son de bajo peso molecular, como la insecto toxina del veneno de *Mesobothus tamulus* la cual está formada por 37 aminoácidos y posee cuatro enlaces disulfuro (Wudayagiri *et al.*, 2001).

Sin embargo, una tercera posibilidad sería que cada una de las dos bandas sea una insecto toxina con lo cual el veneno de *Centruroides margaritatus* tendría dos insecto toxinas, al igual que muchos otros casos ya señalados líneas arriba. Considerando esta posibilidad, podemos incluir también al veneno de *Tityus bahiensis*, del cual se han aislado 2 insecto toxinas, la Tb IT-1 y la Tb IT-2, siendo la TbIT-1 específica para insectos y la otra con acción sobre insectos y roedores (Pimenta *et al.*, 2001).

Las toxinas altamente específicas para insectos están descritas como: Toxinas *excitatorias*, son aquellas que causan una repetitiva activación con leve despolarización. En este grupo se encuentran las toxinas AaIT del veneno de *Androctonus australis* y LqqIT 1 del veneno de *Leirus quinquestratus quinquestratus*. Toxinas *depresantes*, son aquellas que despolarizan la membrana causando una inhibición de la excitabilidad. Pertenecen a este grupo las toxinas AaIT5 del veneno de *Androctonus australis*, la BotIT2, BotIT4, BotIT5 y BotIT6 del veneno de *Buthus occitanus tunetanus*, la LqqIT2 del veneno de *Leirus quinquestratus quinquestratus*, la BjlIT2 del veneno de *Buthotus judaicus* y la toxina LqhIT2 del veneno de *Leirus quinquestratus hebraeus* (Mejri *et al.*, 2003).

Al determinar la toxicidad sobre *Grillus* sp se ha encontrado que la parálisis se produce con 2µg. de proteína. En cambio la toxicidad sobre *Schistocerca piceifrons peruviana*, se evidencia con 1µg y en *Periplaneta americana* es evidente recién con 4 µg de proteína y en un tiempo mayor.

La primera toxina de escorpión con actividad específica sobre insectos fue obtenida a partir del veneno de *Androctonus australis* (Zlotkin *et al.*, 1971). Del mismo veneno se purificó la insecto toxina AaIT5 la cual es 100% letal sobre *Heliothis virescens*, el gusano cortador del tabaco, en una dosis $<1,5\mu\text{g}/100\text{mg}$ de masa corporal (Nagakawa *et al.*, 1997).

Por otro lado del veneno del escorpión negro *Bothotus judaicus*, se han purificado dos insecto toxinas la IT-I y la IT-II. La IT-I es 40 veces más tóxica que el veneno crudo, causando una rápida e inmediata contracción y parálisis en larvas de moscas; a su vez produce un rápido efecto excitatorio en langostas. La IT-II, causa flacidez y parálisis en larvas de mosca, y una lenta parálisis en langostas (Zlotkin *et al.*, 1982).

Así también, del veneno de *Buthus occitanus tunetanus* se purificó una insectotoxina depresante, la BotIT6, la cual resultó ser muy potente sobre *Blatella germanica* (Mejri *et al.*, 2003).

Adicionalmente la toxina Buta IT, obtenida del veneno de *Mesobothus tamulus*, es selectivamente activa sobre *Heliothis virescens*, causando flacidez y parálisis en una dosis de $1\mu\text{g}/100\text{mg}$ de masa corporal (Wudayagiri *et al.*, 2001).

Por otro lado los estudios realizados con el objetivo de evaluar la toxicidad específica sobre insectos, han concluido por lo general, que la toxina se une a un canal de sodio de la célula, manteniéndolo constantemente abierto, y como consecuencia de ello, provoca un influjo de sodio, ocasionando el hinchamiento de la célula y su posterior destrucción (Ji *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

1. Se ha aislado una insecto toxina del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*, mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM Sephadex C-25 a pH 7.
2. La insecto toxina es una proteína de naturaleza básica.
3. La PAGE-SDS por el método de Schägger y von Jagow, de la fracción insectotóxica, mostró dos bandas de proteína de 6,6 y 5,2 kDa.
4. La insecto toxina no tiene actividad de fosfolipasa ni proteolítica.
5. La parálisis de *Schistocerca piceifrons peruviana*, *Grillus* sp. y *Periplaneta americana*, se obtiene con 1, 2 y 4 μg de la toxina, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, L. y OCHOA, J. 2000. Nueva especie de *Orobothrirus* Maury del Perú (Scorpiones: Bothriuridae). *Revue Arachnologique*, 13 (10): 135 -144.
- ACOSTA, L. and OCHOA, J. 2001. Two news species of *Orobothrirus* Maury 1976 from Argentina and Perú, with comments on the systematics of the genus (Scorpiones: Bothriuridae). *Scorpions 2001 In Memoriam Gary A. Polis*. Fet and Selden (eds): 203 -214.
- AGUILAR, P. 1968. Nota sobre los escorpiones de Lima. *Anales Científicos. Univ. Agraria La Molina*. VI (3): 165 -172.
- AGUILAR, P. y MENESES, O. 1970. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. I: Nota preliminar sobre los escorpionida peruanos. *Anales Científicos. Univ. Agraria La Molina*. VI (8): Enero, Junio N° 1-2.
- ARBOLEDA, E.; MENESES, O y AGUILAR, P. 1973. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. III: El veneno del escorpión de Lambayeque. *Rev. Per. Ent.* 16 (1): 78 - 82.
- BABIN, D. R.; WATT, D. D.; GOOS, S.M. and MLENJEK, R.V. 1974. Amino acid sequence of neurotoxic protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch. Biochem. Biophys.* 164: 694-706.
- BUCHERL, W. 1969. Escorpionismo no Brasil, *Memorias Instituto Butantan*. 34 : 9-24.
- CÁCERES, I.; AGUILAR, P y MENESES, O. 1972. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. II: Efectos del veneno de escorpión de los pedregales en la costa central. *Rev. Per. Ent.* 15 (1): 38-43.
- CALDERON, S y AGUILAR, P. 1981. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. X: Efecto del veneno de *Brachistosternus ehrenbergi* sobre ratones albinos. *Rev. Per. Ent.* 30: 91-93.

- CHAVIRA, R.; BURNETT, T. and HAGEMAN, J. 1984. Highly Efficient and Simple Methods for the Preparation of Peroxidase and Active Peroxidase–Antibody Conjugates for Enzyme Immunoassays. *Anal Biochem.* 136:446-450.
- DARBON, H.; ZLOTKIN, E.; KOPEYAN, C.; VAN RIETSCHOTEN, J. and ROCHAT, H. 1982. Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion. *Androctonus australis* Hector. *Int. J. Peptide Protein Res.* 20: 320.
- ESCOBAR, E.; RIVERA, C.; TINCOPA, L. Y RIVERA. D. 2002. Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión *Hadruidoidea lunatus* Koch, 1867 (Scorpiones : Vejovidae). *Rev. Peru. Biol.* 9 (1): 3 -10.
- ESCOBAR, E y OCHOA, J. 2003. Confirmación de la presencia de *Centruroides margaritatus* en el Perú. Gervais 1841 (Scorpiones: Buthidae). Libro de resúmenes de la XII Reunión Científica ICBAR. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima -Peru. p. 52.
- FRANCKE, O. 1977. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. VI: Lista de especies y claves para identificar las familias y los géneros. *Rev. Per. Ent.* 20 (1) : 73-76.
- GARCIA, M.; GAO, YNIG.; Mc MANUS, O. and KACZOROWISKI, G. 2001. Potassium Channels: from scorpion venom to high - resolution structure. *Toxicon* 39 : 740-747.
- GUAN, R.-J.; LIU, X.-Q.; LIU, B.; WANG, M. and WANG, D.-C. 2000. Crystalization and preliminary X-ray analyses of insect neurotoxins with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensii* Karsh. *Acta Cryst.* D56. 1012-1014.
- JI, Y.H.; MANSUELLE, P.; TERAKAWA, S.; KOPEYAN, C.; YANAIHARA, N.; XU, K. and ROCHAT, H. 1996. Two neurotoxins (BmK I and BmK II) from the venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch: purification, amino acid sequences and assessment of specific activity. *Toxicon* 34: 987-1001.
- JI, S.-J., LIU, F., LI, E. and ZHU, Y. 2002. Recombinant scorpion insectotoxin AaIT kills specifically insect cells but not human cells. *Cell Research.* 12(12): 143-150.

- KRIMM, I.; GILLES, N.; SAUTIÈRE, P.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M.; GORDON, D. and LANCELIN, J.M. 1999. NMR structures and activity of a novel α -like toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. J. Mol. Biol. 285: 1749-1763.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of Structure Proteins During the Assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- LEBRETON, F.; DELEPIERRE, M.; RAMIREZ, A.N.; BALDERAS, C. and POSSANI, L.D. 1994. Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. Biochemistry. 33: 11135-11149.
- LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FAW, A. and RANDALL, R. 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. J Biol. Chem. 193: 265-275.
- LUO, M.J.; XIONG, Y.M.; WANG, M.; WANG, D.C. and CHI, C.W. 1997. Purification and sequence determination of a new neutral mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. Toxicon 35: 723-731.
- MARINETTI, G. 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta (Amst.). 98 : 554-565.
- MAURY, E. 1978. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. VII: Nuevos hallazgos y redescrición de *Brachistosternus andinus*. Rev. Per. Ent.Vol 21 (1): 23-26.
- MEJRI, T.; BORCHANI, L.; SRAIRI-ABID, A.; BENKHALIFA, R.; CESTELE, S.; REGAYA, I.; KAROUI, H.; PELHATE, M.; ROCHAT, H. and EL AYEB, M. 2003. BotIT6: a potent depressant insect toxin from *Buthus occitanus tunetanus* venom. Toxicon 41: 163-171.
- NAKAGAWA, Y.; LEE, Y-M.; LEHMBERG, E.; HERRMANN, R.; HERRMANN, R.; MOSKOWITZ, H.; JONES, A.D. and HAMMOCK, B.D. 1997. Anti - Insect Toxin 5 (Ait5) from *Androctonus australis*. Eur. J. Biochem. 246 (2): 496- 501.
- OCHOA, J. 2002. Nueva especie de *Brachistosternus* Pocock (Scorpiones: Bothriuridae) del Perú. Rev. Per. Biol. 9 (2): 55-63.

- OCHOA, J. and ACOSTA, L. 2002. Two new Andean species of *Brachistosternus* Pocock (Scorpiones: Bothriuridae). *Euscorpius Occasional publications in Scorpiology* 2: 1 -13.
- OREN, D.A.; FROY, O.; AMIT, E.; KLEINBERGER-DORON, N.; GUREVITZ, M. and SHAANAN, B. 1998. An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure* 6 : 1095-1103.
- PIMENTA, A.; MARTIN, M.; ROCHAT, H.; FIGUEIREDO, S.; KALAPOTHAKIS, E.; AFONSO, L. and DE LIMA, M. 2001. Purification aminoácido sequence and partial characterization of two toxins with anti - insect activity from the venom of the South American Scorpion *Tityus bahiensis*. *Toxicon* 39 : 1009-1019.
- POSSANI, L.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M. and TYTGAT, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ - channels. *Eur. J. Biochem.* 264 : 287-300.
- REISFELD, R.; LEWIS, W. and WILLIAMS, D. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature.* 195 : 281-283.
- RIVERA, C.; TINCOPA, L.; RAMOS, C.; MANYA, W. y ESCOBAR, E. 2004. Estudio preliminar del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* Gervais, 1841 (Scorpiones : Bothriuridae). Libro de resúmenes de la XIII Reunión Científica ICBAR. p.72.
- SCHÄGGER, H. and VON JAGOW, G. 1987. Tricine - Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry.* 166 : 368-379.
- VELÁSQUEZ, L. y ESCOBAR, E. 2004. Purificación y caracterización parcial de una toxina (Hm3) del veneno de *Hadruidoidea mauryi* Francke y Soleglad 1981 (Scorpiones : Iuridae). *Rev.per.biol.* 11(2):153-160.
- WARBURG, O. and CHRISTIAN, W. 1941. Isolierung and Kristalisation der Garungsferments enolase. *Biochem. Z.* Vol. 310: 384-421.
- WUDAYAGIRI, R.; INCEOGLU, B.; HERRMANN, R.; DERBEL, M.; PRABHAKARA, V. and HAMMOCK, B. 2001. Isolation and characterization of

a novel lepidopteran - selective toxin from the venom of south indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*. 2,16:1-8.

- ZAVALETA, A. 1983. El veneno del escorpión : Bioquímica y Farmacología. Boletín de Lima. N° 30 : 76.
- ZLOTKIN, E. and Shulov, A. S. 1969. A simple device method for collecting scorpion venom. *Toxicon* 7 : 331.
- ZLOTKIN, E., ROCHAT, H; KOPEYAN, C; MIRANDA, F. and LISSITZKY, S. 1971. Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Biochem* 53 : 1073.
- ZLOTKIN, E., LESTER, D., LAZAROVICI, P., and PELHATE, M. 1982. The chemistry and axonal action of two insect toxins derived from the venom of the scorpion *Bothotus judaicus*. *Toxicon* 20 : 323-331.
- ZLOTKIN, E., EITAN, E., BINDOKAS, V.L., ADAMS, M.E., MOYER, M., BURCKAHART, W. and FOWLER, H. 1991. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry* 30 : 4814 - 4820.