

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Fundada en 1551

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis

Digitales UNMSM

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA MIOTOXINA (HM3)
DEL VENENO DEL ESCORPIÓN *hadruoides mauryi* FRANCKE Y SOLEGLAD,
1980 (SCORPIONES: IURIDAE)”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Mención en Genética

AUTOR

LUZ DORA VELÁSQUEZ RAMOS

**LIMA – PERÚ
2003**

La presente investigación contó con el apoyo financiero del Consejo Superior de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Proyecto 031001211)

A mi abuela Victoria por ser el motivo de inspiración para poder superarme. A mis padres por su esfuerzo y sacrificio, durante toda mi vida profesional y a mi tía Dora por su confianza y apoyo invaluable

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 y amigo Mg. Enrique Escobar quien me devolvió la confianza, al darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, con disciplina, constancia responsabilidad y por sus enseñanzas, y sobre todo por compartir su tiempo conmigo, poniendo la dosis de comicidad en los momentos más trágicos en el laboratorio.

El jurado integrado por los profesores Carmen Pantigoso, Fanny Lazo y Ruth García, por sus críticas, correcciones oportunas y completa disposición en la evaluación del trabajo.

Los profesores César Córdova, Ruth García Débora Alvarado por su apoyo con el préstamo de algunos equipos. De igual forma a la profesora Nancy Rojas, del Dpto. de Patología de la Facultad de Medicina por su ayuda en el análisis histológico.

Todos los profesores de mi Alma Mater y en particular a la profesora Patricia Woll quien me enseñó e inició en el trabajo de laboratorio. Igualmente a las profesoras Doris Huerta, Mercedes Soberón, Fernando Retuerto y Mario Monteghirfo y por su interés y apoyo en la culminación de mi tesis.

Todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular: Prof. Walter Manyá, y mis compañeros Carlos Rivera y Rosalina Tincopa

Quien por el tiempo y las circunstancias no pude retribuirle ni darle la satisfacción de poder vivir estos momentos, por su formación y haber servido de motivo de inspiración para superarme, mi "mamachita". A mis padres, a mi tía Dora quienes con cariño me dieron su confianza y apostaron por una vida profesional para mí. Mis hermanos Miky, Rolando, David, Jhonny y Humberto, con quienes entre gritos y alegrías compartí parte de mi vida universitaria.

Miriam Lescano, del Centro de Cómputo, a mi colega Sergio Huatuco, por la presentación de mi exposición y a todos los amigos, quienes sin estar involucrados directamente, me dieron siempre su apoyo para seguir adelante.

CONTENIDO

	Pag.
• Resumen	1
• Abstract	2
• Introducción	3
• Antecedentes	5
• Material y Métodos	7
• Resultados	12
• Discusión	14
• Conclusiones	17
• Referencias Bibliográficas	18.

RESUMEN

En este trabajo, se ha aislado y caracterizado parcialmente una toxina del veneno del escorpión *Hadruidoidea mauryi*. La separación se hizo sobre una columna de CM Sephadex C-25 a pH 7. Esta toxina ha sido denominada Hm3 y produce contracción y parálisis en la extremidad inoculada intramuscularmente en ratones albinos. La toxina tiene un peso molecular de 14 kDa.

Por otro lado, Hm3 es capaz de provocar la liberación de creatina kinasa (4573,1 UI/L en 90 minutos), lactato deshidrogenasa (349,3 UI/L en 90 minutos) y otras proteínas musculares, así como incrementar los niveles de calcio intramuscular (69,3 nmoles en 45 minutos).

El análisis histológico del músculo gastrocnemius de ratones albinos tratados con Hm3, mostró necrosis del tejido e infiltración de glóbulos blancos, lo cual podría ser consecuencia de la activación de proteasas y lipasas endógenas dependientes de calcio, ya que Hm3 carece de actividad proteolítica y de fosfolipasa.

ABSTRACT

A toxin from the *Hadruidoidea mauryi* scorpion venom has been isolated and partially characterized. The separation was done on CM-Sephasex C-25 to pH 7. The toxin was called Hm3, and produced contraction and paralysis in the inoculated limb of white mice.

On the other hand, Hm3 increased the level of creatin kinase (4 573,1 UI/L after of 90 minutes), lactate deshidrogenase (349,3 UI/L after of 90 minutes) and other muscular proteins, as well as the level of intramuscular calcium (69,3 nmoles after of 45 minutes).

The histological analysis of gastrocnemius muscle of white mice inoculated with Hm3, showed mionecrosis and infiltration of white cell, which could be consequence of endogenous proteases and lipases activated by calcium, because Hm3 has neither proteolytic nor phospholipase activity.

INTRODUCCIÓN

Los escorpiones son arácnidos que viven en determinadas áreas geográficas, tanto en zonas desérticas como de abundante vegetación, que incluyen regiones tropicales y subtropicales. El veneno de escorpión es una mezcla de proteínas con acción tóxica, siendo algunos de sus efectos la parálisis de presas como insectos, arañas y crustáceos. Adicionalmente estos venenos contienen también toxinas específicas para mamíferos; sin embargo, en el hombre el efecto de estos venenos puede ser variado desde inocuo hasta fatal, dependiendo de la especie de escorpión que se trate.

En el Perú existen representantes de seis familias de escorpiones: Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Euscorpiidae, Ischnurida e Iuridae, constituyendo un total de 40 especies (Comunicación personal, Ochoa, 2003). Sin embargo, hasta 1983 se habían realizado algunos estudios sobre el efecto de los venenos pero sólo en tres especies, en todos los casos empleando el veneno crudo (Calderón y Aguilar, 1988; Castro *et al.*, 1981; Zavaleta, 1983). Recientemente, en nuestro medio, se ha descrito el primer trabajo sobre la separación de toxinas del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* (Escobar *et al.*, 2002). En este sentido, se desconoce casi todo sobre la composición de los venenos de nuestra variada fauna escorpiónica.

En la actualidad en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular, se viene trabajando en la separación y caracterización de las proteínas de tres venenos de escorpiones de nuestro país, entre ellas, *Hadruroides mauryi*, el cual es un escorpión de la familia Iuridae. Esta especie tiene una amplia distribución en Cuzco, Huancavelica y Ayacucho y alcanza una longitud de hasta 5 cm. El cuerpo es en

general de color marrón oscuro; mientras que sus patas, de color amarillo, son ligeramente pigmentadas (Francke y Soleglad, 1980). El veneno de esta especie se caracteriza por producir la parálisis de pequeños crustáceos e insectos, pero adicionalmente al ser inyectado intramuscularmente en ratones albinos, produce también la contracción y parálisis de la extremidad inoculada.

En este trabajo se enfoca el estudio del veneno de *Hadruidoidea mauryi*, con la finalidad de separar y caracterizar la toxina responsable de producir contracción y parálisis en la extremidad inoculada de roedores. El estudio de esta toxina permitirá conocer aspectos sobre su rol durante el envenenamiento y modo de acción a nivel muscular.

En este sentido los objetivos de esta investigación fueron:

- Aislar del veneno de *Hadruidoidea mauryi*, la toxina responsable de contraer y paralizar la extremidad inoculada de ratones albinos.
- Determinar su peso molecular y naturaleza ácido-básica.
- Evaluar su acción sobre el tejido muscular midiendo la liberación de proteínas musculares como creatina kinasa y lactato deshidrogenasa; así como determinar el daño histológico producido.
- Determinar las variaciones en los niveles de calcio intramuscular, producidos por la toxina.
- Determinar la actividad proteolítica o fosfolipásica de la toxina.

ANTECEDENTES

Los primeros estudios sobre los escorpiones del Perú se iniciaron hace 35 años y ellos fueron importantes porque permitieron establecer la diversidad y distribución geográfica de los escorpiones de nuestro país así como identificar los efectos de algunos venenos (Aguilar, 1968; Aguilar y Meneses, 1970; Francke, 1977; Maury, 1978). Mas recientemente, Acosta y Ochoa han descrito 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 hasta 40 especies (Comunicación personal, Ochoa, 2003).

Sin embargo, solamente los venenos de tres especies de nuestra fauna escorpiónica han sido estudiados. Entre ellos tenemos a *Hadruidoidea charcasus* y *Brachistosternus ehrenbergii*, en donde existen reportes únicos y por lo mismo muy preliminares y genéricos sobre el veneno total (Arboleda *et al.*, 1973; Calderón y Aguilar, 1988). Asimismo, en el caso de *Hadruidoidea lunatus*, que tiene una amplia distribución desde Ancash hasta Arequipa, se han llegado a describir también algunos efectos tóxicos y farmacológicos del veneno total (Cáceres *et al.*, 1972; Zavaleta, 1983); pero en ninguno de estos estudios, las toxinas responsables de estos efectos fueron aisladas ni identificadas.

Es recién durante el año 2002 que en el laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular se han iniciado los estudios sobre el aislamiento y caracterización de las proteínas de venenos de escorpiones de nuestro país, y en este sentido el primer estudio de este tipo se ha realizado con el veneno de *Hadruidoidea lunatus* de donde se han aislado tres toxinas (Escobar *et al.*, 2002), una de las cuales ha sido caracterizada en su acción sobre músculo esquelético (Escobar *et al.*, 2003). Estos

mismos estudios se han extendido, durante este año, a los venenos de *Centruroides margaritatus*, *Brachistosternus ehrenbergii* y *Hadruidoidea mauryi*. Particularmente en el veneno de *Hadruidoidea mauryi* se ha determinado preliminarmente la presencia de toxinas para crustáceos, insectos y roedores. La toxicidad en roedores se manifiesta por la parálisis que produce el veneno en la extremidad inoculada. En este trabajo la toxina responsable de este efecto, ha sido estudiada y denominada Hm3 atendiendo a la nomenclatura planteada por Becerril quien ha propuesto denominar a cada toxina por las iniciales del nombre científico de la especie (en este caso Hm de *Hadruidoidea mauryi*) seguido por un número específico de la toxina (en este caso 3, por ser la tercera toxina que hemos identificado en el veneno de esta especie) (Becerril *et al.*, 1996).

En general las toxinas aisladas de escorpiones han mostrado tener acción sobre crustáceos, insectos y mamíferos, y la mayoría de ellas son toxinas que bloquean canales de sodio o de potasio. (García, *et al.* 2001). Cabe señalar que en algunos países como México y Brasil, ciertas especies de los géneros *Centruroides* y *Tityus* constituyen problemas de salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

- Escorpiones: Se utilizaron 105 escorpiones adultos de ambos sexos de la especie *Hadruidoidea mauryi* capturados en la localidad de Huari (Ayacucho) durante el mes de febrero. Los ejemplares fueron mantenidos en el laboratorio, individualmente, en vasos de plástico.
- Ratonos: *Mus musculus* de 18 a 20g de peso.

2. Equipos

- Centrífuga clínica Sorvall
- Fotocolorímetro Spectronic 20
- Baño de temperatura Homef
- Refrigeradora Infrisa
- Cámara para electroforesis vertical y fuente de poder Techward
- Pipetas automáticas
- Balanza Ohaus
- Agitador magnético Precisión Scientific Co.
- Equipo para cromatografía en columna

3. Obtención y preparación del veneno.- El veneno fue obtenido por estimulación mecánica simple y fue colectado en microcapilares de 1,2 mm de diámetro (Zlotkin and Shulov *et al.*, 1969). El veneno extraído fue desecado y luego pesado, obteniéndose 49,6 mg que se disolvieron en 1,4 ml de buffer acetato de amonio 0,05M pH 7. Los restos insolubles fueron separados y eliminados por centrifugación a 3000 rpm, durante 15 minutos.

4. Fraccionamiento del veneno y aislamiento de la toxina.- El sobrenadante (1ml) fue aplicado a una columna de intercambio catiónico de CM Sephadex C-25 (17x1.1cm) equilibrada en buffer acetato de amonio 0,05M pH 7. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente y a un flujo de 10ml/h. Se colectaron fracciones de 2ml 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.- En todos los ensayos la concentración de proteína fue estimada por el método de Lowry (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.

6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE - SDS).- Con la finalidad de evaluar la pureza y el peso molecular de la toxina, se empleó PAGE- SDS de acuerdo al método de Laemmli, (1970). 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 cubriéndose con una capa delgada de agua hasta conseguir su gelificación. Luego de 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 (150 μ g), Hm3 (4 μ g) y una mezcla de proteínas estándares (albúmina 66 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y lisozima 14,3 kDa) fueron tratadas, por

separado, con un buffer conteniendo SDS y mercaptoetanol (10 a 20 μ l) y fueron calentadas a 100 °C por 5 minutos, antes de su aplicación al gel. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante, empleando 68 voltios 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. Luego se procedió a su decoloración en una solución decolorante (metanol, ácido acético y agua, 3:1:8,5) hasta visualizar las bandas de proteína.

7. Acción de la toxina.- Durante el proceso de purificación, ratones albinos de 20 g de peso fueron inoculados en el músculo gastrocnemius con 100 μ l de veneno crudo o de las fracciones colectadas, e inmediatamente se evaluó la contracción y parálisis producida en la extremidad inoculada.

Adicionalmente, luego de identificada la ubicación de la toxina Hm3, se evaluó su actividad miotóxica de la siguiente manera:

7.1. Dosaje de creatina kinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH).- Cuatro ratones albinos de 20 g de peso, fueron inyectados en el músculo gastrocnemius con 0,1 ml de miotoxina (30,4 μ g). Luego de 45 y 90 minutos, los animales fueron anestesiados con cloroformo y se les extrajo 0,4ml de sangre del corazón. La sangre fue tratada con 0,04 ml de citrato de sodio 3,8% y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos para obtener el plasma.

La actividad de CK fue evaluada aplicando 25 μ l del plasma sobre 1ml del Kit para CK de Pointe Scientific y midiendo los incrementos en la absorbancia a 340nm. La actividad se expresó en UI/L. Bajo condiciones similares se midió la actividad de LDH utilizando el Kit correspondiente.

7.2 Liberación de proteínas musculares *in vitro*.- Se aisló músculo gastrocnemius de ratones albinos de 20 g de peso y se colocó en 1ml de buffer fisiológico a pH 7,2 (6,74 μ g de cloruro de sodio, 0,35 μ g de cloruro de potasio, 0,593 μ g de sulfato de

manganeso, 0,3708 µg de cloruro de calcio, 0,16 µg de fosfato ácido de potasio, 2,1 µg de bicarbonato de sodio y 2 µg de glucosa), bajo aireación constante. Inmediatamente se agregó 0,1ml de miotoxina (17,4 µg) y posteriormente alícuotas de 10 µl fueron extraídas a los 0, 15, 30, y 60 minutos para ser analizados por PAGE- SDS (Laemmli, 1970), a fin de evidenciar la liberación de proteínas musculares con respecto a un control sin toxina (Pantigoso, 2002).

7.3 Evaluación del daño histológico.- Ratones albinos de 20 g de peso fueron inyectados en el músculo gastrocnemius con 0,1ml de Hm3. Después de 3 y 12 horas, fueron sacrificados y se les extrajo el músculo gastrocnemius, para ser fijado en glutaraldehído al 3% en buffer fosfato 0,1M pH 7,2 a 4°C, por 4 horas. Luego se hicieron 3 lavados con el mismo buffer, de 5 minutos cada uno, y se postfijó en Tetraóxido de Osmio al 1% en buffer fosfato por 2 horas. A continuación se volvió a lavar 3 veces con el buffer por 5 minutos y las muestras fueron deshidratadas en una batería de etanol en grado ascendente desde 30° hasta absoluto por 15 minutos cada paso, y 2 veces más por 20 minutos, en los alcoholes de 96°, 100°, finalizando con acetona absoluta.

Las muestras fueron embebidas en una mezcla de acetona-resina Epon 3:1 por 2 horas y luego fueron trasladadas a una mezcla de acetona-resina Epon 1:1 durante toda la noche. A continuación las muestras fueron colocadas en resina pura, con 2 cambios, el primero de 2 horas y el último de 4 horas.

Finalmente las muestras se incluyeron en Epon y se polimerizó por 48 horas a 60°C. Se tallaron los moldes para exponer los tejidos y se procedió a hacer cortes de 1µm en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio. Los cortes obtenidos fueron teñidos con azul de toluidina para su observación con un microscopio de luz de campo claro (Comunicación personal Rojas, 2001, Microscopia de Alta Resolución).

8. Variación de los niveles de calcio producidos por Hm3.- Ratones albinos de 20 g de peso fueron inyectados en el músculo gastrocnemius con 0,1ml de miotoxina (30,4 µg). Luego de 45 y 90 minutos los ratones fueron sacrificados y se les extrajo el músculo gastrocnemius, el cual fue sumergido en 3ml de buffer Imidazol 10mM a pH 7,1 conteniendo NaCl 140mM, KCl 5mM, digitonina 200 µg/ml y antipirilazo III 0,2mM. Luego de incubar por 8 minutos a temperatura ambiente, el tejido fue retirado y se midió la absorbancia de la solución a 710 y 790nm. Las diferencias en las absorbancias ($A_{710} - A_{790}$) fueron convertidas a nmoles de calcio, dividiéndolas entre un factor de $0,0031 \text{ nm}^{-1}$ obtenido a partir de una curva estándar de calcio con antipirilazo III (Murphy *et al.*, 1980).

9. Actividad de fosfolipasa.- Se empleó 3 ml de una emulsión de yema de huevo (100 µl de yema de huevo en 80 ml de buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7. Luego de aplicar 0,1 ml de veneno crudo (650 µg) ó Hm3 (17,4 µg) 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 toxina aislada, fue evaluada por el método de Chavira (1984), para lo cual se mezcló 0,2ml de Azocoll 0.025 mg/ml, 0,2 ml de buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7 y 50 µl de veneno crudo (6,5 mg/ml) o Hm3 (0,324 mg/ml). Luego se incubó a 37°C por 30 minutos y se agitó cada tubo para facilitar la reacción. Finalmente para detener la reacción se adicionó 2,5ml de NaOH 0,1N y se midió la absorbancia a 540nm.

RESULTADOS

1. Purificación de la toxina.- Al pasar el veneno crudo de *H. mauryi*, por la columna de CM Sephadex C-25 se obtuvieron inicialmente 2 picos de proteína, mientras que al utilizar el buffer de elución conteniendo NaCl 0,25M, se obtuvieron 4 picos adicionales. Finalmente al emplear NaCl 0,6M se obtuvo un último pico. La actividad de Hm3, que se evidenció por la capacidad de producir una brusca contracción y parálisis en la extremidad inoculada de ratones albinos, se encontró en el último pico representando un 4,5% de la proteína total del veneno (Figura 1). En los ratones controles, se inyectó buffer acetato de amonio 0,05M pH 7 conteniendo NaCl 0,6M.

2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS).- El patrón electroforético del veneno crudo de *H. mauryi* mostró la presencia de 5 bandas proteicas mientras que el de la toxina Hm3 correspondió a una sola banda proteica de 14 kDa (Figura 2).

3. Dosaje de creatina kinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH).- Al evaluar los niveles de CK liberada en el plasma de ratones albinos tratados con Hm3, se encontró valores de 3 779,3 y 4 573,1 UI/L luego de 45 y 90 minutos, respectivamente. En el control se registró un valor de 280,1 UI/L (Figura 3).

La evaluación de los niveles de LDH liberada en el plasma de ratones albinos tratados con Hm3, mostraron un valor de 248,2 y 349,3 UI/L luego de 45 y 90 minutos, respectivamente. En el control se registró un valor de 142,7 UI/L (Figura 4).

4. Liberación de proteínas musculares *in vitro*.- La evaluación por PAGE-SDS, de las proteínas liberadas del músculo gastrocnemius aislado e incubado con Hm3,

demonstró la capacidad de la toxina de provocar la liberación de proteínas musculares en el medio de incubación, desde los 15 minutos de acción (Figura 5).

5. Evaluación del daño histológico.- El daño histológico producido por Hm3 en el músculo gastrocnemius, fue observado desde las 3 horas de acción, siendo mas evidente a las 12 horas, mientras que en el control no se observó ninguna alteración (Figura 6).

6. Variación de los niveles de calcio producidos por Hm3.- Los niveles de calcio intramuscular en los animales tratados con Hm3 alcanzaron un valor máximo de 69,3 nmoles, después de 45 minutos, mientras que en los controles se registró un valor de 34,1 nmoles (Figura 7).

7. Actividad fosfolipásica y proteolítica.- La toxina Hm3 del veneno de *H. mauryi* no mostró tener actividad de fosfolipasa ni proteolítica, mientras que en el veneno crudo tampoco se encontró actividad proteolítica pero si de fosfolipasa.

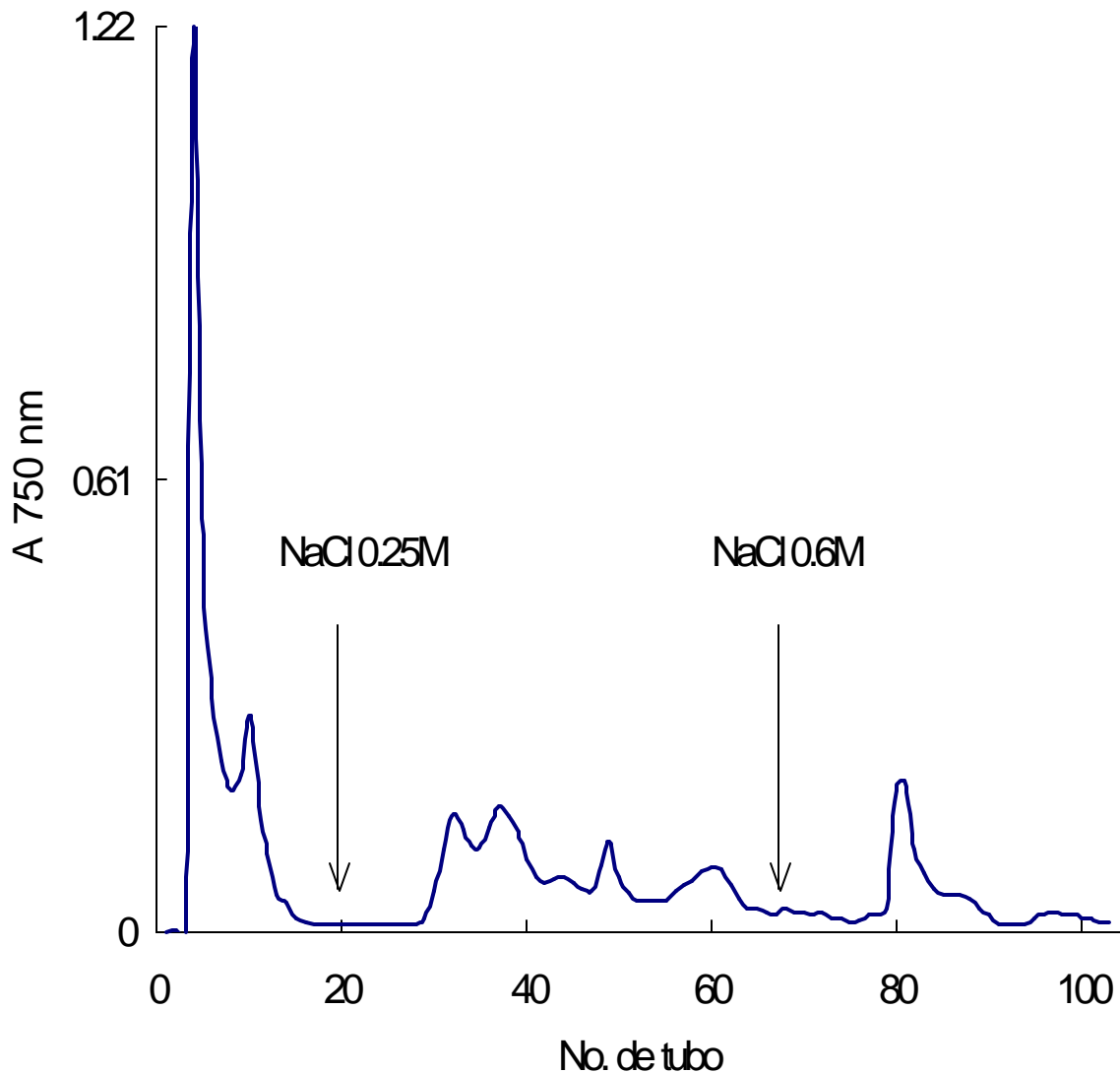


Figura 1. Perfil cromatográfico del veneno de *H. mauryi*.- Empleando una columna de CM Sephadex C-25 a pH 7, se obtuvieron 7 picos de proteína, el último de los cuales correspondió a Hm3.

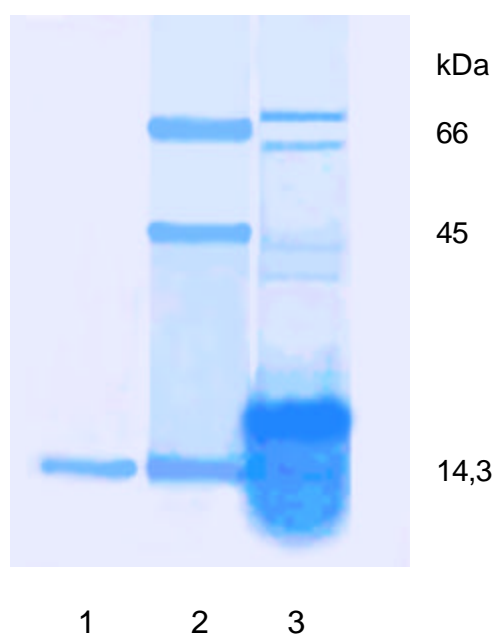


Figura 2. Electroforesis en condiciones denaturantes con SDS. En el carril 1 y 3 se observa el patrón electroforético de la miotoxina y del veneno crudo, respectivamente, mientras que en el carril 2 se tiene a los estándares de peso molecular, albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

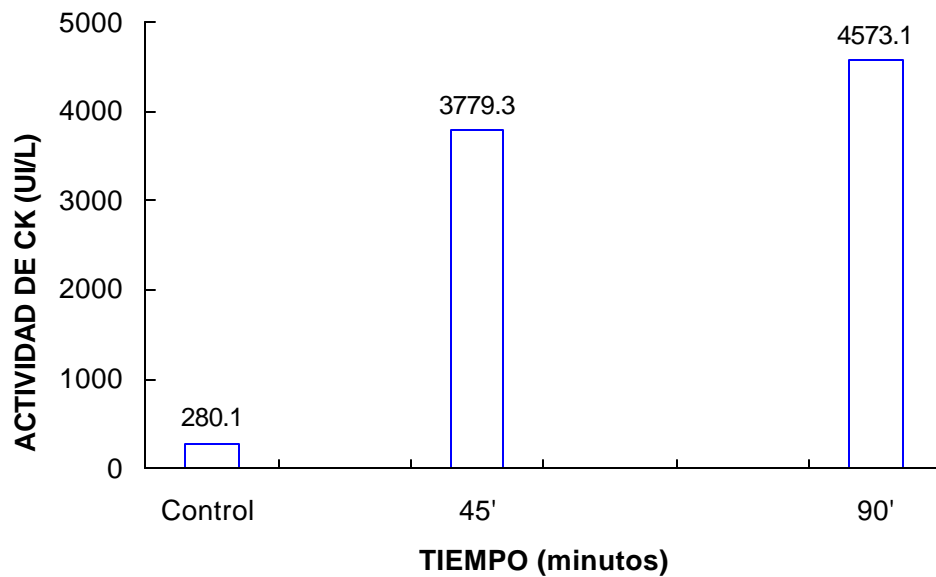


Figura 3. Liberación de creatina kinasa en el plasma de ratones.- La actividad de CK alcanzó un valor máximo, por efecto de Hm3, de 4 573,1 UI/L luego de 90 minutos.

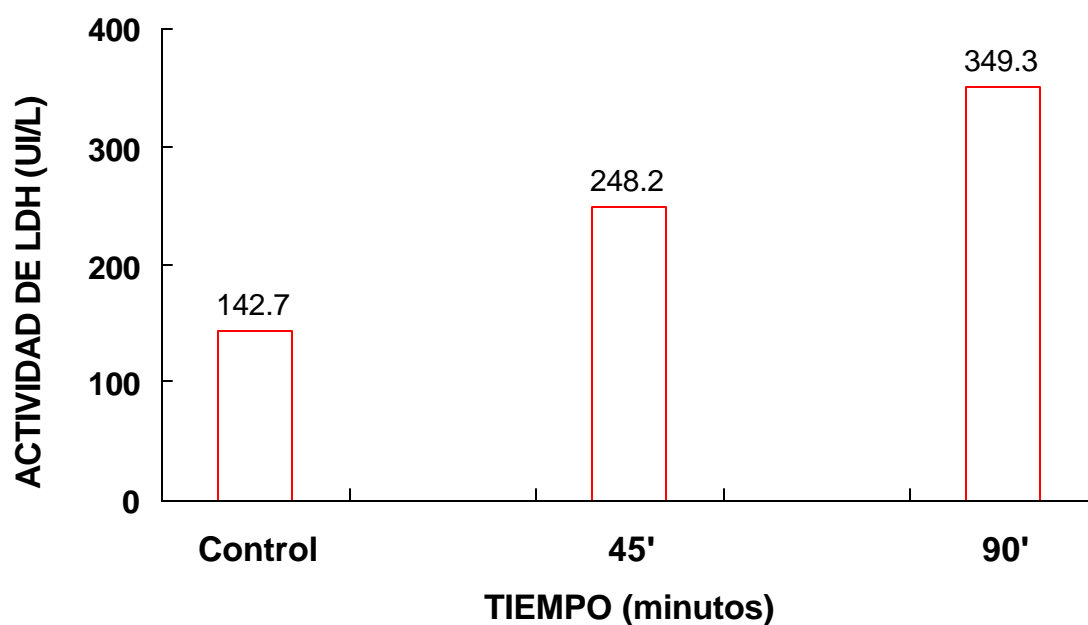


Figura 4. Liberación de lactato deshidrogenasa, en el plasma de ratones.- La actividad de LDH alcanzó un valor máximo, por efecto de Hm3 de 349,3 UI/L luego de 90 minutos.

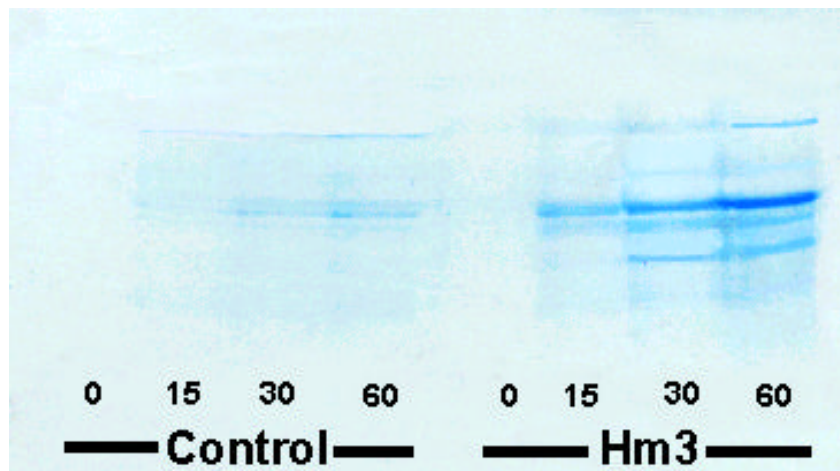


Figura 5. Evaluación por PAGE-SDS de la liberación de proteínas musculares. La incubación de Hm3 con músculo gastrocnemius, indujo la liberación de diferentes proteínas desde los 15 minutos, siendo mas evidente a los 60 minutos.

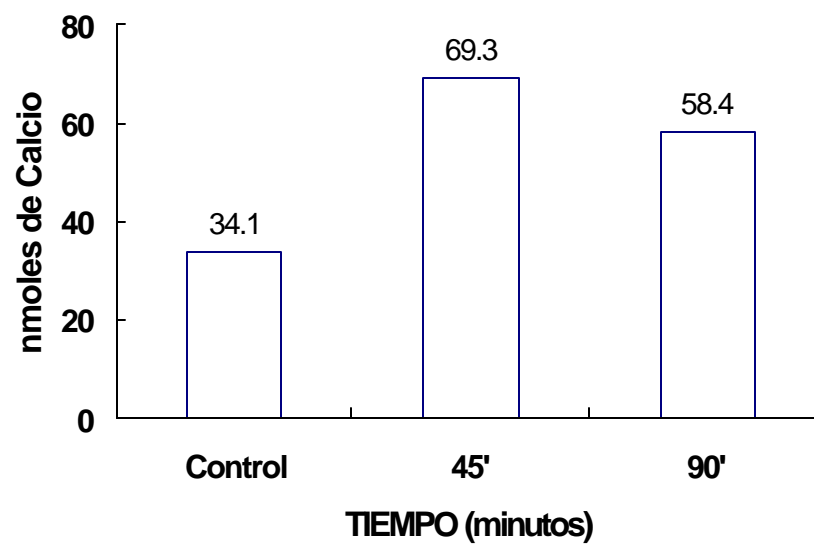


Figura 7. Variación de los niveles de calcio intramuscular.- Los niveles de calcio alcanzaron un valor de 69,3 nmoles, por efecto de Hm3, luego de 45 minutos.

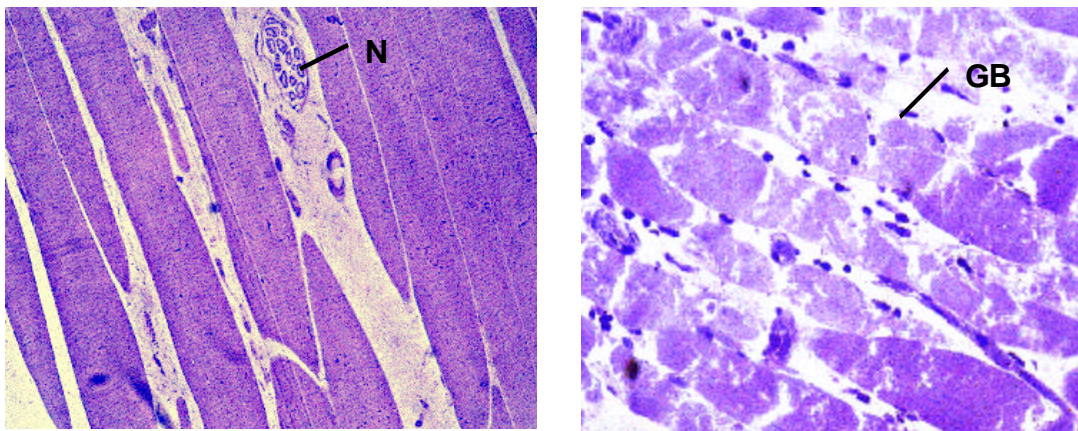


Figura 6. Daño histológico producido por Hm3.- En A se muestra un corte longitudinal de músculo gastrocnemius de ratones albinos no tratados con Hm3, en donde se observan las fibras musculares intactas y un paquete de nervios (N). En B se muestra la necrosis producida por Hm3, luego de 12 horas, además de la infiltración de glóbulos blancos (GB).

DISCUSIÓN

La miotoxina (Hm3) del veneno de *H.mauryi* fue purificada en un sólo paso cromatográfico empleando una columna de CM-Sephadex C-25 a pH 7. En este sistema la toxina se unió fuertemente al gel y sólo fue posible separarla después de adicionar en el buffer de elución NaCl 0,6M. Esto significa que la miotoxina a pH 7, 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) es mayor que 7, tratándose de una proteína básica.

La naturaleza básica de esta proteína es una característica común de varias toxinas aisladas de venenos de escorpión. Así por ejemplo, podemos mencionar las toxinas aisladas del veneno de *H. lunatus* (Escobar *et al.*, 2002); y las toxinas Cn2 y AaHII de *Centruroides noxius* y *Androctonus australis* respectivamente (Possani *et al.*, 1999).

Hm3 representa el 4.5% de la proteína total del veneno y por PAGE-SDS mostró una sola banda proteica de aproximadamente 14 kDa. En el veneno de *H. lunatus* se ha aislado una toxina similar de 12,5 kDa que se ha denominado HI3 y que constituye el 10,4% de la proteína total del veneno (Escobar *et al.*, 2002).

El efecto característico de Hm3 es su capacidad de producir contracción y parálisis en la extremidad inoculada de ratones albinos, sin embargo los otros resultados obtenidos *in vivo* indican que Hm3 afecta además la permeabilidad de la membrana del músculo esquelético provocando su desorganización, lo cual se evidencia por la liberación de creatina kinasa y lactato deshidrogenasa desde los 45 minutos de acción. Por otro lado, el análisis por PAGE-SDS, de las proteínas

liberadas del músculo gastrocnemius, luego de su incubación con Hm3 evidencian que además de creatina kinasa y lactato deshidrogenasa, otras proteínas musculares son liberadas también, lo cual denota el daño producido por Hm3 a nivel del sarcolema con la consecuente pérdida de proteínas musculares. Asimismo este daño es dependiente del tiempo, ya que la liberación de proteínas se observa desde los 15 minutos de incubación, incrementándose a mayores tiempos. Una toxina con similares características en sus efectos ha sido aislada recientemente del veneno de *H. lunatus* (Escobar *et al.*, 2003).

Actualmente se sabe que las toxinas de escorpión que afectan a mamíferos, 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 mantienen un motivo estructural conservado que está dado por un núcleo compacto formado por una α hélice y tres hojas β plegadas (Possani *et al.*, 1999).

Estas toxinas, de acuerdo a la modificación causada en los canales de sodio, se diferencian en dos tipos: Las α -toxinas, que bloquean la inactivación de los canales de sodio, y las β -toxinas que activan los canales de sodio en nervios y músculos. En ambos casos los canales de sodio permanecen abiertos mas tiempo y de esta manera se prolongan los potenciales de acción en músculos y nervios (Gordon *et al.*, 1998). La toxina AaHII de *Androctonus australis* es una α -toxina clásica, mientras que la Cn2 de *Centruroides noxius*, es una β -toxina (Possani *et al.*, 1999).

Es posible que la actividad ejercida por Hm3 sobre el músculo gastrocnemius, afecte los canales de sodio con la consecuente prolongación de los potenciales de acción. Esto a su vez podría explicar la característica contracción y parálisis muscular producida por Hm3. Asimismo, la prolongación del potencial de acción

generaría una mayor liberación de Ca^{2+} en la fibra muscular, tal como en este trabajo se ha demostrado con el uso de antipirilazo III.

En *Tityus serrulatus* se ha demostrado que la Ts1 (tityustoxina-I), una neurotoxina que bloquea canales de sodio y que es letal para roedores, también provoca la liberación de creatina kinasa y otras proteínas musculares. Se cree que el incremento de la concentración de estas proteínas en el plasma podría deberse a un daño del tejido y/o una estimulación de mediadores químicos que podrían disparar su liberación (Correa *et al.*, 1997).

Por otro lado, la observación al microscopio de cortes histológicos de músculo gastrocnemius de ratones albinos tratados con Hm3, muestra que la toxina tiene una acción específica y localizada, ya que es capaz de producir parcialmente la desorganización y destrucción de las fibras musculares, sin afectar las fibras nerviosas, las cuales se mantienen intactas. Esto último podría explicar en parte, la recuperación del movimiento muscular. Como consecuencia de todo este daño, es posible observar también la presencia de polimorfonucleares (infiltración de glóbulos blancos).

Ya que en este estudio se ha determinado que Hm3 carece de actividad proteolítica y de fosfolipasa, y que mas bien es capaz de generar un aumento en los niveles de calcio intramuscular, esto sugiere que la mionecrosis producida no sería una consecuencia directa de su acción sobre las miofibrillas, sino el resultado de la activación de proteasas y lipasas endógenas dependientes de calcio. Es sabido que un incremento del calcio citosólico es un paso crítico de la muerte celular en una amplia variedad de condiciones patológicas (Trump *et al.*, 1982).

Cabe señalar que en el veneno crudo tampoco se ha detectado actividad proteolítica pero sí actividad de fosfolipasa. En este sentido el veneno de *H.mauryi*

es similar a los venenos *H. lunatus*, *Nebo hierichonticus* y *Vejovis spinigerus* que no contienen proteasas (Rosin, 1972; Russell *et al.*, 1968), pero diferente del veneno de *Scorpio marus palmatus*, en el que sí se ha detectado actividad proteolítica (Zlotkin *et al.*, 1972).

CONCLUSIONES

1. Se ha aislado una miotoxina (Hm3) del veneno del escorpión *Hadruidoidea mauryi*, mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25.
2. La toxina Hm3 se caracteriza por:
 - presentar un peso molecular de 14 kDa.
 - producir la liberación de creatina kinasa, lactato deshidrogenasa y otras proteínas musculares.
 - actuar sobre las fibras musculares en forma localizada produciendo degeneración de las fibras con el consecuente incremento de polimorfonucleares.
 - incrementar los niveles de calcio intramuscular.
 - no tener actividad de fosfolipasa ni proteolítica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, L. y OCHOA, J. 2000. Nueva especie de *Orobothriurus* Maury del Perú (Scorpiones: Bothriuridae). *Revue Arachnologique*, 13 (10) : 135-144.
- ACOSTA, L. and OCHOA, J. 2001. Two news species of *Orobothriurus* Maury 1976 from Argentina and Peru, 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 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.
- BECERRIL, B.; CORONA, M.; CORONAS, F.; ZAMUDIO, F.; CALDERON-ARANA, E.; FLETCHER, P.; MARTÍN, B. and POSANI, L. 1996. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmuris*. *Biochem J.* 313 : 753-760.

- 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. 1988. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. X: Efecto del veneno de *Brachistosternus ehrenbergi* sobre ratones albinos. Rev. Per. Ent. 30 : 91-93.
- CASTRO, G.; ZAVALA, A. Y CASTRO DE LA MATA, R. 1981. Variación estacional del veneno de *Hadruidoidea lunatus* (Koch) (Scorpionida : Vejovidae) y su actividad paralizante sobre *Porcellio laevis* Koch (Crustacea : Isopoda). Rev. Per. Ent. 24 (1) : 71-74.
- 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.
- CORREA, 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.
- 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.; RIVERA, C. y TINCOPA, L. 2003. Acción de la toxina HI3 sobre músculo esquelético. Rev. Peru. Biol. 10 (1) : 88-92.

- 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.
- FRANCKE, O. and SOLEGLAD, M. 1980. Two new *Hadruidoidea* Pocock, from Peru (Scorpiones, Vaejovidae). Occasional papers the museum Texas Tech. University 1-13.
- GARCIA, M.; GAO, Y.; Mc MANUS, O. and KACZOROWSKI, G. 2001. Potassium channels: from scorpion venom to high - resolution structure. Toxicon 39 :740-747.
- GORDON, D.; SAVARIN, P.; GUREVITZ, M. and ZINN-JUSTIN, S. 1998. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. J. Toxicol. Toxin Rev. 17 : 131-159.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of Structure Proteins During the Assembly of the head of bacteriophage T4. Nature Vol. 227. pp 680 - 685.
- LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A. and RANDALL, R. 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.
- MAURY, E. 1978. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. VII: Nuevos hallazgos y redescrición de *Brachistosternus andinus*. Rev. Per. Ent. 21 (1): 23-26.
- MURPHY, E.; COLL, K.; RICH, T. and WILLIAMSON, J. 1980. Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. J. Biol. Chem. 255 : 6600

- 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). Euscorpium Occasional publications in Scorpology 2 : 1-13.
- PANTIGOSO, C.; ESCOBAR, E. y YARLEQUE, A. 2002. Acción de la miotoxina del veneno de *Bothrops brazili* Hoge, 1953 (Ophidia: Viperidae). Rev. Perú. Biol. 19 (12): 74 -73.
- POSSANI, L.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M. and TYTGAT, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ - channels. Eur. J. Biochem. 264. 287-300.
- ROSIN, R. 1972. Venom, venom effects and poison gland of the scorpion *Nebo hierichonticus*. Cienc. Cult. 24, 246.
- RUSSEL, F.; ALENDER, C. and BUSS, F. 1968. Venom of the scorpion *Vejoris spinigerus*. Science 159, 90. Vidal, J.; Caltanes, P. and Stoppani, A. 1972. Some characteristic properties on phospholipases A from *Bothrops neuwedii* venom. Arch. Biochem. Biophys. 151-168.
- TRUMP, B.; BERZESKY and COWLEY, R. 1982. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In: Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia, P.G. (Cowley, R.A. and Trump, B.F. Eds.). Williams and Wilkins. Baltimore. 6-46.
- ZAVALETA, A. 1983. El veneno del escorpión: Bioquímica y Farmacología. Boletín de Lima. No. 30, 76.

- ZLOTKIN, E. and SHULOV, A. 1969. A simple device method for collecting scorpion venom. *Toxicon*, 7 : 331.
- ZLOTKIN, E.; LEBOVITS, N. and SHULOV, A. 1972. Toxic effects of the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus* (scorpionidae). *Riv. Parasitol.* 33, 237.