

NOTA CIENTÍFICA

Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais,1841) (Scorpiones : Buthidae)

Separation and identification of some toxins from *Centruroides margaritatus* venom (Gervais,1841) (Scorpiones : Buthidae)

Enrique Escobar¹, Luz Velásquez y Carlos Rivera.

Presentado: 20/11/2003

Aceptado: 12/12/2003

Resumen

Las proteínas del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*, fueron separadas mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25 con buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7, a partir de 28,3 mg de veneno obtenidos de 52 ejemplares adultos capturados en la provincia de Zarumilla, Tumbes, norte del Perú. El perfil cromatográfico mostró la presencia de 9 picos de proteína y los ensayos de toxicidad han permitido identificar tres tipos de toxinas, cada una específica para crustáceos, insectos y roedores, respectivamente. Tanto en el veneno crudo como en las fracciones colectadas, no se encontró actividad de fosfolipasa ni actividad proteolítica. La PAGE-SDS del veneno crudo, muestra la presencia de una banda bastante notoria de aproximadamente 14 KDa, y otras dos muy tenues, de aproximadamente 45KDa, lo cual significa que la mayoría de proteínas de este veneno son de peso molecular igual o menor a 14KDa.

Palabras clave: Veneno de escorpión, *Centruroides*, Tumbes, Perú.

Abstract

Proteins of *Centruroides margaritatus* scorpion venom had been separated by cationic exchange chromatography in CM-Sephadex C-25 with 0,05M ammonium acetate pH 7, from 28,3 mg of venom obtained from 52 adults scorpions caught in Zarumilla, Tumbes, north of Peru. The chromatographic elution showed 9 protein peaks and toxicity assays allowed the identification of three toxins with specific activity on crustacean, insects and rodents, respectively. Both the crude venom and the collected fractions have shown neither phospholipase nor proteolytic activity. The PAGE-SDS of crude venom shows one very notorious protein band of 14 kDa approximately, and another two thin bands of 45 kDa approximately, which imply that the majority of proteins from this venom are of a molecular weight similar or less than 14kDa.

Keywords: scorpion venom, *Centruroides*, Tumbes, Peru.

Los escorpiones son arácnidos que producen un veneno con el que inmovilizan a sus presas, principalmente insectos, pero sólo las especies de la familia Buthidae producen un veneno tóxico para el hombre, por lo que en países como México y Brasil constituyen un problema de salud pública.

De las casi 1500 especies de escorpiones que existen en el mundo, en el Perú se en-

cuentran aproximadamente 40 especies, distribuidas en 6 familias (Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Euscorpiidae, Ischnuridae e Iuridae).

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 en la provincia de Zarumilla - Tumbes (Escobar y Ochoa, 2003).

¹ Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Enrique Escobar Email: eescobarg@unmsm.edu.pe

Actualmente, en nuestro laboratorio se viene trabajando en la separación y caracterización de toxinas de venenos de escorpiones del Perú. Nuestro interés general se centra en determinar la función biológica de los distintos principios activos del veneno, y en particular caracterizar aquellas toxinas específicas para insectos, debido al potencial uso que podrían tener en el desarrollo de bioinsecticidas.

El presente trabajo da a conocer algunos datos preliminares del veneno de *C. margaritatus* y su composición bioquímica.

El veneno de escorpión

El veneno fue obtenido por estimulación eléctrica con 35 voltios, a partir de 52 escorpiones adultos de ambos sexos colectados en la provincia de Zarumilla (Tumbes) durante el mes de enero de 2003. Una vez extraído el veneno fue desecado y posteriormente se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

Separación de las proteínas del veneno

Se obtuvieron un total de 28,3 mg de veneno los que fueron disueltos en 2 mL de buffer acetato de amonio 0,05 M, pH 7 y para eliminar los restos insolubles se centrifugó dos veces a 4000 rpm durante 15 minutos. Con la finalidad de separar los componentes proteicos del veneno, el sobrenadante fue aplicado a una columna de CM-Sephadex C-25 (17 mL) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M, pH 7. Las proteínas retenidas fueron eluidas con el mismo buffer conteniendo NaCl 0,25 M y 0,6 M. La cantidad de proteína fue determinada de acuerdo al método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Ensayos de toxicidad

Se inoculó 10 μ L de veneno crudo (28 μ g) o de las fracciones colectadas, en la cavidad celómica de *Grillus* sp. y se evaluó la parálisis producida durante el primer minuto después de la inoculación. Asimismo en *Porcellio laevis*, se inoculó 10 μ L de veneno crudo (28 μ g) o de las fracciones colectadas, en la cavidad celómica a la altura del tercer segmento dorsal. La parálisis producida fue evaluada en

el primer minuto después de la inoculación. Finalmente, ratones albinos de 20 g de peso fueron inoculados intraperitonealmente con 100 μ L de veneno crudo (28 μ g) o de las fracciones colectadas, e inmediatamente se evaluaron los efectos tóxicos.

Actividad de fosfolipasa y proteolítica

La actividad de fosfolipasa se midió sobre una emulsión de yema de huevo de acuerdo al método de Marinetti, el cual se basa en que la hidrólisis de los fosfolípidos genera productos más solubles, con la consecuente disminución de la absorbancia de la emulsión a 920 nm (Marinetti, 1965). La actividad proteolítica se ensayó sobre azocoll, el cual es un sustrato poco soluble hecho a base de colágeno con un grupo *azo* acoplado covalentemente. La acción proteolítica sobre este sustrato libera el grupo *azo*, el cual se solubiliza con el consiguiente incremento en la absorbancia a 450 nm (Chavira et al., 1984).

Los resultados obtenidos durante la extracción de veneno, mostraron que cada ejemplar libera aproximadamente 15 μ L de veneno, y que de un total de 52 escorpiones se pudo obtener 28,3 mg de peso total de veneno. De acuerdo a esto, la cantidad aproximada de veneno por ejemplar es de 540 μ g y la concentración de veneno por ejemplar es 36 μ g/ μ L.

La cantidad de proteína, estimada por el método de Lowry, permitió determinar que el veneno crudo contiene 81 % de proteína, y que por lo tanto la concentración de proteína en el veneno es de 29,1 μ g/ μ L por ejemplar. En general la mayoría de venenos de escorpión tiene entre 70 y 90% de proteína.

Luego de pasar el veneno por la columna de CM-Sephadex C-25, se obtuvieron en total 9 picos principales de proteína (Figura 1).

Los ensayos de toxicidad mostraron que el veneno de *C. margaritatus* contiene toxinas para crustáceos, insectos y roedores. Al menos 2 proteínas son tóxicas a *P. laevis* y están asociadas a los picos IV y V del perfil cromatográfico, mientras que una insectotoxina

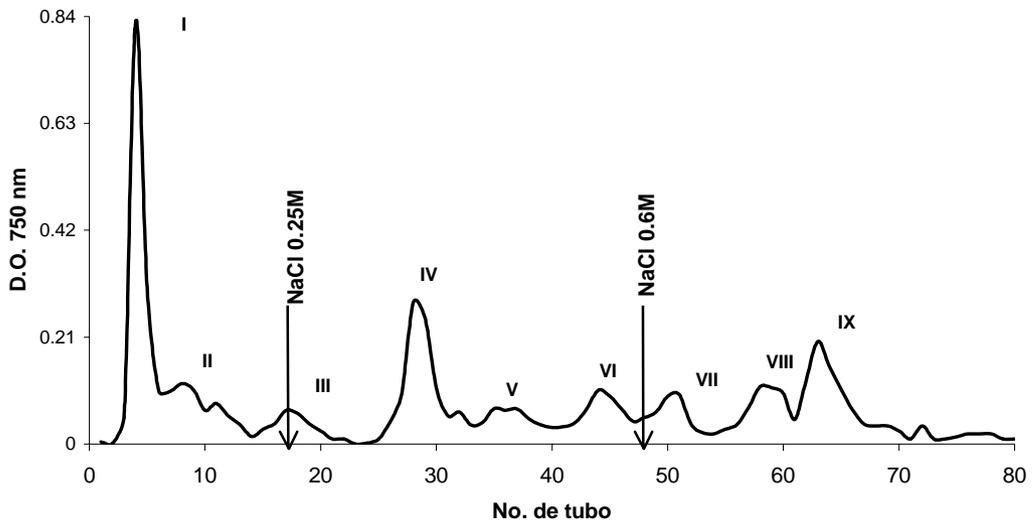


Figura 1. Perfil cromatográfico del veneno de *C. margaritatus* en CM-Sephadex C-25.- Los picos IV y V mostraron toxicidad sobre *P. laevis*, mientras que la toxicidad sobre insectos y roedores estuvo asociada al pico VI y IX respectivamente.

está ligada al pico VI. Finalmente, el último pico obtenido mostró toxicidad sobre roedores. En general las toxinas de venenos de escorpión son proteínas capaces de unirse principalmente a canales de sodio, potasio o calcio, afectando de manera específica el sistema nervioso de insectos, crustáceos y roedores (Possani et al., 1999).

Particularmente, la insectotoxina aislada está siendo objeto de un estudio más detallado en nuestro laboratorio.

El análisis electroforético en condiciones denaturantes con SDS mostró la presencia de 3 bandas en el veneno crudo, una de las cuales migró alrededor de la proteína estándar de 14 kDa. Esta banda es bastante notoria y en realidad aparece como una mancha, mientras que las otras dos, de mayor peso molecular son muy tenues (Figura 2). Este resultado nos indica que la mayoría de proteínas del veneno de *C. margaritatus* son de bajo peso molecular (menor de 14kDa).

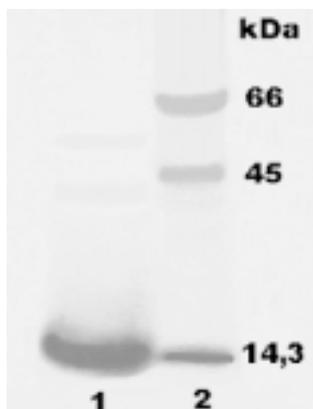


Figura 2. PAGE-SDS del veneno de *C. margaritatus*. En el carril 1 se puede observar la presencia de tres bandas correspondientes al veneno crudo, mientras que el carril 2 corresponde al patrón electroforético de las proteínas estándares albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

Por otro lado, tanto el veneno crudo como las fracciones colectadas no mostraron actividad de fosfolipasa ni actividad proteolítica. La falta de actividad de fosfolipasa en este veneno contrasta con lo que hemos encontrado por ejemplo en el veneno de *Hadruioides lunatus*, el cual si posee una marcada actividad de esta enzima (Escobar et al., 2002); sin embargo la ausencia de actividad proteolítica es común a estos y muchos otros venenos, lo cual está de acuerdo con el hecho de que en general los venenos de escorpiones no participan en la digestión proteolítica de la presa.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Doctor José Ochoa del Museo de Historia Natural de la Universidad San Antonio Abad del Cuzco, por la identificación de los especímenes.

Literatura citada

- Chavira, R.; T. Burnett & J. Hageman. 1984. Highly Efficient and Simple Methods for the Preparation of Peroxidase and Active Peroxidase - Antibody Conjugates for Enzyme Immunoassays. *Anal Biochem.* 136: 446-450.
- Escobar, E. y J. Ochoa. 2003. Confirmación de la presencia de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae) en el Perú. Libro de resúmenes XII Reunión Científica ICBAR. UNMSM.
- Escobar, E.; C. Rivera, L. Tincopa y D. Rivera. 2002. Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* KOCH, 1867 (Scorpionida : Vejovidae). *Rev. Peru. Biol.* 9 (1) : 3-10.
- Lowry O.; N. Rosebrough, A. Farr & R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Marinetti, G. 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*. 98 : 554-565.
- Possani, L.; B. Becerril, M. Delepierre & J. Tytgat. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ - channels. *Eur. J. Biochem.* 264 : 287-300.