

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Aislamiento y caracterización parcial de una toxina (be1) del veneno de *Brachistosternus Ehrenbergii* (gervais, 1841). escorpión de los arenales

TESIS Para optar al título profesional de BIÓLOGO CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA

AUTOR

Catherina Ramos Tocto

LIMA – PERÚ 2005

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres
y a mi hermano Philip

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité revisor por
la atenta lectura, valiosas críticas y
sugerencias respecto a la proforma
de esta tesis.

Y a las diversas personas que hicieron
posible la realización de este trabajo

RESUMEN

Del veneno del escorpión *Brachistosternus ehrenbergii*, se ha aislado una toxina específica para ratones. La toxina denominada Be1 fue purificada mediante cromatografía de intercambio catiónico, en CM-Sephadex C-25 (16 x 1,1 cm) con buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 7, y se caracteriza por ser una proteína básica que constituye el 8,1 % de la proteína total del veneno.

La pureza de la toxina fue evaluada por electroforesis en condiciones nativas, de acuerdo al método de Reisfeld, y en condiciones denaturantes por el método de Schägger y von Jagow, determinándose que la toxina es de una sola cadena polipeptídica de 6,3 kDa.

La toxina al ser inoculada en ratones albinos adultos; vía intraperitoneal (62 µg) produce la aparición de algunos signos locales como hipersecreción salival seguido por cuadros de afección respiratoria, arrastre de las patas posteriores, hasta causar la muerte. Vía intramuscular (7,6 µg), Be1 produce parálisis temporal de la extremidad inoculada.

La toxina no tiene actividad de fosfolipasa, proteasa, acetilcolinesterasa ni actividad inhibidora de acetilcolinesterasa.

ABSTRACT

From *Brachistosternus ehrenbergii* scorpion venom a specific toxin to mice has been isolated. The toxin denominated Be1 was purified by means of cationic exchange chromatography on CM-Sephadex C-25 column (16 x 1,1 cm) with ammonium acetate buffer 0,05 M at pH 7, and it characterizes to be a basic protein that constitute 8,1 % of venom total protein.

Toxin purity was evaluated by electrophoresis in natives conditions, according to Reisfeld-method, and denaturants conditions by the Schagger-and-von Jagow-method, the toxin is a single chain polypeptide of 6,3 kDa has been determined.

The toxin to be inoculated on albino mice; intraperitoneal way (62 µg of Be1) produces some local signals as salival hipersecretion followed by respiratory affection, drags hind feet until death. Intramuscular way (7,6 µg) produces temporal paralysis of the inoculated limb.

The toxin has neither phospholipase, nor protease, nor acetylcholinesterase nor acetylcholinesterase inhibitor activity.

1. INTRODUCCIÓN

Los escorpiones son invertebrados ponzoñosos, adaptados a sobrevivir en ecosistemas desérticos, de escasos recursos y tropicales. Durante el día permanecen ocultos en microambientes, y de noche presentan actividad predatoria dirigida principalmente a insectos y crustáceos.

El veneno que producen está constituido principalmente por una mezcla compleja de mucus, sales, lípidos, azúcares y una gran variedad de compuestos proteicos (neurotoxinas y enzimas). Los escorpiones emplean esta secreción para capturar a sus presas y disuadir a sus predadores (Inceoglu et al., 2003).

La toxicidad del veneno es variable, incluso dentro de la misma especie, y de lugar a lugar; dependiendo de la edad, nutrición del escorpión y condiciones climáticas (Castro et al., 1981; Dittrich et al., 2002).

En el Perú, los primeros estudios sobre los venenos de estos animales, se dieron entre 1965 y 1988, y ellos estuvieron dirigidos a determinar la actividad tóxica del veneno sobre animales de laboratorio. Sin embargo durante este tiempo sólo algunas características bioquímicas y farmacológicas del veneno de *Hadruidoidea lunatus* pudieron ser establecidas, mientras que con los venenos de *Hadruidoidea charcasus* y *Brachistosternus ehrenbergii* se dieron reportes únicos y muy preliminares. Cabe señalar que, en todos estos estudios, los trabajos fueron realizados con el veneno total y los componentes activos del veneno no llegaron a ser identificados (Cáceres, 1965; Cáceres et al., 1972; Zavaleta et al., 1979; Arboleda et al., 1973; Calderón y Aguilar, 1988).

A partir del año 2001, el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de nuestra Facultad, ha iniciado un estudio sobre el aislamiento y caracterización de proteínas de venenos de escorpiones de nuestro país, lo que ha permitido identificar algunas toxinas en los venenos de *Hadruidoidea lunatus*, *Hadruidoidea mauryi* y

Centruroides margaritatus (Escobar et al., 2002; Velásquez y Escobar, 2004; Escobar et al., 2003).

Por otro lado, dentro de las nuevas especies que estamos estudiando tenemos a *Brachistosternus ehrenbergii* “escorpión de los arenales” perteneciente a la Familia Bothriuridae (Anexo A), grupo representativo por contener el mayor número de especies en nuestro país. Esta especie se caracteriza por ser de consistencia fuerte y robusta, de color amarillo anaranjado y superar los 10 cm de longitud (figura 1). Si bien la picadura puede resultar dolorosa, no se han registrado casos de envenenamiento y se le considera inofensiva para el hombre.

Brachistosternus ehrenbergii está ampliamente distribuido en los departamentos costeros de nuestro país, aunque su presencia también se ha evidenciado en Ecuador y Chile; la mayor densidad poblacional de este arácnido se ha encontrado en áreas terrosas o arenosas, pero a su vez utiliza variedad de microhábitats como piedras y adobes (Calderón, 1982; Calderón y Aguilar, 1988).

Nuestros primeros estudios con el veneno de esta especie nos permitieron establecer una baja toxicidad sobre invertebrados (crustáceos e insectos), pero una fuerte toxicidad sobre vertebrados (roedores) (Rivera et al., 2004). El interés en estudiar la proteína responsable de la toxicidad en roedores nos motivaron a desarrollar esta investigación con los siguientes objetivos:

- Aislar del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii*, la proteína responsable de la toxicidad en roedores.
- Determinar el peso molecular y naturaleza ácido básica de la toxina.
- Establecer los efectos de la toxina en ratones albinos y
- Determinar si la toxina tiene actividad de fosfolipasa, proteasa, acetilcolinesterasa o actividad inhibidora de acetilcolinesterasa.

2. ANTECEDENTES

Los escorpiones están considerados entre los habitantes más exitosos sobre la tierra. A pesar de no contar con sentidos bien desarrollados, han sobrevivido más de 400 millones de años sin cambios detectables en su morfología; es probable que la habilidad de producir una secreción altamente tóxica sea el determinante importante de este éxito (Gurevitz et al., 2001; Inceoglu et al., 2003).

Los venenos de escorpiones contienen varios componentes proteicos activos, pero en contraste a los venenos de serpientes, son pobres en enzimas. La mayoría de estas proteínas son toxinas de bajo peso molecular que actúan de forma selectiva sobre canales iónicos y la liberación de mediadores químicos del sistema nervioso autónomo lo que permite la estimulación de muchos órganos y sistemas (Cunha - Melo y De Andrade, 2000).

En general las toxinas aisladas de veneno de escorpiones tienen acción sobre roedores, crustáceos e insectos y la mayoría de ellas son toxinas que bloquean canales de sodio del nervio (responsable de la formación del potencial de acción), o el canal receptor de acetilcolina (responsable de transferir los impulsos nerviosos de la célula nerviosa al músculo), o los canales de potasio de la célula nerviosa (los cuales terminan el impulso nervioso) (García et al., 2001; Dolowy, 2001).

Basados en su peso molecular y actividad farmacológica, estas toxinas son clasificadas en:

Toxinas de cadena corta (30 - 40 aminoácidos) con 3 - 4 puentes disulfuro, las cuales afectan principalmente canales de K^+ . Son las mejores estudiadas debido a que los canales de potasio son una superfamilia muy diversa con más de 80 miembros y que juegan roles cruciales en muchos procesos fisiológicos.

Toxinas de cadena larga (60 - 70 aminoácidos) con 4 puentes disulfuro, las cuales tienen un efecto sobre canales de Na^+ . Estas toxinas tienen una estructura secundaria altamente conservada que incluye un motivo α hélice y 3 hojas β plegadas (figura 2). De acuerdo a su selectividad de especies las toxinas específicas para canales de sodio han sido divididas en toxinas para mamíferos e insectos.

Dependiendo de su afinidad de enlace y propiedades electrofisiológicas, las toxinas para mamíferos son subclasificadas en:

Toxinas α , las cuales prolongan el potencial de acción al reducir o bloquear el mecanismo de inactivación del canal de sodio; se han aislado principalmente de venenos de escorpiones del “viejo mundo”.

Toxinas β , las cuales también prolongan el potencial de acción ya que activan el canal de sodio; se han obtenido de venenos de escorpiones americanos.

Por otro lado, las toxinas específicas para insectos son subdivididas en toxinas excitatorias y depresantes.

Además de los dos grupos principales, otras toxinas afectan canales de Ca^{2+} y Cl^- (Wudayagiri et al., 2001).

Los efectos inducidos por las toxinas durante el envenenamiento también pueden ser explicados sobre la base de la liberación de neurotransmisores a nivel de la sinapsis. Esta liberación es aparentemente una consecuencia de la acción excitatoria de las toxinas sobre las membranas axonales (Dittrich et al., 2002; Corrêa et al., 1997).

Los estudios relacionados al aislamiento y caracterización bioquímica de toxinas de veneno de escorpión son importantes para el diseño y producción de anti-venenos, especialmente en países como Brasil y México, donde el accidente escorpiónico constituye un problema de salud pública (Inceoglu et al., 2001; Gómez et al., 2002); Igualmente estos estudios son importantes porque algunas toxinas son útiles para identificar y entender la fisiología de distintos tipos de canales iónicos. Asimismo, algunas toxinas son selectivas para insectos, lo que podría ser usado en

el desarrollo de bioinsecticidas como una alternativa segura al amplio espectro de insecticidas químicos (Wudayagiri et al., 2001). Finalmente, se han descrito algunas toxinas con actividades antimicrobianas con aplicación en el control terapéutico de bacterias patógenas (Corzo et al., 2001).

Nuestro país cuenta con por lo menos 41 especies de escorpiones, pero es muy probable que existan más. Los primeros estudios iniciados hace más de 35 años (Aguilar, 1968; Aguilar y Meneses, 1970) permitieron identificar hasta 31 especies, incluyendo especies del género *Tityus*, las cuales son altamente peligrosas para el hombre (Maury, 1978; Francke, 1977), pero más recientemente, Acosta y Ochoa han descrito nuevas especies para nuestro país (Acosta y Ochoa, 2000, 2001; Ochoa y Acosta, 2002).

En relación al estudio de los venenos de nuestros escorpiones, los primeros trabajos sólo fueron realizados con los venenos crudos de algunas especies especialmente *Hadruidoidea lunatus*, y estuvieron orientados a conocer sus efectos. Sin embargo, en lo que respecta al aislamiento y estudio de los principios activos de los venenos, el primer reporte que se tiene, en nuestro medio, es recién del año 2002 (Escobar et al., 2002). En este sentido el conocimiento de nuestra biodiversidad y recursos es limitado.

El “escorpión de los arenales”, *Brachistosternus ehrenbergii* es uno de los más frecuentes en nuestra vertiente occidental; la notable densidad poblacional de este quelicerado motivó, allá por la década de los 80, la realización de algunos estudios para conocer su peligrosidad con relación al hombre y evaluar su acción tóxica en animales de laboratorio. Esto permitió evidenciar una serie de alteraciones neuromusculares que producían la muerte de los roedores; sin embargo, la toxina responsable de estas alteraciones no fue identificada (Calderón, 1982; Calderón y Aguilar, 1988).

Durante el año pasado hemos realizado algunos estudios preliminares sobre la separación cromatográfica de las proteínas de este veneno habiendo determinado que el veneno tiene débil actividad sobre insectos y crustáceos pero una fuerte

acción sobre roedores (Rivera et al., 2004). Como parte del interés en estudiar los venenos de la fauna escorpiónica del Perú, este trabajo se enfoca en el estudio del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* con la finalidad de caracterizar de manera especial la proteína responsable de la toxicidad en roedores.

La purificación y caracterización de esta clase de toxinas, son importantes no sólo para poder determinar su mecanismo de acción, sino porque pueden ser utilizadas como herramientas en estudios sobre sistema nervioso e interferir adecuadamente en procesos fisiopatológicos, dado que muchas patologías en el sistema nervioso de mamíferos como Alzheimer, Corea de Huntington y epilepsia tienen por etiología disturbios en el funcionamiento de receptores y canales iónicos (Araujo, 1999).

A la toxina estudiada en este trabajo, la hemos denominado Be1, de acuerdo a la nomenclatura de Becerril (Becerril et al., 1997), quien ha propuesto denominar a cada toxina por las iniciales del nombre científico (Be de *Brachistosternus ehrenbergii*) seguido por un número específico de la toxina (en este caso 1, por ser la primera toxina aislada y caracterizada en este veneno).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Biológico.

Se colectaron 49 escorpiones de la especie *Brachistosternus ehrenbergii* de ambos sexos en las cercanías de la Laguna Encantada (Huacho), y en el laboratorio, fueron mantenidos individualmente en cubetas plásticas de 10 x 6 x 10 cm con agua *ad libitum* y alimento proporcionado quincenalmente (cucarachas) (figura 3).

Ratones albinos Balb/c de 23 g de peso fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

3.2 Equipos.

Balanza analítica Ohaus
Potenciómetro Corning pH-25
Vortex Matheson Scientific
Centrífuga Sorvall
Equipo de cromatografía en columna
Espectrofotómetro UNICO UV-2100
Equipo de electroforesis en placa
Fuente de poder Techward
Congeladora MIRAY
Refrigeradora INRESA.

3.3 Obtención del Veneno.

El veneno, obtenido por estimulación eléctrica con 22 voltios, fue recolectado con microcapilares y depositado en una placa de Petri. Luego fue desecado, pesado y conservado en congelación hasta su uso. Por cada animal en promedio se obtuvo de 0,8 a 1,0 mg de veneno (figura 4).

3.4 Purificación de la Toxina.

El veneno desecado (49,9 mg) fue disuelto en 2,2 ml de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7 con ayuda de un vortex durante 15 minutos, y el material insoluble fue removido 3 veces por centrifugación a 5000 rpm por 20 minutos.

El sobrenadante (1,7 ml) se aplicó a una columna cromatográfica de intercambio catiónico CM-Sephadex C-25 (16 x 1,1 cm) calibrada con el mismo buffer, las proteínas retenidas en el gel fueron eluidas con el buffer conteniendo NaCl 0,25 M y NaCl 0,6 M (Escobar et al., 2002). Fracciones de 2 ml fueron colectadas y leídas en un espectrofotómetro a 280 nm.

Para verificar la presencia de Be1, 0,1 ml de cada fracción fue inoculada intraperitonealmente en ratones albinos de 23 g de peso.

3.5 Cuantificación de Proteína.

El contenido proteico fue determinado por el método de Lowry et al. (1951).

La mezcla de reacción conteniendo 0,45 ml de agua bidestilada, 0,05 ml de muestra y 2 ml de solución alcalina (4 % Carbonato de sodio, 2 % Sulfato de cobre, 4 % Tartrato de sodio y potasio, en una proporción 100 : 1 : 1), se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 0,5 ml del reactivo Folin Ciocalteus 1 : 6 y se incubó nuevamente por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 750 nm y la concentración de proteína se determinó usando albúmina bovina (5 mg/ml) como proteína estándar.

3.6 Determinación de la Pureza.

La pureza de Be1 fue determinada por 2 métodos electroforéticos:

1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas para proteínas básicas (Reisfeld et al., 1962).- Para la preparación del gel de resolución se mezcló 1,2 ml de agua bidestilada, 1,2 ml de solución de acrilamida (30 % acrilamida, 0,8 %

bis-acrilamida), 0,5 ml de buffer de gel de resolución (40 % KOH 1N, 17,2 % CH₃COOH; pH 4,3), 80 µl de tetrametilamonio (TEMED) y 60 µl de persulfato de amonio (APS) al 20 %, con una concentración final de acrilamida de 12 %; esta mezcla se vertió inmediatamente en la cámara de electroforesis, se cubrió con 90 µl de agua bidestilada y se dejó polimerizar por 20 minutos aproximadamente

Luego, se eliminó la capa de agua y se aplicó el gel de stacking, el cual se preparó con 1 ml de agua bidestilada, 0,3 ml de solución de acrilamida, 0,2 ml de buffer de gel de stacking (48 % KOH 1 N, 28 % CH₃COOH; pH 6,7), 10 µl de TEMED y 20 µl de APS al 20 %, con una concentración final de acrilamida de 6 %. Se colocó el peine y se dejó gelificar por 10 minutos aproximadamente.

Las fracciones correspondientes a Be1 fueron tratadas por separado con buffer de muestra (25 % buffer de gel de stacking, 10 % glicerol) en una proporción de 2 : 1 y luego se aplicaron al gel. Como indicador de la corrida, en uno de los carriles se colocó 0,1 ml de buffer de muestra con fucsina básica. La electroforesis se hizo a 77 voltios por 7 horas, luego de lo cual el gel fue teñido con azul brillante de coomassie 0,1 % (disueltos en solución decolorante) durante 5 minutos. Finalmente se lavó varias veces con solución decolorante (35,3 % metanol, 11,8 % ácido acético) hasta visualizar las bandas de proteína (Anexo B).

2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (Schägger y von Jagow, 1987).- El gel de resolución se preparó a partir de 0,7 ml de agua bidestilada, 1 ml de solución de acrilamida (48 % acrilamida, 1,5 % bis-acrilamida), 1 ml de buffer de gel (36,3 % Tris, 0,3 % SDS; pH 8,45), 0,3 ml de glicerol, 5 µl de TEMED y 10 µl de APS al 20 %, con una concentración final de acrilamida de 16 %. Esta mezcla se vertió en la cámara de electroforesis, seguido inmediatamente por el gel espaciador el cual contenía 0,38 ml de agua bidestilada, 0,16 ml de solución de acrilamida, 0,26 ml de buffer de gel, 5 µl de TEMED y 5 µl de APS al 20 %, con una concentración final de acrilamida de 9,6 %, luego de lo cual se cubrió con 20 µl de agua bidestilada.

La polimerización se completó en aproximadamente 20 minutos y luego se eliminó la capa de agua y se aplicó el gel de stacking que contenía 0,5 ml de agua bidestilada, 0,12 ml de solución de acrilamida, 0,3 ml de buffer de gel, 5 µl de TEMED y 5 µl de APS al 20 %, con una concentración final de acrilamida de 6,4 %. Posteriormente, se colocó el peine y se dejó gelificar por 10 minutos aproximadamente.

La toxina Be1, el veneno crudo y el estándar (5 µl de citocromo c y 20 µl de aprotinina), fueron tratados por separado con buffer de muestra (12 % de glicerol, 2 % de mercaptoetanol, 5 % de Tris 1 M, 40 % de SDS y 5 % de azul brillante de coomassie) y calentados por 5 minutos. La electroforesis se hizo a 77 voltios por 2 horas.

El gel fue colocado por 15 minutos en solución fijadora (50 % de metanol y 10 % de ácido acético) luego se tiñó con azul brillante de coomassie 0,1 % por 10 minutos y finalmente se aplicó varias veces solución decolorante (75 % de metanol y 25 % de ácido acético) hasta visualizar las bandas de proteína (Anexo C).

3.7 Determinación del Peso Molecular.

El peso molecular de Be1 fue determinado de la PAGE-SDS según el método de Schägger y von Jagow (1987), usando citocromo c (12,4 kDa) y aprotinina (6 kDa) como proteínas estándares. Se determinó la ecuación por regresión lineal, entre la distancia (cm) recorrida por cada estándar y el log de su peso molecular, y en ella se calculó el peso molecular de la muestra problema, según la distancia recorrida.

3.8 Ensayos de Toxicidad.

La toxicidad *in vivo* fue probada sobre ratones albinos de 23 g de peso por inoculación intraperitoneal e intramuscular de 0,1 ml de la toxina, tomando en consideración el tiempo de aparición de los signos, el tipo de envenenamiento (local y/o sistémico) y la muerte del roedor.

3.9 Actividad de Fosfolipasa.

Para detectar la actividad de fosfolipasa se midió la disminución de la absorbancia a 920 nm de una emulsión de yema de huevo al ser incubada por 2 minutos con Be1 o con el veneno crudo. Para ello se emplearon 3 ml de una emulsión de yema de huevo (100 μ l de yema de huevo en 80 ml de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7) y 20 μ l de Be1 (12,4 μ g) ó 10 μ l de veneno crudo (86,62 μ g) (Marinetti, 1965). La actividad específica fue expresada como la disminución en la absorbancia a 920 nm por minuto por mg de proteína.

3.10 Actividad de Proteasa.

Esta actividad fue ensayada usando como sustrato azocoll. La mezcla de reacción contenía 0,2 ml de azocoll (12,5 mg/ml), 0,2 ml de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7 y 100 μ l de Be1 (6,6 μ g) ó 5 μ l de veneno crudo (43,31 μ g). Luego de incubar a 37°C por 30 minutos se midió la absorbancia a 520 nm (Chavira et al., 1984). La actividad específica fue expresada como el incremento en la absorbancia a 520 nm por minuto por mg de proteína.

3.11 Ensayo de Acetilcolinesterasa.

Se midió la probable actividad de acetilcolinesterasa (AChE) de Be1 y del veneno crudo utilizando como sustrato acetiltiocolina. Cuando una proteína tiene actividad de AChE hidroliza la acetiltiocolina y produce acetato y tiocolina, éste último reacciona con ditiobisnitrobenzoato y forma un complejo de color amarillo el cual es medido espectrofotométricamente a 412 nm (Ellman et al., 1961).

La mezcla de reacción conteniendo 2,83 ml de buffer fosfato 0,1 M, pH 8, 0,1 ml de ditiobisnitrobenzoato 0,01 M, 20 μ l de acetiltiocolina yodada 0,075 M y 50 μ l de Be1 o veneno crudo, fue incubada a 37°C por 30 minutos y luego se midió la absorbancia a 412 nm (Anexo D).

Como control positivo de la actividad de acetilcolinesterasa, se utilizó 50 μ l de un homogenizado de tejido cerebral de ratón, para lo cual se decapitó un ratón albino de 38 g y el cerebro extirpado (0,46 g), fue homogenizado en 1,5 ml de buffer fosfato 0,1 M pH 8. El material insoluble fue eliminado por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante (1 ml) se diluyó con el mismo buffer hasta 76 mg/ml. La actividad específica fue expresada en μ moles de producto liberado (5-tio-2-nitrobenzoato) por minuto por mg de proteína considerando un coeficiente de extinción molar de 14150.

3.11 Inhibición de Acetilcolinesterasa.

El homogenizado de cerebro con actividad positiva de AChE fue incubado por separado con Be1 y veneno crudo (proporción 1 : 1) a 37°C durante 15 minutos. Luego se midió la actividad de acetilcolinesterasa con 50 μ l de cada incubado, de acuerdo al protocolo anteriormente indicado (Anexo D).

4. RESULTADOS

4.1 Purificación de la Toxina Be1.

Luego de pasar el veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* por la columna de CM-Sephadex C-25 se obtuvo un perfil cromatográfico con 6 picos de proteína; los picos I y II eluyeron directamente con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7, mientras que los picos III, IV y V eluyeron al adicionar NaCl 0,25 M, el último pico eluyó al emplear NaCl 0,6 M (figura 5). Cuando las fracciones colectadas fueron inoculadas en los roedores, para evaluar su toxicidad, sólo las fracciones del último pico mostraron dicho efecto. La toxina Be1 mostró corresponder al 8,1 % de la proteína del veneno total.

Es importante señalar que este perfil cromatográfico se mantiene hasta cuando el veneno proviene de una tercera extracción de los animales en cautiverio, pues al emplear veneno de extracciones adicionales, los picos V y VI disminuyen considerablemente.

La pureza de Be1 fue confirmada por 2 métodos electroforéticos, uno en condiciones nativas y el otro en condiciones denaturantes y en ambos casos Be1 correspondió a una sola banda proteica (figuras 6 y 7).

4.2 Determinación del Peso Molecular.

La electroforesis en condiciones denaturantes permitió determinar que el peso molecular de Be1 es 6,3 kDa y que se trata de una toxina de una sola cadena polipeptídica (figura 7).

4.2 Ensayos de Toxicidad.

Los ratones inyectados por vía intraperitoneal con Be1 (62 µg) mostraron a los 6 minutos, aproximadamente, signos de autolimpieza bruscos y continuos

(lamidas y mordidas de garras, pelos, genitales, cabeza y cuerpo), acompañado de hipersecreción salival; a los 10 minutos contraen las patas traseras seguido por convulsiones; a los 30 minutos tienen dificultades para respirar, abren constantemente la boca para tragar aire y arrastran las patas traseras; a los 40 minutos quedan inmobilizados, con los ojos dilatados, miccionan y secretan saliva en forma exagerada. Aproximadamente 1 hora después de la inoculación mueren.

La inoculación por vía intramuscular de Be1 (7,6 μ g) resultó en la contracción inmediata de la extremidad persistiendo en tal condición por más de 30 minutos, también se observaron sobresaltos y cierta irritabilidad en el comportamiento de los ratones.

4.3 Actividad Fosfolipásica y Proteolítica.

Be1 no varió los niveles de absorbancia a 920 nm y 520 nm al ser incubado con la emulsión de yema de huevo y azocoll respectivamente, por tanto Be1 no presenta actividad de fosfolipasa ni de proteasa. Por otro lado en el veneno crudo tampoco se encontró actividad proteolítica pero sí fosfolipásica con una actividad específica de 2,38 (Absorbancia 920 nm /min /mg proteína).

4.4 Ensayo de Acetilcolinesterasa e Inhibición de AChE.

Tanto Be1 como el veneno crudo no mostraron actividad de acetilcolinesterasa, es decir no fueron capaces de hidrolizar acetiltiocolina. Igualmente no mostraron actividad inhibidora de acetilcolinesterasa ya que no fueron capaces de bloquear la actividad de acetilcolinesterasa mostrada por el tejido cerebral.

5. FIGURAS



Figura 1. *Brachistosternus ehrenbergii* “escorpión de los arenales” en posición de ataque.

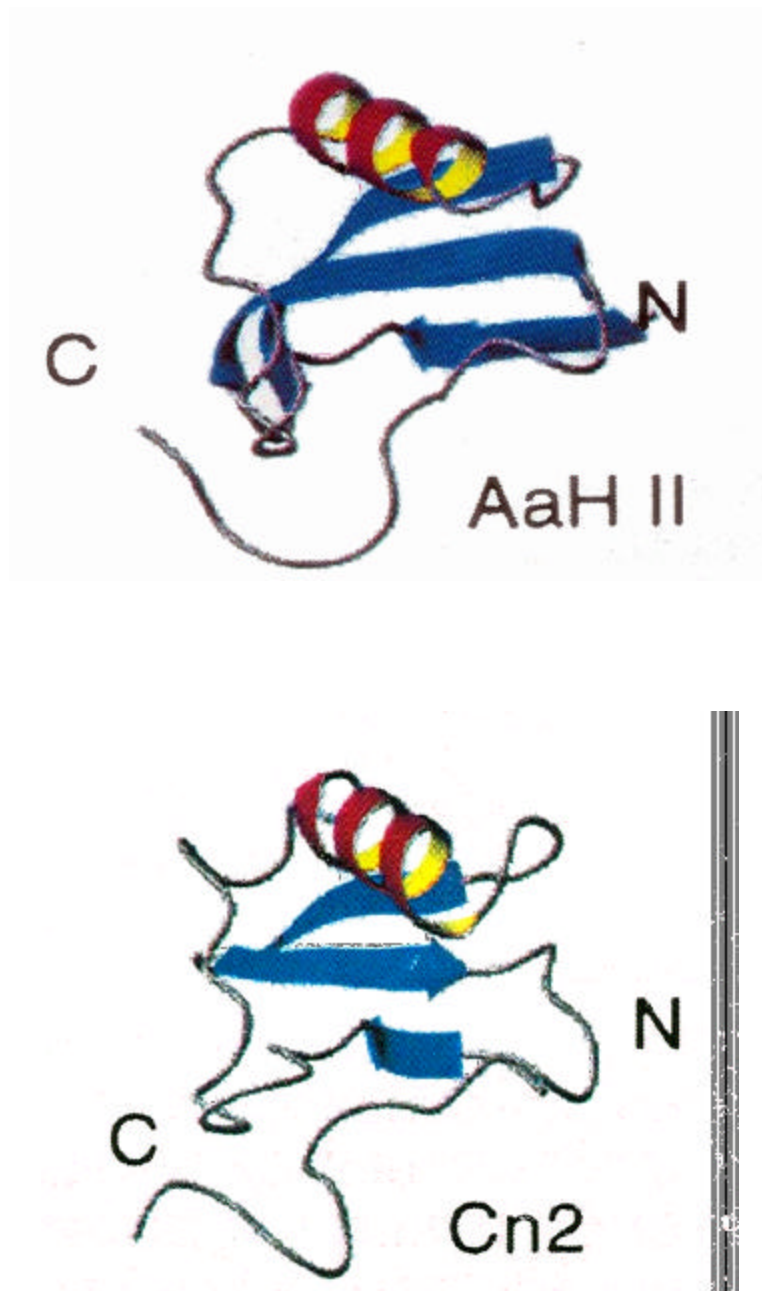


Figura 2. Modelo estructural de toxinas de venenos de escorpión que afectan canales de sodio. La gran mayoría de estas toxinas tienen un patrón altamente conservado constituido por una α hélice y tres hojas β plegadas. AaHIII: Toxina α de *Androctonus australis* Hector. Cn2: Toxina β del escorpión mexicano *Centruroides noxius*. Fuente: Possani et al., 1999.



Figura 3. Condiciones de mantenimiento en el laboratorio. Cubetas plásticas de 10 x 6 x 10 cm cada una contiene un espécimen de *Brachistosternus ehrenbergii*.



Figura 4. Extracción del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* por estimulación eléctrica (22 voltios). El animal fue previamente sujetado tal como se muestra en la figura y el veneno fue colectado con la ayuda de un microcapilar.

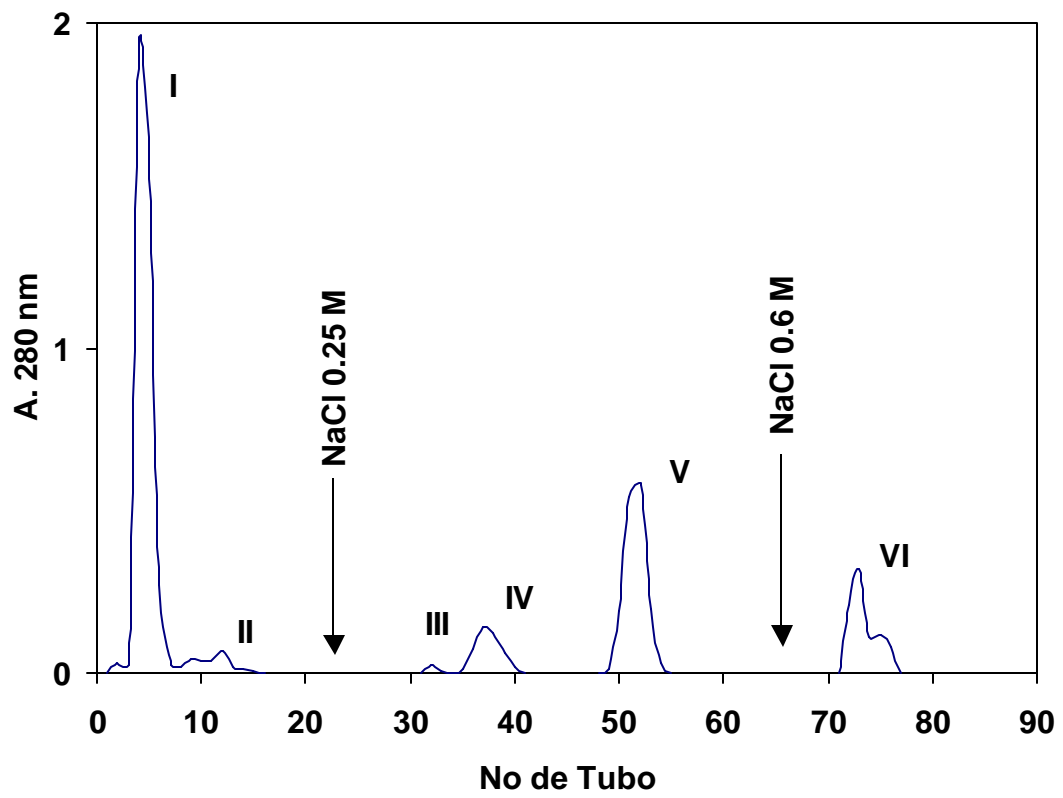


Figura 5. Perfil Cromatográfico del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii*

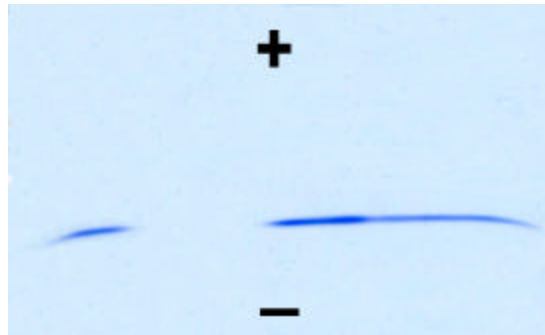


Figura 6. Patrón electroforético de Be1 en condiciones nativas. Be 1 mostró una sola banda proteica con migración hacia el cátodo.

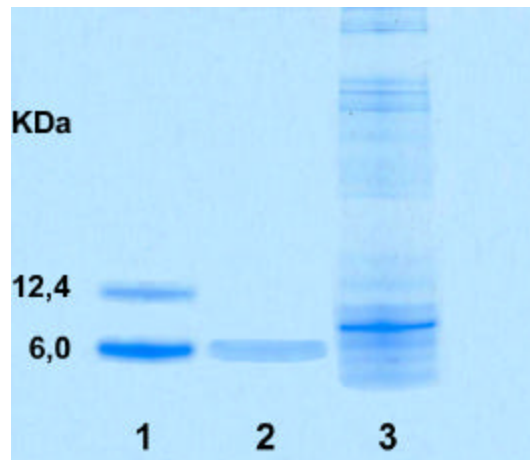


Figura 7. Electroforesis en condiciones denaturantes con SDS. En el carril 1, se pueden ver los estándares de peso molecular: citocromo c (12,4 kDa) y aprotinina (6 kDa), mientras que en el carril 2 aparece Be 1 (6,3 kDa). Finalmente en el carril 3 se muestra el patrón electroforético del veneno crudo de *Brachistosternus ehrenbergii*.

6. DISCUSIÓN

De acuerdo a lo mostrado en la figura 5, cuando el veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* se pasó por la columna de CM-Sephadex C-25 fue separado en seis picos de proteína, de los cuales el último mostró corresponder a la toxina Be1, es decir la toxina específica para ratones albinos. Como puede verse, Be1 se unió fuertemente con el gel y sólo se separó después de emplear NaCl 0,6 M en el buffer de elución. Esto demuestra que a pH 7, la toxina tiene una fuerte carga positiva que le permite interactuar con la carga negativa del grupo carboximetil del gel ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{COO}^-$) y por lo tanto el pI de Be1 es mayor que 7 tratándose así de una proteína básica. Las neurotoxinas de veneno de escorpión se caracterizan en general, por ser proteínas básicas de bajo peso molecular, y esta naturaleza básica se aprovecha para separarlas mediante cromatografía de intercambio catiónico a pH neutro (Araujo, 2003).

Así por ejemplo, del veneno del escorpión mexicano *Centruroides suffusus suffusus* se han aislado hasta 7 toxinas (Cssl - CssVII) con pI superiores a 9 (Martin et al., 1967), y del escorpión *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* se han separado 5 toxinas denominadas LqqI, LqqII, LqqIII, LqqIV y LqqV (Miranda et al., 1970),

Be1 representó el 8.1 % de la proteína total del veneno, valor que está por debajo al reportado para otras toxinas letales para roedores como Ts γ que representa el 20 % del veneno de *Tityus serrulatus*, o Birtoxina que representa alrededor del 12 – 14 % del veneno de *Parabuthus transvaalicus* (Corrêa et al., 1997; Inceoglu et al., 2001).

La pureza de Be1 se estableció mediante 2 métodos electroforéticos, uno de ellos en condiciones nativas y específico para proteínas básicas (método de Reisfeld), y el otro en condiciones denaturantes y de gran resolución para polipéptidos con pesos moleculares por debajo de 14 kDa (método de Schägger y von Jagow). En ambos casos, Be 1 mostró una sola banda homogénea de proteína,

lo cual demostró su pureza y lo adecuado del único paso cromatográfico realizado para la separación de esta toxina.

Además, la PAGE-SDS según el método de Schägger y von Jagow, permitió determinar que el peso molecular de Be1 es 6,3 kDa, y que se trata de una toxina de una sola cadena polipeptídica. Muchas otras toxinas aisladas de venenos de escorpión se caracterizan también por ser de bajo peso molecular y de una sola cadena. Así por ejemplo, la toxina BmKIV del escorpión chino *Buthus martensi* Karsch es una cadena polipeptídica simple de 7,2 kDa (Wu et al., 1999), Bot XIII del escorpión africano *Buthus occitanus tunetanus* pesa 6,3 kDa (Martin y Rochat, 1984) y Birtoxina tiene un peso molecular de 6,5 kDa (Inceoglu et al., 2001).

En cuanto al efecto tóxico de Be1, en este trabajo se ha determinado que la inoculación intraperitoneal en ratones albinos produce hipersecreción salival, convulsiones, dificultad en la respiración, arrastre de las extremidades posteriores, inmovilización y muerte. Cabe mencionar que los síntomas observados concuerdan en su mayoría con los reportados por primera vez en 1982 para el veneno crudo de esta especie (Calderón, 1982).

Otras toxinas selectivas para mamíferos, también producen efectos similares a Be1. Así por ejemplo BmKIV produce poliuria, disnea, reducción de movimientos y muerte en roedores (Wu et al., 1999); las 2 toxinas principales de *Tityus serrulatus*, Tsy y tityustoxina inducen también hipersecreción salival, disturbios respiratorios y muerte de los roedores (Cunha-Melo y De Andrade 2000).

La inoculación por vía intramuscular de Be1 se manifestó por la contracción de la extremidad inoculada, sobresaltos e irritabilidad. HI3 una miotoxina del veneno de *Hadruides lunatus* también produce contracción y el arrastre de la pata inoculada durante el desplazamiento del animal (Escobar et al., 2002).

Cabe señalar que tanto el veneno crudo como Be1 no tienen actividad proteolítica sobre azocoll, ni actividad de acetilcolinesterasa e inhibidora de

acetilcolinesterasa. Asimismo, Be1 no tiene actividad de fosfolipasa, aunque el veneno crudo si presenta dicha actividad.

En este sentido el veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* es similar al de *Tityus serrulatus* y *Tityus bahiensis*, los cuales tampoco tienen ninguna de las actividades enzimáticas aquí probadas (Diniz y Gonçalves, 1960). Sin embargo el veneno de *Palamneous gravimanus* o *Buthus tamulus* si presenta actividad proteolítica (Master et al., 1963), mientras que el veneno de *Heterometrus scaber*, contiene actividad de acetilcolinesterasa. Asimismo los venenos de *Buthus minax* y *Heterometrus fulvipes*, tienen actividad inhibidora de acetilcolinesterasa aunque aún no se han purificado los inhibidores (Nair y Kurup, 1975; Zavaleta, 1983; Narayana et al., 1984).

Las características bioquímicas encontradas para Be1, es decir su letalidad y especificidad en roedores, así como su bajo peso molecular (6,3 kDa) y la carencia de alguna actividad enzimática, permiten suponer que se trata de una toxina relacionada con la gran familia de proteínas que tienen acción sobre canales de Na⁺ en mamíferos.

Las toxinas de venenos de escorpión que afectan específicamente los canales de Na⁺ de mamíferos, se caracterizan justamente por tener pesos moleculares entre 6 y 8 kDa, así como carecer de actividades enzimáticas y ser muy tóxicas. Estas toxinas pueden ser de dos tipos, según la modificación causada en el canal. Así, tenemos las toxinas tipo α , que son aquellas que retrasan el proceso de inactivación de los canales de sodio; y toxinas tipo β , que son aquellas que abren durante más tiempo a dichos canales, incluso con potenciales de membrana a los cuales ellos normalmente estarían cerrados. En cualquiera de los dos casos, estas toxinas mantienen más tiempo activos a los canales de sodio y así provocan descargas espontáneas y repetitivas de potenciales de acción logrando prolongar la acción de éstos en nervios y músculos (Vatanpour, 2003).

La toxina AaIII de *Androctonus australis* Hector es una α -toxina, mientras que la Cn2 de *Centruroides noxius*, es una β -toxina (Possani et al., 1999).

Es posible que los efectos producidos por Be1 sean producto de su acción sobre canales de sodio, con la consecuente prolongación de los potenciales de acción.

En general, la dieta de los escorpiones está constituida principalmente por insectos los cuales son paralizados por el veneno. Sin embargo en un trabajo previo nosotros hemos encontrado que el veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* tiene poca toxicidad en insectos lo cual indicaría que para la captura de estas presas, el escorpión recurre principalmente a su gran envergadura y grandes quelas, prescindiendo de insectotoxinas específicas (Rivera et al., 2004). Por otro lado la presencia de una fuerte toxina para roedores, como en este trabajo se ha demostrado, permitiría suponer que esta toxina cumple un papel de defensa hacia posibles predadores o incluso que es utilizada por *Brachistosternus ehrenbergii* para procurarse algunos roedores en su dieta. Nosotros en el laboratorio hemos verificado como este escorpión es capaz de atacar y comer crías de roedores, lo cual se relaciona también con algunas descripciones que indican la presencia de este escorpión, en la naturaleza, cerca de galerías de pequeños roedores.

Esta especialización es observada también en el veneno del escorpión sudafricano *Parabuthus transvaalicus* el cual supera los 15 cm de longitud (Inceoglu et al., 2001).

7. CONCLUSIONES

1. Mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25 a pH 7, se ha aislado una toxina del veneno del escorpión *Brachistosternus ehrenbergii* a la que se ha denominado Be1.

2. Be1 constituye el 8,1 % de la proteína total del veneno.

3. La característica más importante de esta nueva proteína es su toxicidad hacia ratones, la que induce serios síntomas de envenenamiento que conllevan a la muerte de estos roedores.

4. La toxina Be1, es una proteína básica, de cadena simple y de 6,3 kDa de peso molecular.

5. Be1 no tiene actividad de fosfolipasa, proteasa, acetilcolinesterasa ni actividad inhibidora de acetilcolinesterasa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 & 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 Scorpionida peruanos. *Anales Científicos Univ. Agraria La Molina*. VI (8) : Enero, Junio Nº 1-2.
- Araujo, M. 1999. Análise neuroetológica e estudo da atividade próconvulsivante e anticonvulsivante in vivo da peçonha bruta da aranha *Parawixia bistrata* em ratos: injeção central e periférica. Dissertação de mestrado apresentada à faculdade de filosofia, ciências e letras de Ribeirão Preto-USP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Universidade de São Paulo.
- Araujo, M. 2003. Efeitos biológicos da peçonha da aranha *Parawixia bistrata* em ratos : isolamento e caracterização química parcial de uma neurotoxina próconvulsivante. Tese apresentada à faculdade de filosofia, ciências e letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Douctor em Ciências. Área : Psicobiologia.
- 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.
- Becerril, B.; Marangoni, S. and Possani, L. 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tytilus*. *Toxicon*. 35 (6) : 821-835.
- Cáceres, I. 1965. Acción del veneno del escorpión *Hadruidoidea lunatus* en animales de laboratorio. Tesis para Bachiller en Ciencias Biológicas. UNMSM.

- Cáceres, I.; Aguilar, P. y Meneses, O. 1972. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. II : Efectos del veneno del “escorpión de los pedregales” en la costa central. Rev. per. Ent. 15 (1) : 38-43.
- Calderón, S. 1982. Dosis mínima letal (DML) del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* (Gervais,1841) (Scorpionida: Bothriuridae) en ratones de laboratorio. Informe del estudio de la Práctica Pre-Profesional para optar el Título de Biólogo. UNMSM.
- Calderón, S. y Aguilar, P. 1988. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. X : Efecto del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* sobre ratones albinos. Rev. per. Ent. 30 : 91-93.
- Castro, G.; Zavaleta, A.; y Castro de la Mata, R. 1981. Variación estacional del veneno de *Hadruroides lunatus* (Koch) (Scorpionida : Vejovidae) y su actividad paralizante sobre *Porcellio laevis* Koch (Crustacea : Isopoda). Rev. per. Ent. 24 (1) : 71-74.
- Chavira, R.; T. Burnett and J. Hageman. 1984. Assaying Proteinases with Azocoll. Anal Biochem. 136 : 446 - 450.
- Corrêa, M.; Sampaio, S.; Lopes, R.; Mancuso, L.; Cunha, O.; Franco, J and Giglio, J. 1997. Biochemical and Histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin Tityustoxin-I. Toxicon. 35(7) : 1053-1067.
- Corzo, G.; Escoubas, P.; Villegas, E.; Barnham, K.; He, W.; Norton, R and Nakajima, T. 2001 Characterization of unique amphipatic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. Biochem. J. 359 : 35-45.
- Cunha-Melo, J. and De Andrade, M. 2000. *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxins as tools for physiological studies. Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the advancement of science. 52 (6) : 377-385.
- Diniz, C. and Gonçalves, J. 1960. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta. 41 : 470-477.
- Dittrich, K.; Ahmed, R. and Ahmed Q. 2002. Cardiac arrest following scorpion envenomation. Annals of Saudi Medicine. 22 (1-2) : 87-90.

- Dolowy, K. 2001. Environmental toxins and ion channels. *Cell. Biol. Mol. Lett.* 6(2A) : 343-347.
- Ellman, G., Courtney, K.; Andres, V. and Featherstone, R. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7 : 88-95.
- 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 (Scorpionida : Vejovidae). *Rev. peru. biol.* 9 (1) : 3-10.
- Escobar, E.; Velásquez, L. y Rivera, C. 2003. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones : Buthidae). *Rev. peru. biol.* 10(2) : 217-220.
- 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, Ying-Duo; Mcmanus, O. and Kaczorowski, G. 2001. Potassium channels: from scorpion venoms to high - resolution structure. *Toxicon.* 39: 739-748.
- Gómez, J.; Otero, R.; Núñez, V.; Saldarriaga, M.; Díaz, A. and Velásquez, M. 2002. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tytilus fuhrmanni* Kraepelin. *MEDUNAB.* 5 (15) : 159-165.
- Gurevitz, M.; Gordon, D.; Ben-Natan, S.; Turkov, M. and Froy, O. 2001. Diversification of neurotoxins by C-tail "wiggling": a scorpion recipe for survival. *The FASEB Journal.* 15 : 1201-1205.
- Inceoglu, B.; Lango, J.; Jing, J.; Chen, L.; Doymaz, F.; Pessah, I. and Bruce, D. 2003. One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. *PNAS.* 100 (3) : 922-927.
- Inceoglu, B.; Lango, J.; Wu, J.; Hawkins, P.; Southern, J. and Hammock, B. 2001. Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae). *European Journal of Biochemistry.* 268 (20) : 5407-5413.

- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Marinetti, G. 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 98 : 554-565.
- Martin, M.; Garcia, L.; El Ayeb, M.; Kopeyan, C.; Bechis, G., Jover, E. and Rochat, H. 1967. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *The Journal of Biological Chemistry.* 282 (10) : 4452-4459.
- Martin, M. and Rochat, H. 1984. Purification of thirteen toxins active on mice from the venom of the north African scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *Toxicon.* 22 (2) : 279-291.
- Master, R.; Srinivasa, S. and Soman, P. 1963. Electrophoretic separation of biologically active constituents of scorpion venoms. *Biochim. Biophys. Acta.* 71 : 422-428.
- Maury, E. 1978. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. VII : Nuevos hallazgos y redescrición de *Brachistosternus andinus*. *Rev. per. Ent.* 21 (1) : 23-26.
- Miranda, F.; Kupeyan, C.; Rochat, C. and Lissitzky, S. 1970. Purification of animal neurotoxins. Isolation and Characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis* Hector, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur. J. Biochem.* 16 : 514-523.
- Nair, R. and Kurup, P. 1975. Investigations on the venom of South Indian scorpion *Heterometrus scaber*. *Biochim Biophys Acta.* 381 (1) : 165-174.
- Narayana, B.; Maniraj, L. and Babu, K. 1984. Impact of scorpion *Heterometrus fulvipes* venom on cholinesterase rhythmicity in the tropical mouse *Mus booduga*. *Indian J. Physiol Pharmacol.* 28 (1) : 47-52.
- Ochoa, J. and Acosta, L. 2002. Two new andean species of *Brachistosternus* Pocock (Scorpiones: Bothriuridae). *Euscorpius occasional publications in Scorpology.* 2 : 1-13.
- Possani, L.; Becerril, B.; Delepierre, M. and Tytgat, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ - channels. *Eur. J. Biochem.* 264 : 287-300.
- Reisfeld, A.; Lewis, J. and Williams, F. 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. XIII Reunión Científica ICBAR. UNMSM.
- Shägger, H. and von Jagow, G. J. 1987. Tricine-Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 : 368-379.
- Vatanpour, H. 2003. Effects of black scorpion *Androctonus crasicuda* venom on striated muscle preparation in vitro. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 17-22.
- Velásquez, L. y Escobar, E. 2004. Purificación y caracterización parcial de una toxina (Hm3) del veneno de *Hadruidoidea mauryi* (Francke y Soleglad, 1980) (Scorpiones, Iuridae). *Rev. peru. biol.* 11 (2) : 153-160.
- Wu, H.; Wu, G.; Huang, X.; He, F. and Jiang, S. 1999. Purification, characterization and structural study of the neuro-peptides from scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Pure Appl. Chem.* 71 (6) : 1157-1162.
- Wudayagiri, R.; Inceoglu, B.; Herrmann, R.; Derbel, M.; Choudary, P. and Hammock, B. 2001. Isolation and characterization of a novel lepidopteran-selective toxin from the venom of South Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*. *BMC Biochemistry.* 2 : 16-23.
- Zavaleta, A. 1983. El veneno del escorpión : Bioquímica y Farmacología. *Boletín de Lima.* (30) : 75-88.
- Zavaleta, A.; Bustamante, E. y Castro de la Mata, R. 1979. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. VIII : Acción del veneno de *Hadruidoidea lunatus* sobre intestino aislado de rata. *Rev. per. Ent.* 22 (1) : 75-81.

ANEXO A.

Data Taxonómica

Phylum : Arthropoda

Sub-Phylum : Chelicerata

Clase : Arachnida

Orden : Scorpiones

Familia : Bothriuridae

Género : Brachistosternus

Especie : *Brachistosternus ehrenbergii* (Gervais, 1841)

ANEXO B.

Método Electroforético de Reisfeld

Preparación de Reactivos:

(1) Solución de Acrilamida.

Acrilamida 6,0 g

Bis-acrilamida 0,16 g

Disolver en agua bidestilada hasta un volumen final de 20 ml, filtrar y guardar.

(2) Buffer de Gel de Resolución.

KOH 1N 12,0 ml

CH₃COOH 4,3 ml

Ajustar a pH 4,3 y completar a 25 ml con agua bidestilada.

(3) Buffer de Gel de Stacking.

KOH 1N 12,0 ml

CH₃COOH 0,7 ml

Ajustar a pH 6,7 y completar a 25 ml con agua bidestilada.

(4) Buffer de Corrida

L-alanina 9,36 g

CH₃COOH 2,4 ml

Ajustar a pH 4,5 y completar a 300 ml con agua bidestilada.

(5) Buffer de Muestra

Buffer de gel de stacking 0,5 ml

Glicerol 0,2 ml

Completar a 2 ml con agua bidestilada.

(6) Solución Decolorante

Metanol 240 ml

Ácido acético 80 ml

Combinar con 680 ml de agua bidestilada

Mantener todos los reactivos en refrigeración después de su preparación.

ANEXO C.
Método Electroforético de Schägger y von Jagow

Preparación de Reactivos.

(1) Solución de Acrilamida.

Acrilamida 12,0 g

Bis-acrilamida 0,375 g

Disolver en agua bidestilada hasta un volumen final de 25 ml, filtrar y guardar.

(2) Buffer de Gel.

Tris 7,26 g

SDS 0,06 g

Completar a 20 ml con agua bidestilada ajustando a pH 8,45

(3) Buffer de Ánodo.

Tris 0,2 M 3,63 g

Completar a 150 ml con agua bidestilada ajustando a pH 8,9

(4) Buffer de Cátodo.

Tris 0,1 M 1,8 g

Tricina 0,1M 2,6 g

SDS 0,1 % 0,15 g

Completar a 150 ml con agua bidestilada ajustando a pH 8,2

(5) Buffer de Muestra.

Glicerol 0,24 ml

Mercaptoetanol 0,04 ml

Tris 1M 0,1 ml

SDS 10 % 0,8 ml

Azul brillante de coomassie 0,1 mg

Completar hasta 2 ml con agua bidestilada.

(6) Solución Fijadora.

Metanol 50 ml

Ácido acético 10 ml

Combinar con 40 ml de agua bidestilada

(7) Solución decolorante.

Metanol 240 ml

Ácido acético 80 ml

Mantener todos los reactivos en refrigeración después de su preparación.

Cálculo del Peso Molecular : Graficar la distancia recorrida a través del gel (cm) vs. log peso molecular (Da), y remplazar los valores en la ecuación de regresión lineal $y = a x + b$

Anexo D.
Ensayos de AChE e Inhibición de AChE

Preparación de Sustancias.

- (1) Buffer fosfato 0,1 M, pH 8.

Solución A

Fosfato de sodio monobásico 0,2 M 0,28 g

Disolver en agua bidestilada hasta un volumen de 10 ml

Solución B

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado 0,2 M 8,6 g

Disolver en agua bidestilada hasta un volumen de 120 ml

Mezclar 5,3 ml de la solución A y 94,7 ml de la solución B

Completar con agua bidestilada hasta un volumen final de 200 ml, mantener en refrigeración después de su preparación.

- (2) Substrato (Debido a que la acetilcolina se degrada rápidamente después de la muerte y es muy difícil sacrificar un animal lo suficientemente rápido para preservar la acetilcolina, se emplea un substrato sintético).

Acetilcolina yodada 0,075 M 0,022 g

Disolver en agua bidestilada hasta un volumen de 1ml, mantener en congelación después de su preparación

- (3) Ditiobisnitrobenzoato 0,01 M 0,020 g

Completar con buffer fosfato (0,1 M, pH 8) hasta 5 ml, mantener en refrigeración después de su preparación.

- (4) Homogenizado de cerebro de ratón de 76 mg/ml, mantener en congelación después de su preparación.