



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD DEL
VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones,
Buthidae) SOBRE *Leishmania mexicana mexicana*
(Modalidad: Investigación)**

JOSÉ RAMÓN BRAVO SALAZAR

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

CUMANÁ, 2010

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD DEL
VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae)
SOBRE *Leishmania mexicana mexicana*
(Modalidad: Investigación)

APROBADO POR:

Dr. Adolfo Borges S
Asesor Académico

Dra. Luisa Rojas
Co-Asesora Académica

Dr. Leonardo De Sousa
Jurado Principal

Dra. Haydelba D' Armas
Jurado Principal

INDICE

AGRADECIMIENTO	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
Evolución histórica y diversidad de los escorpiones de importancia médica	1
El Género <i>Tityus</i> como responsable de la mayoría de los accidentes en América del Sur, incluyendo Venezuela	2
Composición química y función de las toxinas de escorpiones	4
Leishmaniosis y Tripanosomosis en América del Sur: relevancia clínica y necesidad de nuevas estrategias terapéuticas empleando productos naturales	5
Especificidad filogenética del efecto de las toxinas de escorpiones; posible empleo como agentes anti-parasitarios.....	7
METODOLOGÍA	10
Área geográfica y método de captura de los especímenes de escorpión <i>Tityus gonzalespongai</i>	10
Obtención del veneno de escorpión <i>Tityus gonzalespongai</i>	11
Procesamiento de las muestras del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i>	12
Cuantificación de la cantidad total de proteínas del veneno <i>Tityus</i> <i>gonzalespongai</i>	12
Separación por cromatografía de exclusión molecular de las proteínas de la fase acuosa del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i>	14
Separación de los péptidos leishmanicidas del veneno de <i>Tityus</i> <i>gonzalespongai</i> mediante cromatografía líquida a alta presión (HLPC) en fase reversa	15
Determinación de la composición del veneno y sus fracciones mediante métodos electroforéticos.....	16
Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	16
Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de urea/ácido acético.....	17
Evaluación de la toxicidad de los peptidos del veneno de <i>Tityus</i> <i>gonzalespongai</i> sobre promastigotes de <i>Leishmania</i>	18
Caracterización química de los componentes escorpiónicos leishmanicidas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	19
RESULTADOS.....	20
Cuantificación de la cantidad total de proteínas del veneno crudo de <i>Tityus gonzalespongai</i>	20

Cromatografía de exclusión molecular de las proteínas de la fase acuosa del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i>	21
Evaluación del efecto estructural del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> sobre promastigotes de <i>Leishmania m. mexicana</i>	23
Evaluación de toxicidad de los componentes proteicos del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> sobre promastigotes de <i>Leishmania m. mexicana</i>	24
Fraccionamiento de TgIII mediante cromatografía líquida a alta presión (HLPC) en fase reversa	25
Evaluación de la toxicidad de los péptidos derivados de TgIII sobre promastigotes de <i>Leishmania m. mexicana</i>	26
Evaluación de la composición de la subfracción HPLC-13 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea / ácido acético	27
Determinación de la masa molecular de los componentes leishmanicidas presentes en la subfracción HPLC-13 mediante MALDI-TOF	28
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	37
HOJA DE METADATOS	43

AGRADECIMIENTO

Con la más humilde gratitud de servicio y considerando todos los esfuerzos que de una u otra manera, realizaron en la culminación de esta investigación, brindamos nuestra satisfacción a las siguientes instituciones:

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el financiamiento económico de la presente investigación.

Instituto de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

Instituto de Medicina Tropical de la UCV.

Laboratorio de Toxinología, Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad de Oriente (UDO), Núcleo de Anzoátegui.

Y, en especial, al Departamento de Química de la Escuela de Ciencias de la UDO, Núcleo de Sucre.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de proteínas del veneno crudo de <i>Tityus gonzalespongai</i> , por extracción.....	20
Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de las fracciones protéicas en fase acuosa del veneno fraccionado de <i>Tityus gonzalespongai</i>	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escorpión <i>Tityus gonzalespongai</i> . (A) Prosoma. (B) Metasoma (tomado de Quiroga <i>et al.</i> , 2004).	2
Figura 2. Distribución geográfica (área sombreada de color azul) del género <i>Tityus</i> en Venezuela. (1) Ubicación geográfica del escorpión <i>Tityus gonzalespongai</i>	3
Figura 3. Ciclo de vida de los parásitos del género <i>Leishmania</i> y sus diferentes estadíos en el vector (mosquito) y en el ser humano.	6
Figura 4. Mapa de coordenadas para la ubicación de la zona de captura de especímenes de <i>Tityus gonzalespongai</i>	10
Figura 5. Técnica de estimulación eléctrica del telson para la extracción del veneno de escorpión <i>Tityus gonzalespongai</i> de acuerdo a la técnica de Quiroga <i>et al.</i> (1982).	12
Figura 6. Técnica para cuantificación de proteínas según Lowry <i>et al.</i> (1951). (A) Dilución del patrón de BSA. (B) Cuantificación del veneno crudo o fracción de <i>Tityus gonzalespongai</i>	13
Figura 7. Curva de calibración típica, obtenida durante este trabajo, empleando BSA como estándar de acuerdo al procedimiento precedente.....	14
Figura 8. Técnica de separación de proteínas del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> por cromatografía de exclusión molecular.	15
Figura 9. Técnica de separación de proteínas del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).	16
Figura 10. Técnica de electroforesis de gel de poliacrilamida de proteínas del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i>	17
Figura 11. Técnica de evaluación de toxicidad de proteínas del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> en cultivos de promastigotes de <i>Leishmania m. mexicana</i>	18

Figura 12. Determinación de la masa molecular de los componentes HPLC-13 del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> mediante espectrometría de masas por el método de MALDI-TOF.	19
Figura 13. Cromatograma de exclusión molecular de las proteínas en fase acuosa del veneno fraccionado de <i>Tityus gonzalespongai</i> , indicando las fracciones obtenidas. Las barras de la parte inferior indican las fracciones reunidas en cada grupo. El cromatograma es representativo de las 17 corridas cromatográficas realizadas.	21
Figura 14. Electroforesis del veneno crudo de <i>Tityus gonzalespongai</i> (VC), primera fracción (Tgl), segunda fracción (TgII) y tercera fracción (TgIII) en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones disociantes.	22
Figura 15. Efectos estructurales en promastigotes de <i>L. m. mexicana</i> incubados con los venenos de <i>Tityus discrepans</i> y <i>Tityus gonzalespongai</i> (1 h, 35 µg/ml). (a,b) promastigotes incubados en solución salina isotónica. (c) promastigotes incubados con veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> . (d) promastigotes incubados con veneno de <i>Tityus discrepans</i> . Las barras corresponden en todos los casos a 1 µm (c = d).	24
Figura 16. Mortalidad de promastigotes de <i>Leishmania m mexicana</i> por acción de los componentes proteicos fraccionados y del veneno crudo de <i>Tityus gonzalespongai</i>	25
Figura 17. Cromatograma obtenido mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC) de la fracción TgIII de <i>Tityus gonzalespongai</i> . Las barras en la parte inferior del cromatograma indican las fracciones que fueron reunidas para la preparación y posterior liofilización de cada subfracción. El asterisco (*) indica la fracción HPLC-13, la cual corresponde a un componente peptídico con potente actividad leishmanicida (véase sección siguiente).	26
Figura 18. Actividad leishmanicida de las subfracciones de TgIII obtenidas mediante HPLC evaluada a través del porcentaje de mortalidad en promastigotes de <i>L. m. mexicana</i>	27

Figura 19. Composición peptídica de la subfracción HPLC-13 del veneno de *Tityus gonzalespongai* (1 µg) en comparación con el veneno crudo de *Tityus gonzalespongai* (15 µg) y la fracción *TgIII* (15 µg) mediante electroforesis de poliacrilamida en urea / ácido acético. 28

Figura 20. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) de la subfracción HPLC-13, obtenida de la fracción *TgIII* del veneno de *Tityus gonzalespongai*. En el eje de las abscisas se indica la intensidad relativa de la señal y en el eje de las ordenas la relación masa/carga (m/z)..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS

N ^{ro}	Siglas	Significado
1	EM	Espectro de masas
2	CL50	Concentración letal media
3	HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
4	HPLC13	Subfracción 13 obtenida mediante cromatografía líquida de alta presión de la fracción <i>TgIII</i> .
5	HPLC14	Subfracción 14 obtenida mediante cromatografía líquida de alta presión de la fracción <i>TgIII</i> .
6	I	Fracción uno
7	II	Fracción dos
8	III	Fracción tres
9	<i>TgI</i>	Primera fracción obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> .
10	<i>TgII</i>	Segunda fracción obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> .
11	<i>TgIII</i>	Tercera fracción obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular del veneno de <i>Tityus gonzalespongai</i> .
12	<i>TgVC</i>	<i>Tityus gonzalespongai</i> veneno crudo.
13	MALDI-TOF	(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight) desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de iones por tiempo de vuelo.

RESUMEN

Se caracterizó, desde los punto de vista químico y biológico, los componentes proteicos presentes en el veneno del escorpión *Tityus gonzalespongai* que presentan actividad sobre promastigotes del parásito *Leishmania mexicana mexicana*, el cual es responsable de la Leishmaniosis cutánea. Se demostró que el efecto leishmanicida producido por el veneno de *T. gonzalespongai*, así como el del escorpión *T. discrepans*, depende de la dosis del tóxico. La cromatografía mediante exclusión molecular en Sephadex G-50 del veneno de *T. gonzalespongai* produjo tres fracciones (*Tgl*, *TgII* y *TgIII*), de las cuales *TgIII* presentó la mayor actividad leishmanicida (77% de mortalidad en promastigotes), en comparación con el veneno crudo (81%). La fracción *TgIII* fue posteriormente sujeta a fraccionamiento mediante cromatografía líquida a alta presión en fase reversa, generándose 16 subfracciones. De éstas, HPLC-13 Y HPLC-14 presentaron el mayor efecto leishmanicida, con 100% y 80% de mortalidad en *L. m. mexicana*, respectivamente, ensayadas a 1 µg/ml. La evaluación de la composición de HPLC-13 mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF y electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de urea y ácido acético, reveló la presencia de un único componente con una masa molecular de 6 880,97 g/mol. Estos hallazgos corroboran evidencias previas sobre la potencia antiparasitaria del veneno de escorpiones venezolanos y permiten caracterizar, por vez primera, los componentes antiparasitarios presentes en el veneno de *T. gonzalespongai*, los cuales se podrían servir de base para el diseño de nuevas drogas leishmanicidas.

Palabras claves: Escorpiones, *Leishmania*, Leishmaniosis.

INTRODUCCIÓN

Evolución histórica y diversidad de los escorpiones de importancia médica

Los escorpiones (Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, Clase Arachnida, Orden Scorpiones) son los artrópodos más antiguos de nuestro planeta, remontándose su origen al periodo Silúrico, aproximadamente entre 425 y 450 millones de años. Descienden de la familia de los Euríptéridos o escorpiones marinos (Fet y Lowe, 2000). Los escorpiones de la actualidad pueden ser clasificados, con base en sus propiedades anatómicas, en 18 familias: Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Chaerilidae, Diplocentridae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae, Heteroscorpionidae, Iuridae, Liochelidae, Microcharmidae, Pseudochactidae, Scorpionidae, Scorpipidae, Superstitioniidae, Troglotayosicidae, Urodacidae y Vaejovidae (Prendini y Wheeler, 2005).

La familia Buthidae posee la más amplia distribución geográfica en el mundo y contiene las especies de mayor importancia clínica y epidemiológica (Borges, 1996; De Sousa *et al.*, 2000; Borges y De Sousa, 2006). La Familia Buthidae contiene, al menos, cinco géneros de importancia médica en el mundo. Así, especies pertenecientes a los géneros *Androctonus* (Noráfrica, zona del Mediterráneo, Medio Oriente), *Leiurus* (Medio Oriente), *Mesobuthus* (India, Pakistán), *Buthus* (Mediterráneo y Sureste de Asia), *Centruroides* (Sureste de los Estados Unidos, México, América Central y el norte de Suramérica) y *Tityus* (América del Sur y el Caribe), han producido la mayoría de las fatalidades debidas a envenenamientos por escorpiones (Borges, 1996).

El cuerpo de los escorpiones se divide en prosoma y metasoma, correspondiendo la primera sección a los apéndices prensores o pedipalpos y al abdomen, y la segunda a la cola del artrópodo, la cual consiste en seis

segmentos, el último de los cuales se denomina telson e incluye un par de glándulas en donde se produce el veneno (Borges, 1996). Esta secreción es inyectada en el cuerpo de la víctima mediante un aguijón, el cual funciona a la manera de aguja hipodérmica (figura 1).

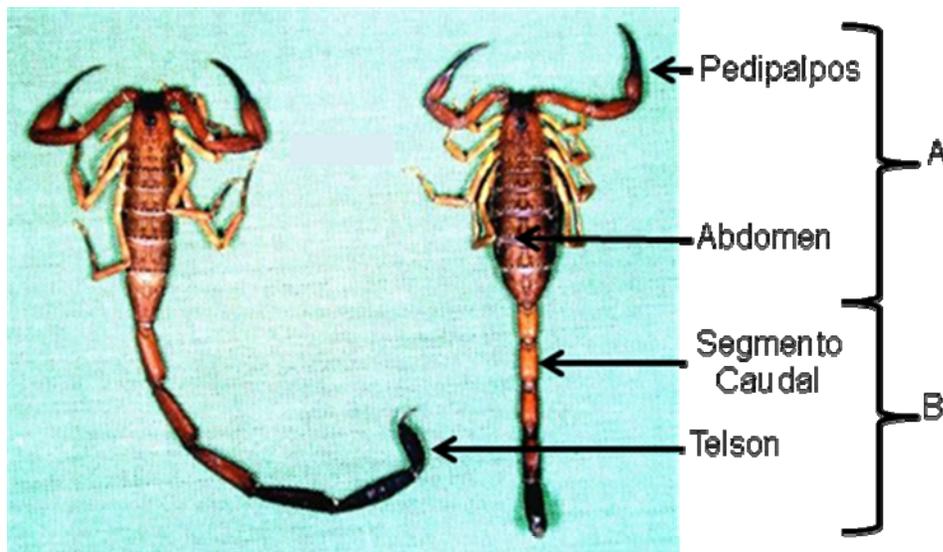


Figura 1. Escorpión *Tityus gonzalespongai*. (A) Prosoma. (B) Metasoma (tomado de Quiroga *et al.*, 2004).

El Género *Tityus* como responsable de la mayoría de los accidentes en América del Sur, incluyendo Venezuela

El género *Tityus* contiene el mayor número de especies en toda la familia Buthidae en América del Sur (Fet y Lowe, 2000; Lourenço y Bruehmüller-Ramos, 2004) y, particularmente, en el territorio venezolano (Rojas-Runjaic y De Sousa, 2007) (figura 2). Estas especies se distribuyen desde Costa Rica hasta el norte de Argentina (Lourenço, 2002). El envenenamiento humano por algunas especies de *Tityus* representa emergencia pediátrica en Colombia (Otero *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 2004; Saldarriaga y Otero, 2000), Venezuela (Borges, 1996; De Sousa *et al.*, 2000; Borges y De Sousa, 2006; De Sousa *et al.*, 2007) Brasil (Biondi-Queiroz *et al.*, 1996; Lourenço y Cuellar, 1995; Lourenço *et al.*, 1996) y Panamá (Coronado *et al.*, 2008). Actualmente, para Venezuela se

reconocen 5 familias, 17 géneros y 184 especies (Rojas-Runjaic y De Sousa, 2007). De ellas, las familias Buthidae y Chactidae, son las más diversas, tanto en número de géneros como de especies, reuniendo el 51,6% y 43% de las especies venezolanas, respectivamente, siendo *Tityus*, el género más especioso dentro de la familia Buthidae; en términos de su alta diversidad toxinológica y filogeográfica, conteniendo un total de 52 especies (28,3% de la escorpiofauna del país) (Borges y De Sousa, 2009; Borges *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2010a).

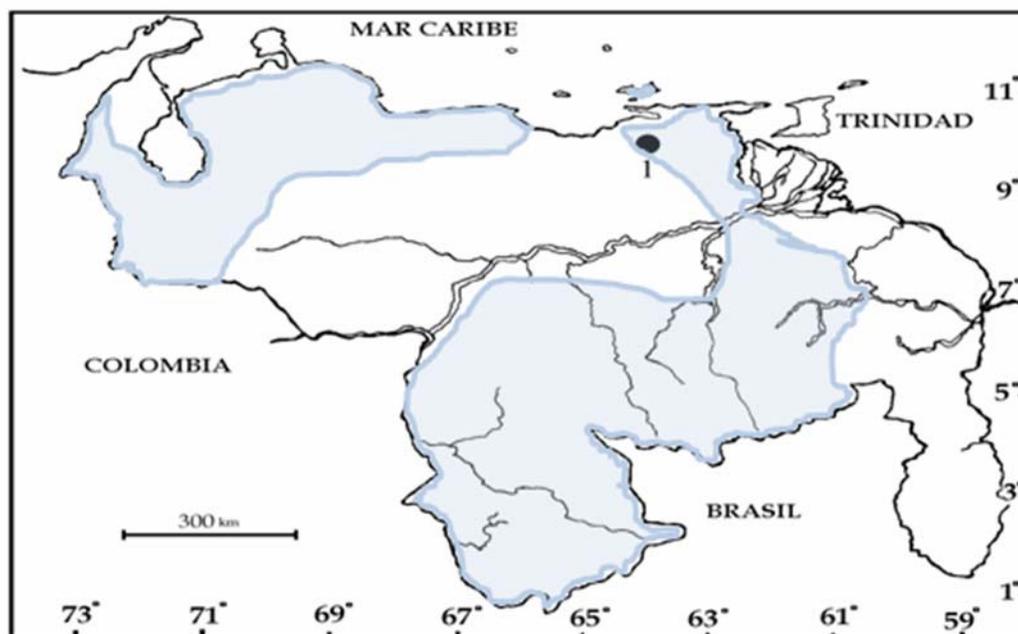


Figura 2. Distribución geográfica (área sombreada de color azul) del género *Tityus* en Venezuela. (1) Ubicación geográfica del escorpión *Tityus gonzalespongai*.

Del total de especies de escorpiones de Venezuela, 11 han sido identificadas e incriminadas como responsables de accidentes graves y/o fatales: *T. zulianus*, *T. valerae* (región Andina), *T. perijanensis* (Sierra de Perijá, occidente del estado Zulia), *T. falconensis* (Centro-Occidental en el Macizo Coriano), *T. pittieri*, *T. isabelceciliae*, *T. discrepans* (Centro-Norte Costera), *T. quirogae*, *T. nororientalis*, *T. caripitensis* y *T. neoespartanus* (Nororiental e Insular). Tres especies adicionales (*T. barquisimetanus*, *T. sanarensis* y *T.*

ivicanacor) habitan áreas del estado Lara, donde se han reportado casos severos (Borges y De Sousa, 2006); a los cuales ahora se agrega *T. breweri* (Borges et al., 2010b). Existen estudios que demuestran que el grado de complicación derivada del envenenamiento escorpiónico, depende de la especie involucrada. Tal es el caso que una picadura por *T. zulianus* (estados Mérida y Táchira, Occidente de Venezuela), a menudo, produce complicaciones respiratorias y muerte por edema pulmonar (Borges et al., 2002; Mazzei de Dávila et al., 2002), mientras que el envenenamiento por *T. discrepans* en el norte y centro de Venezuela causa principalmente desórdenes pancreáticos y gastrointestinales (Mota et al., 1994). Lo antes descrito indica la existencia de diferencias estructurales y/o funcionales entre los componentes tóxicos de dichas especies (Borges et al., 2004; Borges et al., 2006a; Borges y De Sousa, 2006).

Composición química y función de las toxinas de escorpiones

Un único veneno de escorpión puede contener entre 100 y 200 componentes de origen polipeptídico, cada uno con propiedades farmacológicas distintas (Possani et al., 1999). Dichos componentes tóxicos presentes en los venenos de algunos géneros de la familia Buthidae, son ricos en polipéptidos que alteran el funcionamiento de canales iónicos que, a su vez, son modulados por el potencial transmembrana, los cuales regulan, en la musculatura esquelética y en los tejidos nerviosos de mamíferos, la contracción muscular y la conducción del impulso nervioso, respectivamente. Este efecto es opuesto a la actividad predominantemente enzimática, hemolítica y/o citolítica, encontrada en venenos de especies de las familias Scorpionidae y Chactidae (Lazarovici et al., 1984). Adicionalmente, se puede mencionar que existen varios tipos de canales voltaje-dependientes, entre los cuales, los específicos para el ión sodio controlan la magnitud del potencial de acción en tejidos excitables de insectos y vertebrados.

De acuerdo con su importancia médica, el veneno de escorpión ha sido clasificado de la siguiente forma: (a) toxinas de cadena larga (entre 60 y 76 aminoácidos), entrelazadas por 3-4 puentes disulfuro, las cuales afectan los canales de sodio sensibles al voltaje presentes en el tejido muscular y nervioso; (b) péptidos de cadena corta (entre 20 y 30 aminoácidos), igualmente entrelazadas por 3-4 puentes disulfuro, los cuales afectan cerca de 100 isoformas diferentes de canales de potasio presentes en varios tejidos y tipos celulares; (c) péptidos con puentes disulfuro que poseen actividad antimicrobiana y fungicida, los cuales forman poros inespecíficos en las membranas plasmáticas de estos organismos; y (d) péptidos que carecen de puentes disulfuro cuyo blanco farmacológico aún no ha sido identificado (Corzo *et al.*, 2001; Moerman *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2005). En menor proporción, existe en estos venenos la enzima hialuronidasa, la cual degrada el ácido hialurónico del tejido conectivo, facilitando la difusión de las toxinas hacia sus blancos farmacológicos desde el sitio de inyección del veneno (Pessini *et al.*, 2001).

Las toxinas de escorpión que afectan los canales de sodio son polipéptidos básicos de 61-76 aminoácidos que pueden ser divididos en dos grupos o clases, α y β , de acuerdo a los efectos fisiológicos y propiedades de acoplamiento (Jover *et al.*, 1980; Couraud *et al.*, 1982; Gordon *et al.*, 1998). Las toxinas α se caracterizan por impedir la inactivación de las corrientes de sodio (Strichartz *et al.*, 1987). Las toxinas β son tipificadas por sus efectos en la activación del canal de sodio; prácticamente ellas cambian la dependencia del voltaje de activación a potenciales de membrana más negativos (Gordon, 1997; Possani *et al.*, 1999).

Leishmaniosis y Tripanosomosis en América del Sur: relevancia clínica y necesidad de nuevas estrategias terapéuticas empleando productos naturales

Los parásitos protozoarios del género *Leishmania*, causan un espectro de enfermedades colectivamente referidas como leishmaniosis (Jorquera *et al.*, 1998), la cual afecta a millones de personas a nivel mundial. Los miembros más representativos de este género son *Leishmania (Viannia) braziliensis*, responsable de la forma mucocutánea de la enfermedad, *Leishmania (Leishmania) mexicana* causante de la leishmaniasis cutánea y *Leishmania (Leishmania) chagasi*, responsable de la forma visceral (OMS, 1990). En los actuales momentos se encuentra bien determinado el ciclo biológico de la leishmania, el cual, inicia con la picadura de un insecto (flebótomo) al hospedero vertebrado con la ingesta de sangre y linfa que contiene amastigotes (forma intracelular del parásito), éstos sufren un cambio progresivo en el tracto digestivo del vector hasta convertirse en una forma alargada que desarrolla un flagelo, los cuales se multiplican por fisión binaria, manteniéndose por un tiempo de ocho a veinte días en su forma infecciosa (promastigotes), hasta el momento en que el vector recurra a alimentarse nuevamente (figura 3).

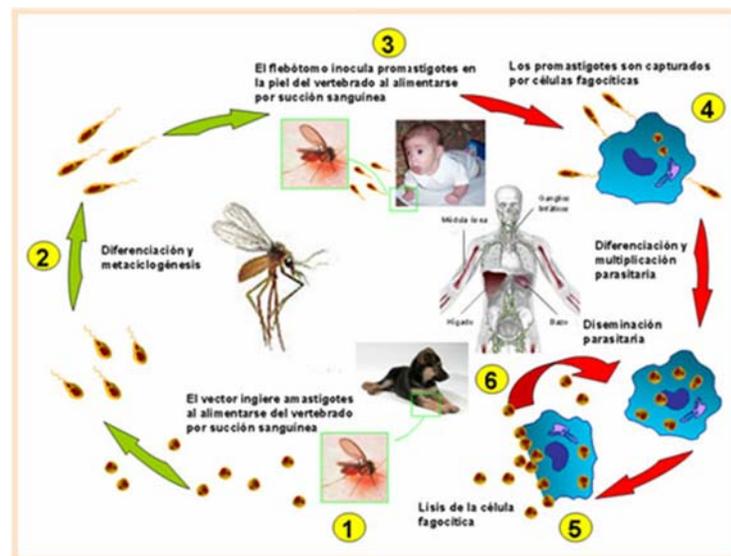


Figura 3. Ciclo de vida de los parásitos del género *Leishmania* y sus diferentes estadios en el vector (mosquito) y en el ser humano.

A pesar de su importancia epidemiológica, no existen estrategias específicas para el tratamiento de cualquiera de sus formas (Croft, 2001). En tal sentido, las corrientes de investigación se dirigen hacia el desarrollo de agentes

quimioterapéuticos como componentes leishmanicidas baratos y menos tóxicos y hacia la búsqueda de componentes anti-*Leishmania* en distintos venenos de origen animal.

Existen estudios sobre el empleo de venenos crudos de serpientes que demuestran inhibición del crecimiento de *Leishmania* spp. y acción tripanocida sobre *Trypanosoma cruzi* (Tempone *et al.*, 2001; Castillo-Vigil *et al.*, 2008). También, se ha demostrado que el veneno de varios grupos filogenéticos de arácnidos son fuentes de proteínas y péptidos tóxicos que poseen actividad antiparasitaria (Kuhn-Nentwig, 2003). En este sentido, los venenos de escorpión también contienen péptidos sin puentes disulfuro con actividad antimicrobiana y antifúngica (Corzo *et al.*, 2001; Moerman *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2005).

En este último sentido, se puede mencionar que siendo los parásitos del género *Leishmania* sensibles a péptidos antimicrobianos o antagonistas de canales iónicos (Borges *et al.*, 2006), es factible el hallazgo de componentes leishmanicidas en los venenos de escorpión como se detalla a continuación.

Especificidad filogenética del efecto de las toxinas de escorpiones; posible empleo como agentes anti-parasitarios

Es conocido el hecho que las toxinas presentes en los venenos de escorpiones son específicas hacia receptores de diferentes grupos animales, vertebrados e invertebrados. Así, existen en estos venenos toxinas específicas contra insectos, mamíferos y crustáceos, lo cual se ha establecido como resultado de la evolución en la relación presa-predador en la historia de los escorpiones. Los canales iónicos sensibles al voltaje, blancos por excelencia de las toxinas de escorpión, aún cuando funcionalmente responden de manera similar independientemente del grupo filogenético, presentan estructuras diferentes, situación que permite una sensibilidad diferencial frente a un mismo fármaco o toxina (Strichartz *et al.*, 1987).

Es de igual importancia la presencia de toxinas en los venenos de escorpión, con capacidad de formar poros inespecíficos en las membranas de organismos, tales como hongos y bacterias, cuyo objetivo es impedir el ataque microbiano y/o fungicida en la glándula del veneno, principal órgano defensivo/ofensivo del escorpión (Corzo *et al.*, 2001; Moerman *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2005).

En vista de la amplia gama de componentes activos contra organismos pertenecientes a varios niveles de la escala evolutiva, resulta de interés explorar la posibilidad que los venenos de escorpiones contengan componentes activos en contra de parásitos flagelados del Orden Kinetoplastida, los cuales son responsables de varias enfermedades terminales en humanos y para las cuales no existen aún terapias específicas y sin efectos colaterales. En este sentido, el empleo de venenos de origen animal como posible fuente de componentes activos en contra de protozoarios nocivos para el hombre es de data reciente. Borges *et al.* (2006b) demostraron que el veneno de *T. discrepans*, especie endémica de la región central de Venezuela, presenta actividad leishmanicida (anti-*Leishmania mexicana mexicana*) asociada a una fracción termolábil de baja masa molecular. En vista de la rápida cinética del efecto leishmanicida (los efectos son evidentes tan pronto como 15 minutos luego de la incubación con el veneno), estos autores han postulado que el efecto del o los componentes activos ocurra a nivel de la membrana plasmática, sin involucrar transporte y efecto ulterior a nivel citoplasmático (Borges *et al.*, 2006b).

En tal sentido, se planteó en este trabajo de investigación, como objetivo principal, caracterizar química y biológicamente los componentes con actividad leishmanicida del veneno de *T. gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae), especie del nororiente del país descrita por Quiroga *et al.* (2004). Por otra parte, existen

evidencias experimentales que demuestran la importante actividad anti-*Leishmania* que presenta el veneno del escorpión *T. gonzalespongai*. Borges *et al.* (2007), en un sondeo de la actividad antiparasitaria de doce venenos de escorpión del género *Tityus*, hallaron que esta especie nororiental, junto con *T. discrepans* y *T. nororientalis*, contiene el veneno con actividad leishmanicida más potente.

Para lograr el objetivo planteado, fue necesario efectuar ensayos con los extractos aislados. Esto se logró mediante la aplicación inicial de cromatografía de exclusión molecular, la cual permitió separar diferentes compuestos activos del veneno de acuerdo a sus masas molares y, finalmente, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa, se obtuvieron los compuestos con mayor actividad del veneno, de menores masas moleculares y de naturaleza catiónica.

METODOLOGÍA

Área geográfica y método de captura de los especímenes de escorpión *Tityus gonzalespongai*

Los ejemplares de *T. gonzalespongai* fueron capturados en el área geográfica que se encuentra ubicada al noreste del estado Anzoátegui, límites con los estados Monagas y Sucre, en el municipio Freites, entre las coordenadas $64^{\circ}22'39''$ y $64^{\circ}22'70''$ W, $10^{\circ}00'44''$ y $10^{\circ}01'17''$ N (GPS Garmin 2 000 E-Trex^R). La localidad de captura se encuentra en la hacienda cafetalera La Orquídea (cerro La Laguna, 1 600 m de altitud). Esta hacienda dista unos 4,8 km del caserío La Piedra de Mundo Nuevo, parroquia Libertador (figura 4).

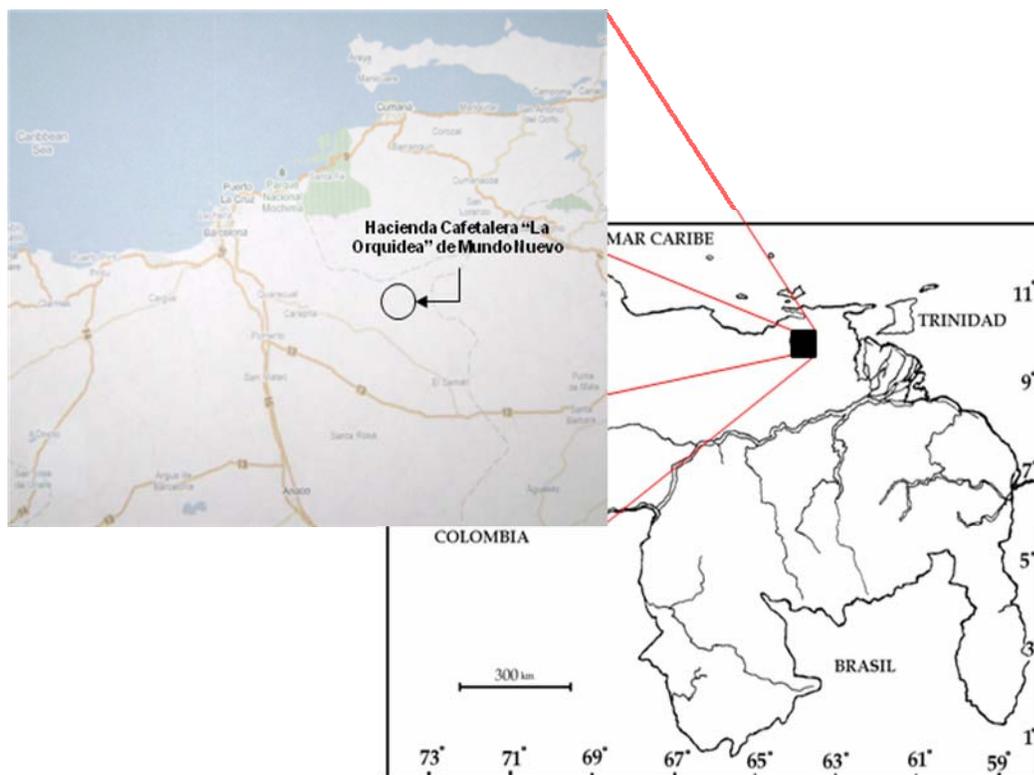


Figura 4. Mapa de coordenadas para la ubicación de la zona de captura de especímenes de *Tityus gonzalespongai*.

Los ejemplares fueron localizados durante el día bajo troncos, en el interior de la corteza desprendida de los árboles y en la base de plantas de

cafeto (*Coffea arabica*). Durante la noche, se utilizaron lámparas portátiles de luz ultravioleta. Posteriormente, fueron trasladados al laboratorio, donde se mantuvieron vivos para la extracción de veneno (De Sousa, 2006).

Los ejemplares se ingresaron, depositaron y catalogaron como material de referencia en la Colección de Escorpiones del Laboratorio de Toxinología (CELT), Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui (De Sousa *et al.*, 2009). Se capturó un total de 153 ejemplares de *T. gonzalespongai* adultos.

Obtención del veneno de escorpión *Tityus gonzalespongai*

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica, según técnica desarrollada en el Laboratorio de Alacranología, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Bolívar, Universidad de Oriente (Quiroga *et al.*, 1982). Cada ejemplar se colocó sobre una rejilla metálica (humedecida para garantizar un buen contacto con el artrópodo) y se sujetó el extremo caudal con un electrodo ubicado en la región intersegmental (entre el V segmento caudal y el telson), cerrando el circuito eléctrico (tanto la rejilla como el electrodo de estimulación estaban conectados a un Neuroestimulador (PHIPPS-BIRD, modelo 611) (figura 5B). Los estímulos eléctricos presentaron las siguientes características: pulsos rectangulares (6 pulsos/s), de 100 ms de duración y 30 V/pulso.

La estimulación se realizó aplicando de 5 a 8 trenes de pulso entre 10 y 20 segundos cada uno, que dependió de la cantidad de veneno expulsado por cada escorpión.

El veneno eyectado desde el acúleo, de ejemplares machos y hembras, fue recogido, de forma separada, en tubos capilares de 100 μ l de capacidad y, luego, transferidos a tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad y preservado en

refrigeración a -20°C , hasta el momento de su procesamiento. El veneno del escorpión *T. discrepans* empleado en la comparación del daño estructural producido por éste y por el veneno de *T. gonzalespongai* fue gentilmente cedido por el Dr. Adolfo Borges, quien lo obtuvo de ejemplares colectados en San Antonio de Los Altos, estado Miranda.



Figura 5. Técnica de estimulación eléctrica del telson para la extracción del veneno de escorpión *Tityus gonzalespongai* de acuerdo a la técnica de Quiroga *et al.* (1982).

Procesamiento de las muestras del veneno de *Tityus gonzalespongai*

El veneno crudo fue resuspendido en 1 ml de agua bidestilada y agitado en Vortex (Super-Mixer^R), consecutivamente, se centrifugó a 14 000 rpm (centrífuga Labnet para tubos Eppendorf, modelo Z180M) por 20 minutos. Luego, la fracción soluble del veneno fue transferida a tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad y preservado en refrigeración a -20°C , hasta el momento de su procesamiento. El sedimento, con detritos celulares y moco, fue descartado (De Sousa, 2006).

Cuantificación de la cantidad total de proteínas del veneno *Tityus gonzalespongai*

Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble del veneno (obtenida por centrifugación). Se efectuó una dilución de 1/20 del

veneno crudo en agua bidestilada, y se determinó su concentración de proteínas mediante el método de Lowry *et al.* (1951), la cual consistió en añadir a una alícuota de la dilución del veneno, 2,5 ml de una solución alcalina de cobre (Cu^{2+}), previamente preparada antes del ensayo, compuesta por carbonato de sodio al 2% m/V (preparada en 0,1 mol/l hidróxido de sodio), sulfato de cobre pentahidratado al 1% (m/V), tartrato de sodio y potasio al 1% (m/V). Seguidamente, se procedió a agitar la muestra. Posteriormente, se añadieron 250 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico), agitando vigorosamente y dejando en baño de maría a 37°C por 10 min. Finalmente, se dio lectura a las mismas en el espectrofotómetro (Beckman DU 640) (Figuras 6A y 6B), a una longitud de onda de 750 nm.

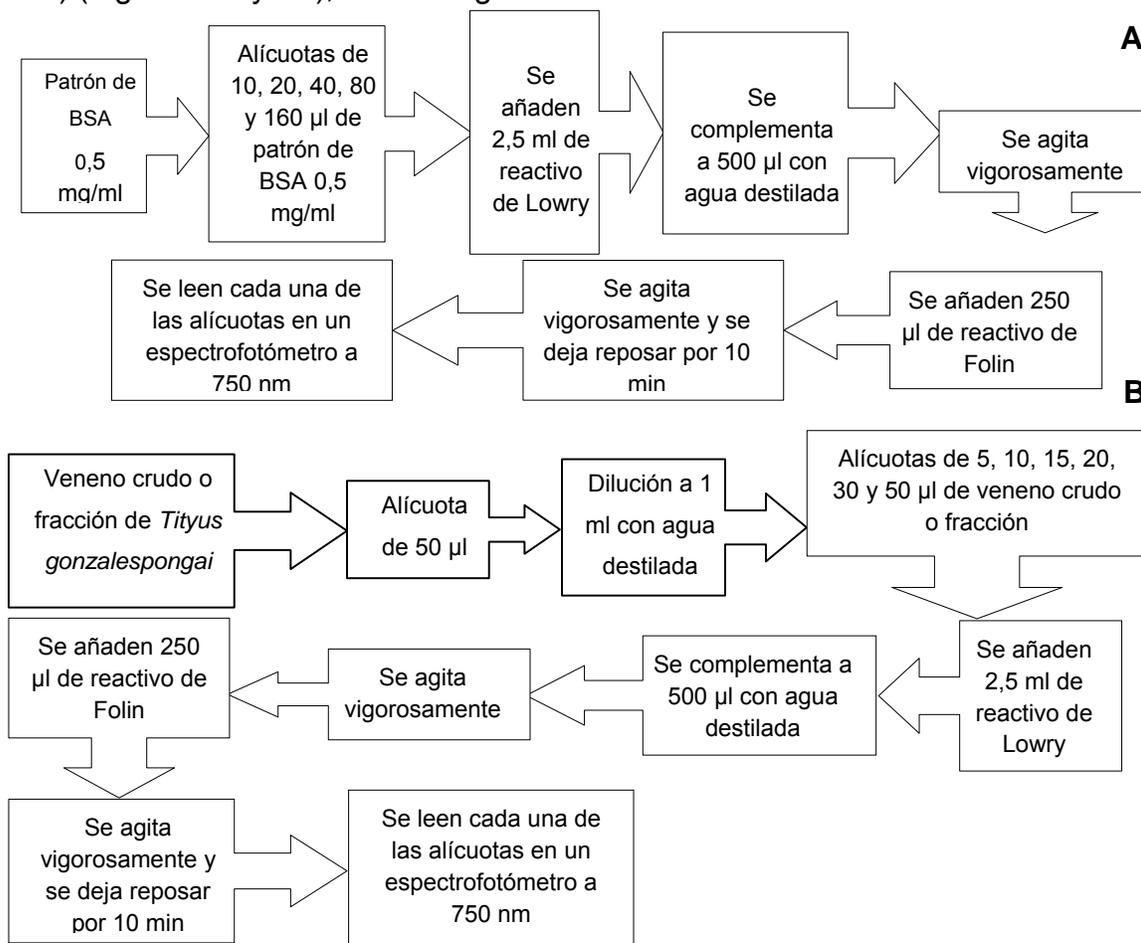


Figura 6. Técnica para cuantificación de proteínas según Lowry *et al.* (1951). (A) Dilución del patrón de BSA. (B) Cuantificación del veneno crudo o fracción de *Tityus gonzalespongai*.

La concentración de proteínas en las muestras de veneno fue determinada mediante comparación con una curva de calibración, simultáneamente elaborada mediante diluciones seriadas de un patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemicals) de 0,5 mg/ml (Figura 7). La muestra del veneno y su dilución fueron liofilizadas (Liofilizador Labconco) y almacenadas a -20°C , hasta su uso en las pruebas cromatográficas y de actividad biológica.

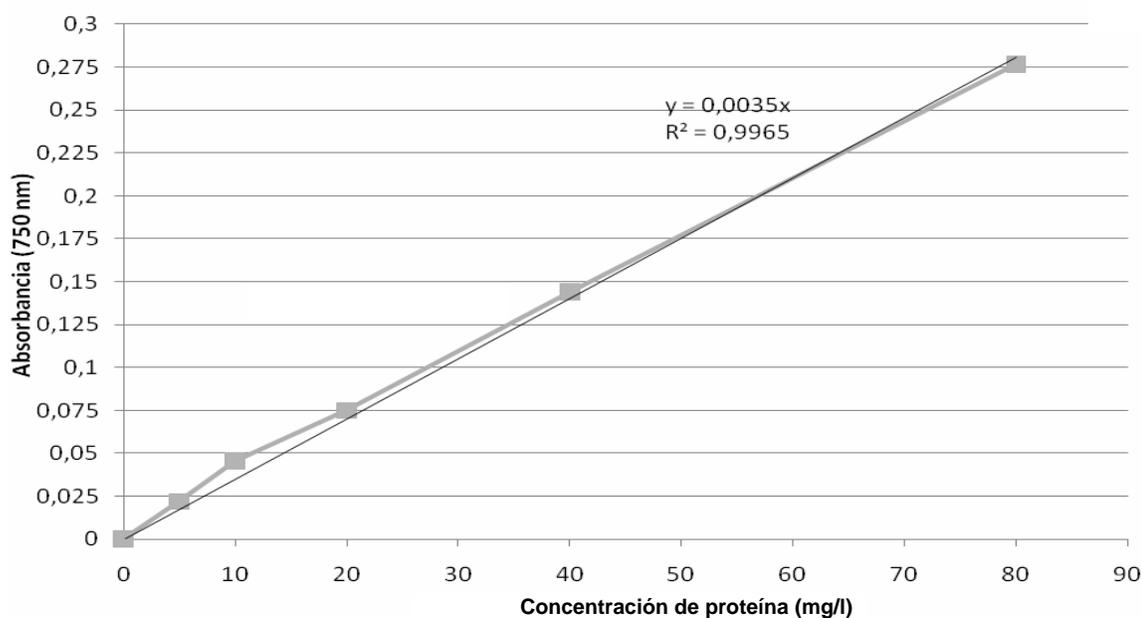


Figura 7. Curva de calibración típica, obtenida durante este trabajo, empleando BSA como estándar de acuerdo al procedimiento precedente.

Separación por cromatografía de exclusión molecular de las proteínas de la fase acuosa del veneno de *Tityus gonzalespongai*

El veneno crudo (5 mg de proteína) fue eluido en una columna de 0,9 cm (diámetro) x 50 cm (altura), a un flujo de 19 ml/h, empacada con Sephadex G-50 como fase estacionaria, y como fase móvil una solución amortiguadora de acetato de amonio 20 mmol/l a pH 4,7. Las proteínas eluidas se detectaron mediante lectura de absorbancia a 232 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640) (Figuras 8).

Las fracciones se agruparon según el perfil del cromatograma. Cada una de estas fracciones proteicas agrupadas, fueron sometidas a liofilización y posteriormente rehidratadas, para luego evaluar su actividad leishmanicida, de acuerdo con el método de Borges *et al.* (2006a). Las concentraciones de proteínas de las fracciones a ensayar se determinaron usando la técnica de cuantificación de proteínas de Lowry *et al.* (1951), descrita en la sección precedente.

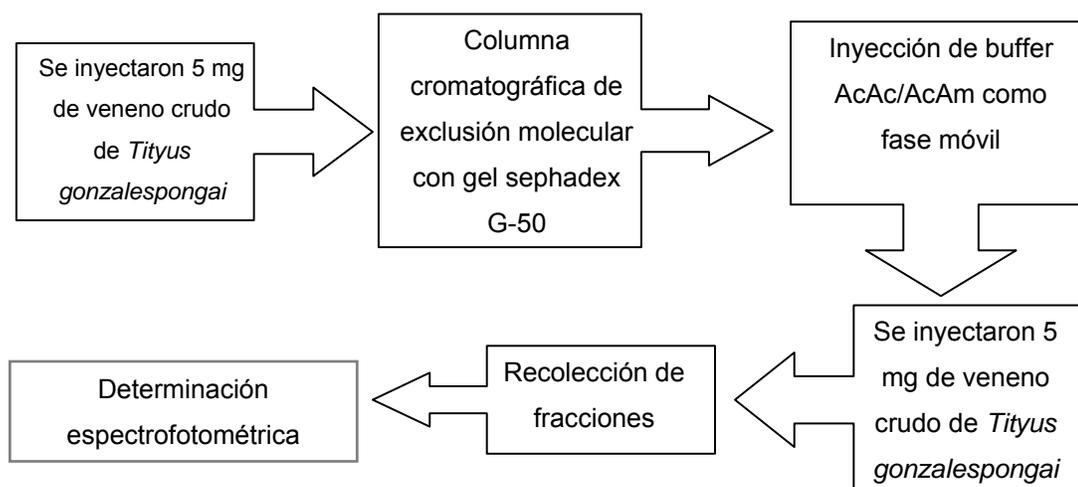


Figura 8. Técnica de separación de proteínas del veneno de *Tityus gonzalespongai* por cromatografía de exclusión molecular.

Separación de los péptidos leishmanicidas del veneno de *Tityus gonzalespongai* mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC) en fase reversa

Una vez identificadas las fracciones derivadas de la exclusión molecular con actividad leishmanicida, se procedió a purificar las proteínas bioactivas mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC) en fase reversa, empleando para ello un cromatógrafo WatersTM [(996 Photodiode Array Detector) (600 Controller) (717 Plus Autosampler)] y utilizando una columna analítica C-18 de fase reversa (Figura 9).

La cromatografía se efectuó aplicando un gradiente lineal, con el uso de las siguientes soluciones: solvente A = ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en

agua; B = 100% acetonitrilo preparado en 0,1% TFA). El gradiente fue el siguiente: 0-10% B (5 min), 10-90% B (110 min), 90-100% B (5 min), 100-0% B (5 min). La corrida se realizó a temperatura ambiente a un flujo de 0,4 ml/min y presión aproximada de 528 psi.

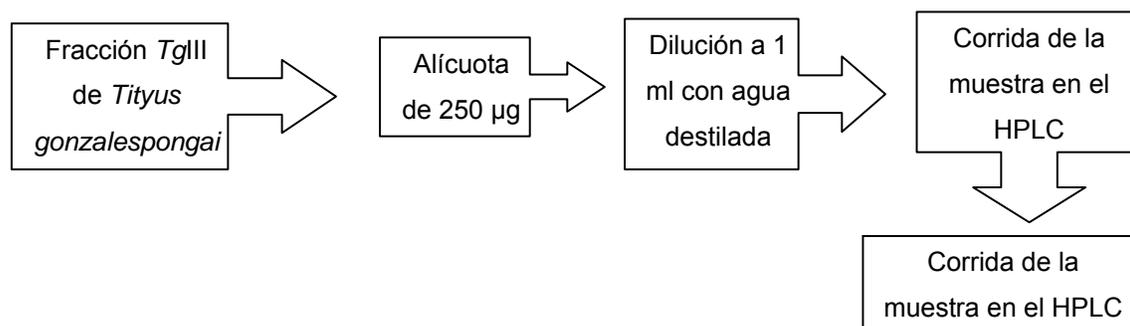


Figura 9. Técnica de separación de proteínas del veneno de *Tityus gonzalespongai* por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

La detección de los componentes proteicos aislados se realizó mediante lectura espectrofotométrica con sistema de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 232 nm (De Sousa, 2006). Las fracciones activas fueron liofilizadas, reconstituidas en agua bidestilada y almacenadas a -20°C antes de proceder a evaluar su actividad leishmanicida.

Determinación de la composición del veneno y sus fracciones mediante métodos electroforéticos

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida fue realizada según el método de Laemmli (1970). Las muestras se desnaturalizaron mediante la aplicación de calor en presencia de beta-mercaptoetanol a alícuotas de cada fracción o del veneno crudo; posteriormente fueron colocadas en los pozos del gel de apilamiento de poliacrilamida, para luego realizar la corrida a corriente constante en gel de resolución de poliacrilamida al 15,0 % (m/V), usando

solución amortiguadora de corrida compuesta de una solución de tris-glicina-dodecil sulfato de sodio (Figura 10).

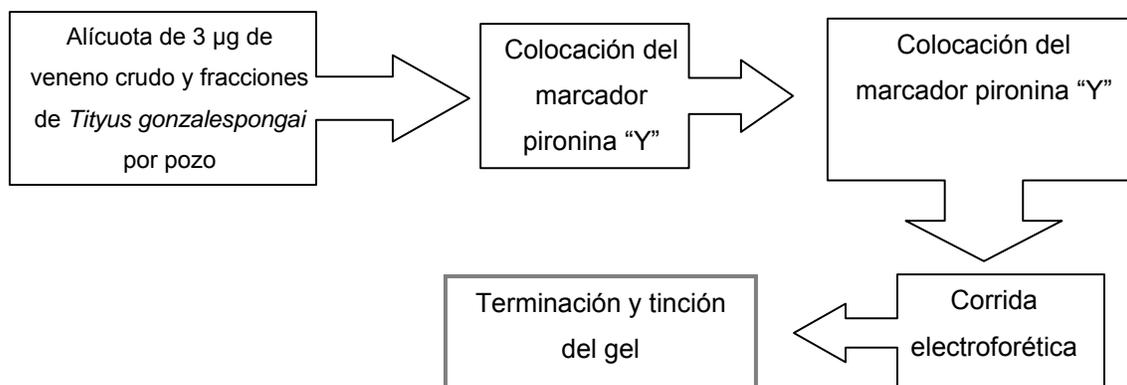


Figura 10. Técnica de electroforesis de gel de poliacrilamida de proteínas del veneno de *Tityus gonzalespongai*.

Al finalizar la corrida, los geles fueron inmediatamente revelados por el método de tinción con plata, el cual consistió en lavar por 20 min el gel y luego sumergirlo en una solución de AgNO_3 12 mmol/l por 30 min, siendo lavado posteriormente con agua bidestilada, finalmente la reducción se efectuó por 6 min con solución de NaOH 0,75 mol/l en formaldehído al 0,76% deteniendo el revelado con solución de ácido acético al 5%. Finalmente, se registraron digitalmente los geles para su interpretación.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de urea/ácido acético

A fin de mejorar la resolución de los componentes proteicos catiónicos de similar masa molecular pero que difieren en carga, presentes en las fracciones bioactivas derivadas de HPLC, se realizaron corridas electroforéticas en presencia de urea y ácido acético de acuerdo al método de Wang *et al.* (1997). Con este propósito se elaboraron geles al 12,5 % de acrilamida en presencia de 5 mol/l urea y ácido acético al 5% (V/V). La solución de corrida electroforética fue 5% ácido acético (V/V). Las muestras fueron disueltas en una solución compuesta de 5% (V/V) ácido acético, 3 mol/l urea y el colorante pironina "Y"

como indicador de la migración electroforética. Luego de efectuada la separación los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie como fue indicado en la sección precedente para las electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Evaluación de la toxicidad de los peptidos del veneno de *Tityus gonzalespongai* sobre promastigotes de *Leishmania*

Se ensayó el efecto del veneno total del escorpion *T. gonzalespongai* en el crecimiento de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana mexicana* (cepa MHOM/BZ/82/BEL21). Los parásitos se mantuvieron a 26°C, cultivados en el medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) (Laboratorios Difco, Detroit MI) por cuatro (4) días, y, luego, se utilizaron los promastigotes para la determinación de la toxicidad sobre el parásito. La toxicidad del veneno sobre promastigotes fue ensayada empleando cultivos exponenciales (500 000 parásitos) obtenidos como se describió anteriormente. Las células fueron resuspendidas en 200 µl de NaCl 0,85% (m/V) en presencia de 35 µg/ml de veneno de *T. gonzalespongai* por triplicado, colocados en placas tipo *multiwell* de 96 pozos con fondo plano (Becton Dickinson, New Jersey, EEUU) durante 1 h a 26°C (figura 11). La viabilidad del parásito fue evaluada mediante tinción con azul de tripano (0,4% en solución salina), en vista que este colorante tiñe exclusivamente células muertas o en proceso de necrosis.

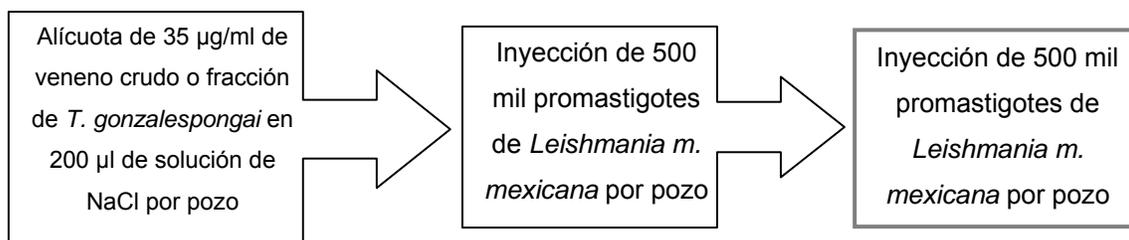


Figura 11. Técnica de evaluación de toxicidad de proteínas del veneno de *Tityus gonzalespongai* en cultivos de promastigotes de *Leishmania m. mexicana*.

El efecto leishmanicida se calculó determinando el número de células muertas por efecto de la exposición al veneno o a sus fracciones y determinando luego el porcentaje de mortalidad con base al número inicial de células presentes en el medio de ensayo.

Caracterización química de los componentes escorpiónicos leishmanicidas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La fracción HPLC-13 fue analizada mediante la técnica de desorción/ionización en matriz inducida por láser con detección por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) en un espectrofotómetro de masa marca Biflex III (Bruker, FRG) (figura 12).

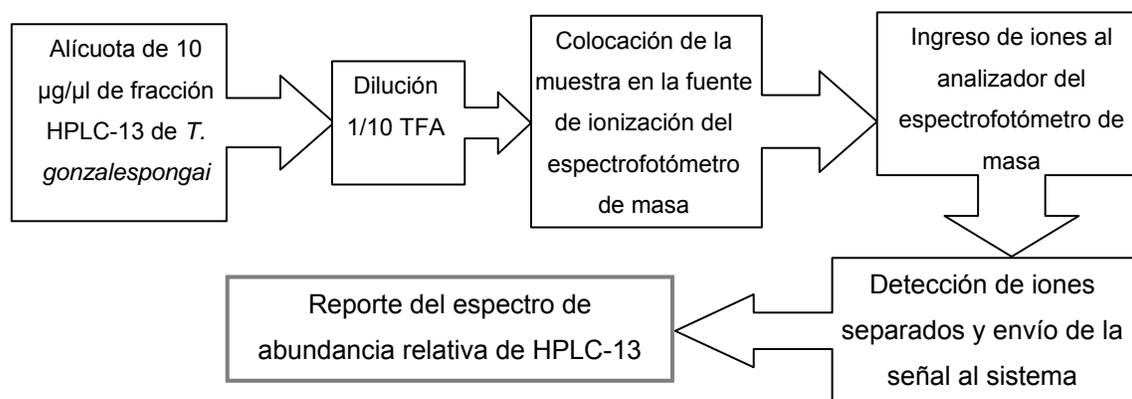


Figura 12. Determinación de la masa molecular de los componentes HPLC-13 del veneno de *Tityus gonzalespongai* mediante espectrometría de masas por el método de MALDI-TOF.

Para este fin se utilizaron 1 µg de la fracción HPLC-13, que luego fue resuspendida en 100 µl de agua MilliQ y diluida en un volumen de 1/10 con 0,1% (V/V) de ácido trifluoroacético (TFA).

RESULTADOS

El estudio de la caracterización química y biológica de la actividad leishmanicida del veneno del escorpión *T. gonzalespongai* arrojó los siguientes resultados:

Cuantificación de la cantidad total de proteínas del veneno crudo de *Tityus gonzalespongai*

Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble del veneno crudo, según el método de Lowry *et al.* (1951) (Tabla 1), a partir de la cantidad total de veneno liofilizado y pesado (balanza analítica digital, Marca Denver Instrument, Modelo APX-60).

Debe señalarse que los datos totalizan tres extracciones consecutivas efectuadas sobre el mismo lote de escorpiones, obteniéndose finalmente los siguientes resultados, mostrándose que el veneno producido por estimulación eléctrica disminuye en cautiverio.

Tabla 1. Concentración de proteínas del veneno crudo de *Tityus gonzalespongai*, por extracción.

Nº Extracción	Masa de veneno (mg)	Volumen (ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)
1	30,2378	2,0	15,119
2	85,9706	6,0	14,33
3	46,5220	5,0	9,304
TOTAL	162,7304	13,0	

Cromatografía de exclusión molecular de las proteínas de la fase acuosa del veneno de *Tityus gonzalespongai*

El veneno crudo fue eluido en una columna cromatográfica usando Sephadex G-50 como fase estacionaria, y como fase móvil una solución amortiguadora de acetato de amonio. Las proteínas eluidas se detectaron mediante lectura de absorbancia a 232 nm en un espectofotómetro.

Las fracciones se agruparon según el perfil del cromatograma (figura 13) y su composición evaluada mediante electroforesis en condiciones disociantes (en presencia de SDS).

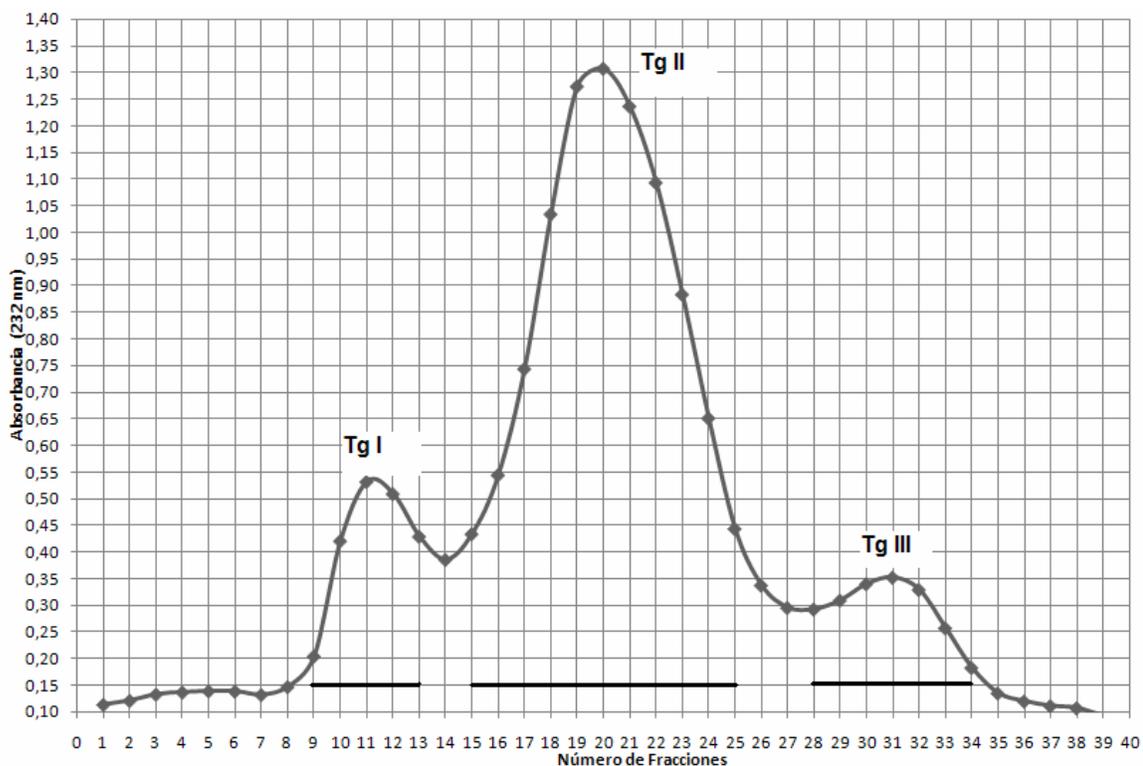


Figura 13. Cromatograma de exclusión molecular de las proteínas en fase acuosa del veneno fraccionado de *Tityus gonzalespongai*, indicando las fracciones obtenidas. Las barras de la parte inferior indican las fracciones reunidas en cada grupo. El cromatograma es representativo de las 17 corridas cromatográficas realizadas.

Se obtuvieron tres fracciones, de las cuales la dos (*TgII*) representó el mayor porcentaje (78%) de los componentes eluidos, conteniendo proteínas con masa molecular menor a $14,4 \times 10^3$ g/mol (figura 14).

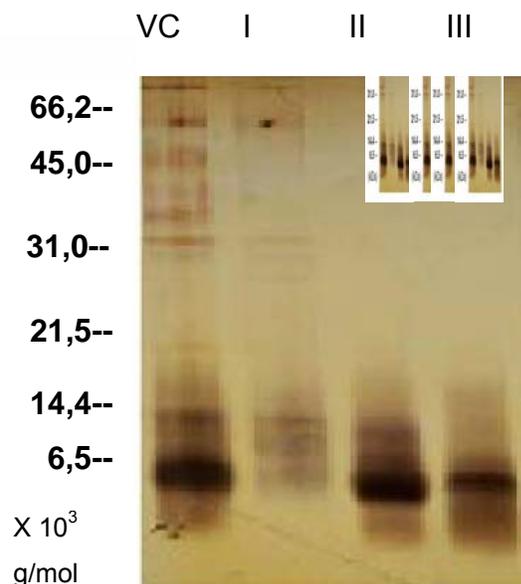


Figura 14. Electroforesis del veneno crudo de *Tityus gonzalespongai* (VC), primera fracción (*TgI*), segunda fracción (*TgII*) y tercera fracción (*TgIII*) en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones disociantes.

Por otra parte, la fracción *TgI* presenta una composición de proteínas más heterogénea, comprendiendo componentes de alta y baja masa molecular. La fracción tres (*TgIII*) presentó el menor porcentaje (6,3%), con proteínas de masa molecular inferior a $14,4 \times 10^3$ g/mol (tabla 2).

Se efectuaron diecisiete (17) corridas cromatográficas con una cantidad total de 85 mg de proteína sujeta a fraccionamiento, de acuerdo a lo establecido en la metodología y con el objetivo de obtener la cantidad de fracción de veneno necesario para los ensayos cromatográficos y de actividad biológica posteriores.

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de las fracciones protéicas en fase acuosa del veneno fraccionado de *Tityus gonzalespongai*.

Masa total de veneno sujeto a fraccionamiento (mg)	Fracción	Masa de la fracción (mg)	% de rendimiento
5	TgI	0,488	9,76
	TgII	3,900	78,00
	TgIII	0,315	6,30

Evaluación del efecto estructural del veneno de *Tityus gonzalespongai* sobre promastigotes de *Leishmania m. mexicana*

Se observó el efecto del daño celular ocasionado por la exposición del veneno de *T. gonzalespongai* sobre promastigotes de *Leishmania m. mexicana* en un lapso de 1 h (figura 15), en la cual se evidencia la magnitud de la acción de los componentes leishmanicidas en comparación con el veneno de *T. discrepans*, ambos ensayados a la misma concentración (35 µg/ml).

Los paneles **a** y **b** muestran promastigotes controles, en medio isotónico (NaCl 0,85% m/V), mostrando la morfología elipsoide con estructura flagelar típica de la forma extracelular del parásito. Los paneles **c** y **d** muestran parásitos muertos por efecto de la incubación con los venenos, representativos de varios campos de observación al microscopio de luz, evidenciándose el colapso de la estructura luego del período de incubación.

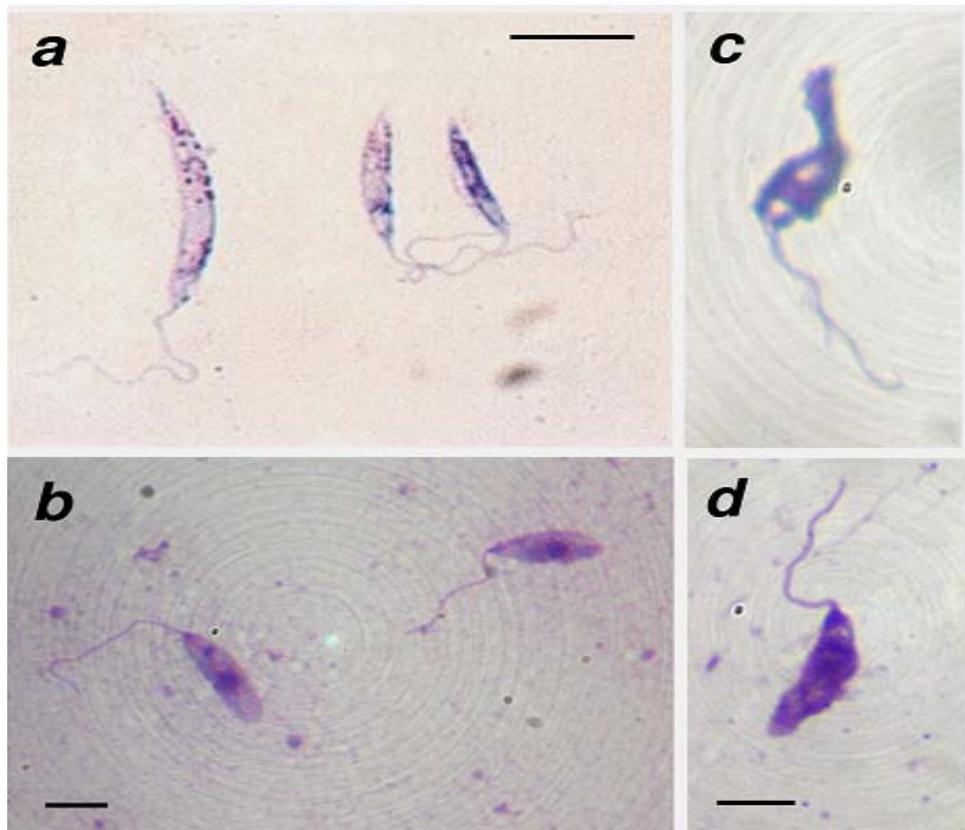


Figura 15. Efectos estructurales en promastigotes de *L. m. mexicana* incubados con los venenos de *Tityus discrepans* y *Tityus gonzalespongai* (1 h, 35 $\mu\text{g/ml}$). (a,b) promastigotes incubados en solución salina isotónica. (c) promastigotes incubados con veneno de *Tityus gonzalespongai*. (d) promastigotes incubados con veneno de *Tityus discrepans*. Las barras corresponden en todos los casos a 1 μm (c = d).

Evaluación de toxicidad de los componentes proteicos del veneno de *Tityus gonzalespongai* sobre promastigotes de *Leishmania m. mexicana*

Se probó el efecto de toxicidad de las fracciones *Tgl*, *TgII* y *TgIII*, obtenidas por cromatografía de exclusión molecular y del veneno total de *T. gonzalespongai* en el crecimiento de promastigotes de *L. m. mexicana* resuspendidas en 200 μl de NaCl 0,85% (m/V) complementado con 35 $\mu\text{g/ml}$ de veneno de *T. gonzalespongai* (figura 16).

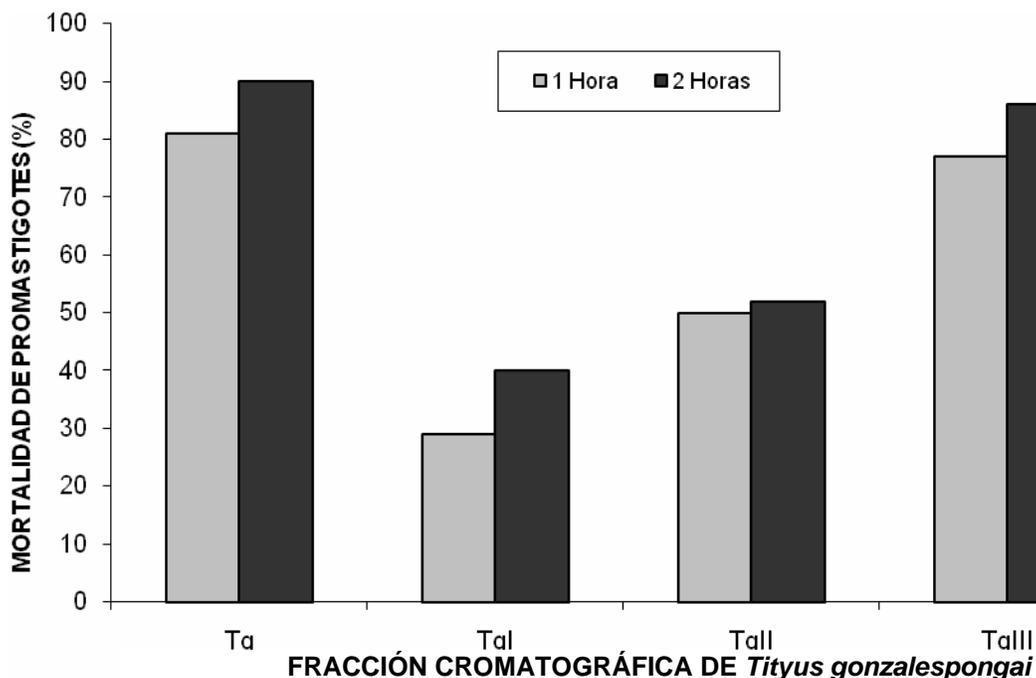


Figura 16. Mortalidad de promastigotes de *Leishmania m mexicana* por acción de los componentes proteicos fraccionados y del veneno crudo de *Tityus gonzalespongai*.

Se determinó que la fracción tres (*TgIII*) presentó el mayor efecto leishmanicida, con 77% de mortalidad para la primera hora y 86% para la segunda hora de observación, en comparación a un 81% y 90% de mortalidad respectivamente, para el veneno crudo, lo que indicaría una mayor actividad leishmanicida del veneno crudo y de la fracción *TgIII* en función del tiempo.

Fracionamiento de *TgIII* mediante cromatografía líquida a alta presión (HLPC) en fase reversa

Una vez que se hubo determinado que *TgIII* presentaba la actividad leishmanicida más elevada entre todas las fracciones obtenidas por exclusión molecular, se procedió a aislar sus proteínas bioactivas por cromatografía líquida a alta presión (HPLC) en fase reversa, utilizando una columna analítica C-18 (figura 17).

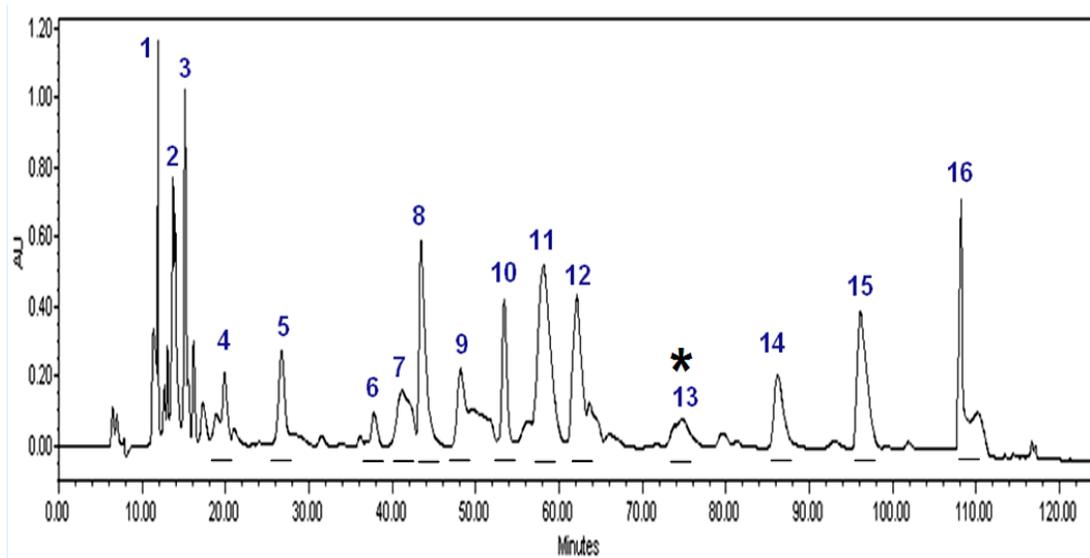


Figura 17. Cromatograma obtenido mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC) de la fracción *TgIII* de *Tityus gonzalespongai*. Las barras en la parte inferior del cromatograma indican las fracciones que fueron reunidas para la preparación y posterior liofilización de cada subfracción. El asterisco (*) indica la fracción HPLC-13, la cual corresponde a un componente peptídico con potente actividad leishmanicida (véase sección siguiente).

Luego de esta separación, se obtuvieron 16 subfracciones, denominadas desde HPLC-1 hasta HPLC-16. Cada una de las mismas fue posteriormente liofilizada a fin de ensayar su actividad biológica, como se describe a continuación.

Evaluación de la toxicidad de los péptidos derivados de *TgIII* sobre promastigotes de *Leishmania m. mexicana*

Se ensayó la toxicidad de las subfracciones obtenidas por HPLC en fase reversa del veneno de *T. gonzalespongai* en promastigotes de *L. m. mexicana* resuspendidas en 200 μ l de NaCl 0,85% (m/V), pudiéndose determinar que la subfracciones HPLC-13 y HPLC-14 presentaron el efecto leishmanicida más elevado (figura 18), con 100% y 80% de mortalidad respectivamente. Cabe destacar que tan elevado efecto fue obtenido con sólo 1 hora de incubación y a una concentración de 1 μ g/ml en el caso de ambas subfracciones.

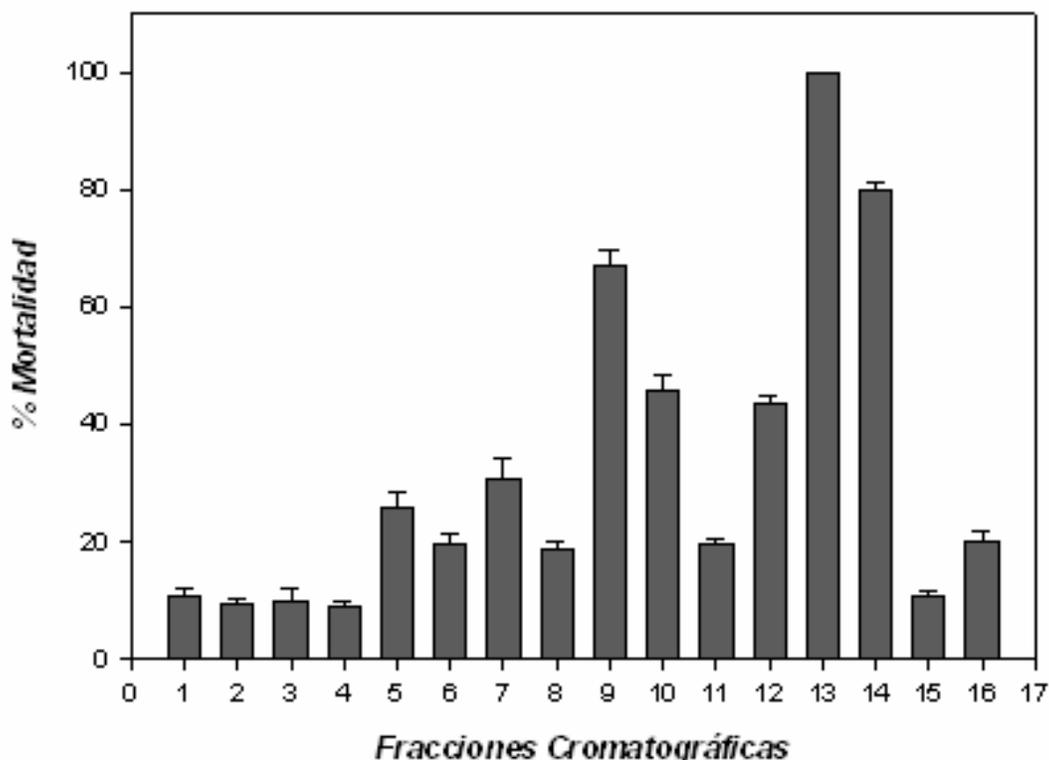


Figura 18. Actividad leishmanicida de las subfracciones de *TgIII* obtenidas mediante HPLC evaluada a través del porcentaje de mortalidad en promastigotes de *L. m. mexicana*.

HPLC-13 corresponde al 2,8% del total del material eluído de la columna de fase reversa, con base al cálculo del área bajo la curva del cromatograma.

Evaluación de la composición de la subfracción HPLC-13 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea / ácido acético

Con la finalidad de determinar la composición peptídica de la subfracción HPLC-13 y su comparación con otros estadíos de la purificación de los componentes leishmanicidas, se sometieron a electroforesis en urea/ácido acético alícuotas de la subfracción, del veneno crudo y la fracción *TgIII*. En vista de lo escaso del material disponible y de la más elevada actividad de HPLC-13, se decidió investigar su composición y postergar la evaluación de la subfracción

HPLC-14 para futuras investigaciones. La figura 19 muestra que HPLC-13 contiene un único componente peptídico que corresponde con los componentes más catiónicos del veneno crudo y de la fracción de exclusión molecular *TgIII*.

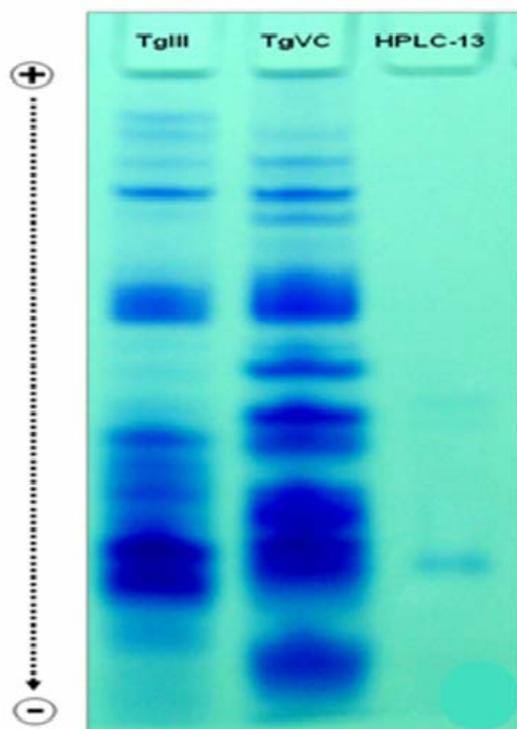


Figura 19. Composición peptídica de la subfracción HPLC-13 del veneno de *Tityus gonzalespongai* (1 μg) en comparación con el veneno crudo de *Tityus gonzalespongai* (15 μg) y la fracción *TgIII* (15 μg) mediante electroforesis de poliacrilamida en urea / ácido acético.

Determinación de la masa molecular de los componentes leishmanicidas presentes en la subfracción HPLC-13 mediante MALDI-TOF

El análisis espectrométrico de la subfracción HPLC-13 mediante MALDI-TOF mostró la presencia de un componente mayoritario con una masa molecular de 6 880,97 g/mol (figura 20). La presencia de este componente mayoritario corresponde con la presencia de una única banda electroforética en la figura 18, evidencia que testimonia la pureza de la subfracción para futuras pruebas de actividad biológica.

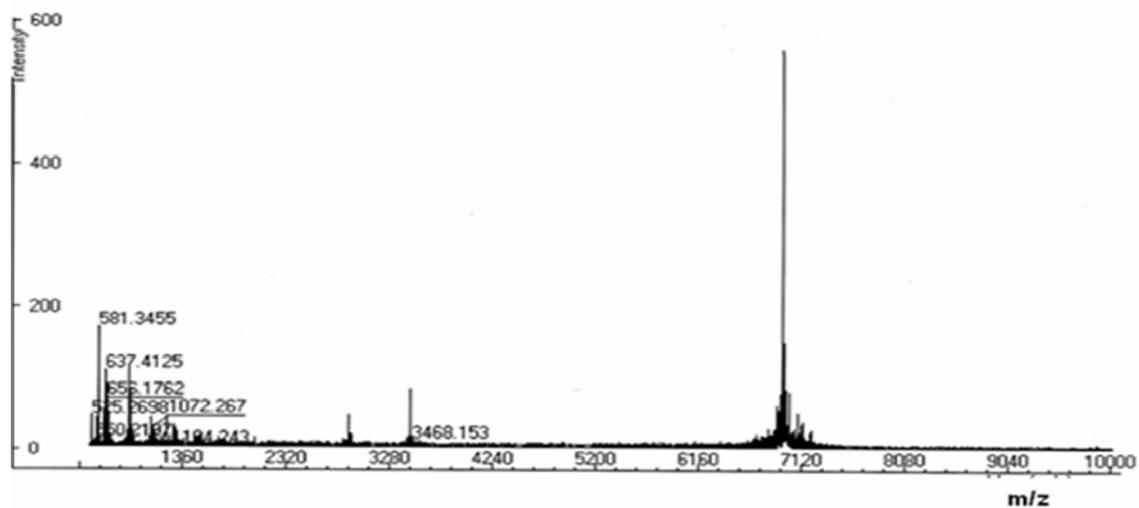


Figura 20. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) de la subfracción HPLC-13, obtenida de la fracción *TgIII* del veneno de *Tityus gonzalespongai*. En el eje de las abscisas se indica la intensidad relativa de la señal y en el eje de las ordenas la relación masa/carga (m/z).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante el curso de este trabajo revelan que el veneno del escorpión venezolano *T. gonzalespongai* contiene componentes de naturaleza proteica que poseen un potente efecto leishmanicida, produciendo la muerte de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana mexicana* 1 h luego de su incubación con extractos del veneno y con fracciones cromatográficas derivadas del mismo. Estas evidencias confirman hallazgos previos que señalan que algunos de los venenos de los escorpiones venezolanos contienen componentes con elevada actividad antiparasitaria (Borges *et al.*, 2006, 2007).

El hecho que la actividad leishmanicida de *T. gonzalespongai* esté asociada a los componentes del veneno con menor masa molecular, los cuales eluyen en la fracción cromatográfica *TgIII* obtenida mediante exclusión molecular, tiene un paralelo con los resultados previamente obtenidos por Borges *et al* (2006) en un estudio realizado con el veneno de *T. discrepans*, el cual indica que el efecto leishmanicida del mismo está asociado con componentes termolábiles con masas moleculares menores a $14,4 \times 10^3$ g/mol. En dicha investigación se muestran resultados relativos a la separación del veneno crudo mediante cromatografía en Sephadex G-50, obteniéndose tres fracciones (*TdI*, *TdII* y *TdIII*) cuya actividad leishmanicida fue posteriormente evaluada, dando como resultado que la fracción *TdII* fuera la más activa, produciendo 76% de mortalidad de los parásitos incubados.

El hecho que en el caso de *T. gonzalespongai* la fracción *TgIII* haya resultado la de mayor actividad leishmanicida en comparación con *TgII* indica la existencia de posibles diferencias en términos estructurales y/o de actividad entre los componentes antiparasitarios de *T. discrepans* y los producidos por la especie oriental, las cuales deberán ser objeto de futuras investigaciones. Por otra parte, evidencias obtenidas por Borges *et al.* (2006) mediante microscopía

electrónica indican que los componentes del veneno de *T. discrepans* con actividad leishmanicida producen intensa vacuolización, aumento del volumen del bolsillo flagelar y muerte de promastigotes de *Leishmania (L.) m. mexicana* 30 minutos luego de su incubación con extractos del veneno y con sus fracciones cromatográficas activas. La rapidez del efecto y la magnitud de los daños producidos fueron interpretados por los autores como indicio que los componentes leishmanicidas posiblemente actúen a nivel de la membrana plasmática del parásito. Este igualmente podría ser el caso para el veneno de *T. gonzalespongai*, cuyo efecto sobre leishmania posee una cinética similar a la obtenida en el caso de *T. discrepans*.

El mecanismo de acción de los componentes del veneno responsables de este efecto está aún por ser dilucidado. Sin embargo, el hecho que Borges *et al.* (2006) hayan reportado que a las concentraciones a las cuales se observa el efecto antiparasitario (35 µg/ml) no fue observada citotoxicidad en células de mamífero (tales como células de feocromocitoma humano y células de endotelio de cordón umbilical) indicaría que el efecto de los venenos de escorpión sobre *Leishmania* está probablemente asociado a componentes de alta especificidad.

Una vez que las moléculas responsables del efecto detectado en este trabajo y en los reportes publicados por Borges *et al.* (2006, 2007) hayan sido caracterizadas más extensamente, será posible plantearse si las mismas servirán de modelo para el diseño racional de drogas más efectivas para el tratamiento de las diferentes manifestaciones de la Leishmaniasis.

En este sentido, a pesar de la importancia epidemiológica de esta enfermedad, de las diferencias en susceptibilidad *in vivo* e *in vitro* de las diferentes especies de *Leishmania* al tratamiento con fármacos convencionales que producen, por otra parte, severos efectos secundarios, y del fenómeno de la resistencia parasitaria (reportado en el caso de los antimoniales

pentavalentes; Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997), hasta el presente no existen estrategias efectivas diseñadas para una terapia especie-específica o para el abordaje integral de estas enfermedades. A pesar de la existencia de drogas alternativas, tales como la anfotericina B y el miltefosine (Sundar *et al.*, 1998; Herwaldt, 1999), existe necesidad real para el desarrollo de drogas con novedosos mecanismos de acción en donde se minimicen los efectos sobre el ser humano. El hecho que los componentes leishmanicidas del veneno de *T. discrepans* sean capaces de distinguir entre *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* y *L. (L.) m. mexicana*, especies responsables de las Leishmaniasis mucocutánea, visceral y cutánea, respectivamente, indica que es posible aislar y caracterizar proteínas o péptidos leishmanicidas con diferente tropismo hacia estas especies, las cuales responden con distinta susceptibilidad frente al mismo veneno (Borges *et al.*, 2006).

Nuestras investigaciones se sitúan entre los esfuerzos recientes tendientes a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos menos tóxicos y más específicos para el tratamiento de las Leishmaniasis, denominados compuestos leishmanicidas naturales, derivados de venenos de algunas especies animales. Así por ejemplo, el veneno crudo de la serpiente *Bothrops mojeni* ha demostrado un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Leishmania* spp. en asociación con el peróxido de hidrógeno generado a partir de la actividad de la enzima L-amino ácido oxidasa (Tempone *et al.*, 2001). Igualmente, se han comprobado efectos inhibitorios del veneno de serpientes de los géneros *Cerastes* y *Vipera* sobre la especie *L. donovani infantum* (Fernández-Gómez *et al.*, 1994) y los de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoides nummifer* y *Atropoides picadoi* acción tripanocida sobre las formas epimastigoto, amastigoto y tripomastigoto de *Trypanosoma cruzi*; mostrando cada veneno toxicidad diferencial sobre las distintas formas morfológicas del parásito y de las cepas evaluadas (Castillo-Vigil *et al.*, 2008).

Paralelamente, existen evidencias que documentan la toxicidad ejercida por proteínas y péptidos obtenidos del veneno de artrópodos sobre diversos grupos animales, con una elevada especificidad filética (Kuhn-Nentwig, 2003). El presente trabajo, junto a las publicaciones presentadas previamente por Borges *et al.* (2006, 2007), son los primeros en reportar el efecto tóxico de venenos de estos artrópodos sobre parásitos de importancia médica.

En vista que diversas especies de *Leishmania* son sensibles al efecto de compuestos bloqueadores de canales iónicos presentes en tejidos de mamífero, tales como la glibenclamida (antagonista del canal de potasio dependiente de ATP), la amilorida (activa sobre la subunidad beta del canal de sodio epitelial) y la aminopiridina (antagonista de amplio espectro de los canales de potasio voltaje-dependientes) (Ponte Sucre *et al.*, 1998), así como también ante algunos péptidos antimicrobianos procedentes de mamíferos e invertebrados (Hernández *et al.*, 1992; Chicharro *et al.*, 2001; Bera *et al.*, 2003), es posible que existan proteínas / péptidos derivados de estos venenos que posean especificidad hacia este grupo de parásitos, lo cual queda demostrado en el presente trabajo.

La presente investigación también ha avanzado en la caracterización química de los componentes responsables del efecto leishmanicida al aislar mediante HPLC en fase reversa dos péptidos, HPLC-13 Y HPLC-14, capaces de producir en ensayos de 1 h de duración, 100% y 84% de mortalidad de promastigotes de *L. (L.) m. mexicana* respectivamente.

Debido a lo escaso del material obtenido, sólo se procedió a la caracterización del componente HPLC-13, el cual rindió una masa molecular de 6 880,97 g/mmol mediante espectrometría de masas. Esta masa es típica de las toxinas de escorpión de cadena larga, entre 60 y 70 aminoácidos en su estructura primaria, las cuales típicamente son agonistas de canales iónicos en

células de mamíferos. HPLC-13 es muy probablemente un componente catiónico, en vista de su migración en geles de urea / ácido acético. Así, dada su migración al cátodo durante las corridas electroforéticas en poliacrilamida efectuadas a pH ácido, su carga neta positiva debe indicar el predominio en su superficie de cadenas laterales típicas de los aminoácidos hidrofílicos. Por otra parte, HPLC-13 debe ser un componente con áreas de hidrofobicidad en su superficie, en vista de su considerable tiempo de retención retardada en la columna C-18 de fase reversa, siendo éste uno de los últimos componentes de TgIII en eluir en la cromatografía líquida a alta presión (HPLC).

A la espera de la continuación de los experimentos que aquí se han sugerido realizar, se puede concluir que, independientemente de su naturaleza química y del mecanismo que mejor explique su actividad biológica, este trabajo ha sido el primero en aislar un componente leishmanicida a partir de un veneno de escorpión con una pureza relativamente elevada, como lo atestiguan los experimentos de MALDI-TOF y de electroforesis en geles de acrilamida. Dada la especificidad de su actividad biológica, los componentes leishmanicidas presentes en los venenos de escorpión pueden servir futuramente como plantilla molecular, mediante las técnicas de la ingeniería genética y la síntesis química, para la preparación de drogas antiparasitarias más específicas y más económicas para el tratamiento de la Leishmaniosis.

CONCLUSIONES

El veneno de *T. gonzalespongai*, especie de escorpión endémico del nororiente venezolano, produce daño agudo (1 h de incubación) a nivel estructural en promastigotes de *L. m. mexicana*, mostrándose evidencia de muerte celular.

El fraccionamiento cromatográfico mediante filtración molecular en Sephadex G-50 del veneno de *T. gonzalespongai* permitió obtener tres fracciones, de las cuales la TgIII resultó ser la más potente desde el punto de vista de su actividad leishmanicida (80% de mortalidad de promastigotes), representando el 6,3% del veneno total.

Los componentes presentes en TgIII fueron aislados mediante HPLC en fase reversa, obteniéndose un total de 16 componentes. Las subfracciones HPLC-13 y HPLC-14 mostraron la mayor actividad leishmanicida de todos los componentes ensayados, produciendo 100% y 84% de mortalidad en ensayos de toxicidad aguda (1 h) respectivamente, a 1 µg/ml de concentración final.

La evaluación de la composición de la subfracción HPLC-13 mediante espectrometría de masas reveló la presencia de un único componente con una masa molecular de 6 880,97 g/mol, la cual es típica de las toxinas de cadena larga presentes en venenos de escorpión.

Estas investigaciones han permitido, por vez primera, caracterizar y aislar hasta la homogeneidad uno de los componentes leishmanicidas del veneno de *T. gonzalespongai*, permitiendo establecer un protocolo para la futura elucidación de su estructura y mecanismo de acción.

Considerando lo anterior, la presente investigación en apariencia es la primera en aislar los posibles componentes con actividad leishmanicida del veneno de *T. gonzalespongai* (caracterizado como especie con actividad leishmanicida), los cuales pueden servir de base para el diseño de nuevos compuestos más específicos para el tratamiento de la leishmaniosis en cualquiera de sus modalidades clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Biondi-Queiroz, I.; García-Santana, V. P. y Rodríguez, D. S. 1996. Estudio retrospectivo do escorpionismo na Região Metropolitana de Salvador (RSM)-Bahia, Brasil. *Sitientibus*, 15: 273-285.
- Borges, A. 1996. Scorpionism in Venezuela. *Acta Biologica Venezuelica*, 16: 65-76.
- Borges, A. y De Sousa, L. 2006. Escorpionismo en Venezuela: una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. *Revista de la Facultad de Farmacia (Caracas)*, 69 (1-2): 15-27.
- Borges, A. y De Sousa, L. 2009. Una aproximación multidisciplinaria para el estudio del envenenamiento por arácnidos en Venezuela. En: Enfoques y Temáticas en Entomología (J. Arrivillaga, M. El Souki, B. Herrera, editores). Caracas: Ediciones Astrodata, pp. 137-153.
- Borges, A.; Arantes, E.C.; Giglio, J.R. 1990. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Venezuelan scorpion, *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon*, 28: 1011–1027.
- Borges, A.; Arandia, J.; Colmenares de Arias, Z.; Vargas, A. M. y Alfonzo, M. J. 2002. Caracterización epidemiológica y toxicológica del envenenamiento por *Tityus zulianus* (Scorpiones, Buthidae) en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista de la Facultad de Medicina (Caracas)*, 25: 76-79.
- Borges, A.; Trejo, E.; Vargas, A. M.; Céspedes, G.; Hernández, A. y Alfonso, M. J. 2004. Pancreatic toxicity in mice elicited by *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* scorpion venoms. *Investigation Clínica*, 45: 269–276.
- Borges, A.; Garcia, C. C.; Lugo, E.; Alfonzo, M. J.; Jowers, M. J. y Op den Camp, HJM. 2006a. Long-chain toxin diversity in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): Molecular, immunological and mass spectral analyses. *Comp. Biochemistry Physiology. Part. C.*, 142: 240-252.
- Borges, A.; Silva, S.; Op den Camp, H.; Velasco, E.; Alvarez, M.; Alfonso, M. J.; Jorquera, A.; De Sousa, L. y Delgado, O. 2006b. *In Vitro* leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Parasitology Research*, 99(2): 167-173.

- Borges, A.; De Sousa, L.; Espinoza, J.; Martins-Melo, M.; Santos, R.; Valadares, D. y Chávez-Olortegui, C. 2008. Characterization of *Tityus* venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian antivenoms. *Toxicon*, 51: 66-79.
- Borges, A.; Bermingham, E.; Herrera, N.; Alfonzo, M. y Sanjur, O. 2010a. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuela species. *Toxicon*, 55: 436-454.
- Borges, A.; Rojas-Runjaic, F.; Diez, N.; Facks, J.; Segura, A. y De Sousa L. 2010b. Envenoming by the scorpion *Tityus breweri* González-Sponga in the Guayana Shield, Southeast Venezuela: Report of a case, reactivity towards antivenom and proposal for a toxinological partitioning of the Venezuelan scorpion fauna. *Wilderness and Environmental Medicine*, (Aceptado).
- Castillo-Vigil, A.; Loaiza, R.; Zeledón, R.; Lomonte, B.; Urbina, A. y Valverde, B. 2008. Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48: 135-143.
- Coronado, L.; Alvarado, M. y Dunari, J. 2008. Características clínicas y epidemiológicas del alacranismo. Período 2002-2007. Hospital del Niño. Panamá. *Revista Pediátrica de Panamá*, 37: 36-46.
- Corzo, G.; Escoubas, P.; Villegas, E.; Barham, K. J.; He, W.; Norton, R. S. y Nakajima, T. 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Journal of Biochemistry*, 359: 35-45.
- Croft, S. L. 2001. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Tropical Medical Internal Health*, 6: 1-7.
- De Sousa, L. 2006. Especie nueva de *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) de la Serranía del Turimiquire, nororiente de Venezuela. Caracterización morfológica, geográfica y toxinológica. Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Escuela de Ciencias de la Salud, [Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesor Asociado], 167 p.
- De Sousa, L.; Parrilla-Alvarez, P. y Quiroga, M. 2000. An epidemiological review of scorpion stings in Venezuela: the Northeastern region. Review article. *Journal of Venom Animal. Toxins*, 6: 127-165.

- De Sousa, L.; Boadas, J.; Kiriakos, D.; Borges, A.; Boada, J.; Marcano, J.; Turkali, I. y De Los Rios, M. 2007. Scorpionism due to *Tityus neoespartanus* (Scorpiones, Buthidae) in Margarita Island, Northeastern Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Torpical*, 40(6): 681-685.
- De Sousa, L.; Parrilla-Álvarez, P.; Pérez Di Gaeta, P.; Romero, L. y Quiroga, M. 2009. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo C57BL/6. *Saber*, 21: 50-62.
- Fet, V. y Lowe, G. 2000. Family Buthidae C. L. Koch, 1837. In: Fet, V., Sissom, W. D., Lowe, G. y Braunwalder, M. E. (Eds) *Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998)*. New York Entomological Society, New York, pp. 54-286.
- Hancock, R., 1997. Peptide antibiotics. *Lancet.*, 349:418-22.
- Hancock, R., 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiology*, 5, 37-42.
- Hancock, R. 2001. Cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.*, 1, 156-164.
- Hancock, R. y Chapple, D. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agent Chemother.* 43:1317-23
- Hancock, R. y Lehrer, R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnology*, 16: 82-88.
- Hwang, P. y Vogel, H. 1998. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochemical Cell Biology*, 76: 23-246.
- Jorquera, A.; Ledezma, E.; De Sousa, L.; Garcia, A.; Sanchez, J.; Zerpa, J.; Gonzalez, R. y O'Daly, J. 1998. Epidemiological characterization of american cutaneous leishmaniasis in an endemic region of eastern Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(5): 589-593.
- Kuhn-Nentwig, L. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular Molecular Life Science*, 60: 2651-2668.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- Larrick, J. y Wright, S. 1996. Cationic antimicrobial peptides. *Drugs Future*, 21: 41-48.
- Lazarovici, P.; Menashe, M. y Zlotkin, E. 1984. Toxicity to Crustacea due to polypeptide-phospholipase interaction in the venos of a Chactoid scorpion. *Archive of Biochemical and Biophysical*, 229: 270-286.
- Lourenço, W. R. 2002. Scorpions of Brazil. *Les Editions de l'If, Paris*. pp 306.
- Lourenço, W. R. y Cuellar, O. 1995. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. Review article. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 1: 51-62.
- Lourenço, W. R.; Cloudsley-Thompson, J. L.; Cuellar, O.; von Eickstedt, V. R. D.; Barraviera, B. y Knox, M. 1996. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 2: 121-134.
- Lourenço, W. R. y Bruehmüller-Ramos, E. C. 2004. New considerations on the status of *Tityus magnimanus* Pocock, 1897 (Scorpiones: Buthidae), and description of a new species of *Tityus* from the state of Roraima, Brazil. *Revista Ibéroamericana de Aracnologia*, 10: 285-291.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. H.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 257-265.
- Mazzei de Davila, C. A.; Davila, D. F.; Donis, J. H.; de Bellabarba, G. A.; Villarreal, V. y Barboza, J. S. 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*, 40: 1339-1346.
- Moerman, L.; Bosteels, S.; Noppe, W.; Willems, J.; Clynen, E.; Schoofs, L.; Thevissen, K.; Tytgat, J.; Van Eldere, J.; Van Der Walt, J. y Verdonck, F. 2002. Antibacterial and antifungal properties of alphahelical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biochemistry*, 269: 4799-47810.
- Mota, J. V.; Ghersy, M. T.; Bastardo, M.; Rodríguez, J.; Duque, L. y Freytez, L. A. 1994. Emponzoñamiento escorpiónico: clínica y laboratorio usando antivenina. *Boletín del Hospital de Niños (Caracas)*, 30: 35-40.
- OMS Expert Committee. 1990. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ. Technical Report Service*, 793.
- Otero, R.; Uribe, F. L. y Sierra, A. 1998. Envenenamiento escorpiónico en niños. *Actualidad Pediátrica. FSF.*, 8: 88-92.

- Otero, R.; Navio E.; Céspedes, F. A.; Núñez, M. J.; Lozano, L.; Moscoso, E. R.; Matallana, C.; Arsuza, N. B.; García, J.; Fernández, D.; Rodas, J. H.; Rodríguez, O. J.; Zuleta, J. E.; Gómez, J. P.; Saldarriaga, M.; Quintana, J. C.; Núñez, V.; Cárdenas, S.; Barona, J.; Valderrama, R.; Paz, N.; Díaz, A.; Rodríguez, O. L.; Martínez, M. D.; Maturana, R.; Beltrán, I. E.; Mesa, M. B.; Paniagua, J.; Flórez, E. y Lourenço, W. R. 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene*, 98: 742-750.
- Pessini, A.C.; Takao, T.T.; Cavalmeiro, E.C.; Vicmneswki, W.; Sampaio, S.V.; Giglio, J. R.; Arantes, E. C. 2001. A Hyaluronidase from *Tityus serrulatus* Scorpion Venom: Isolation, Characterization and Inhibition by flavonoids. *Toxicon*, 39: 1495-1504.
- Possani, L. D.; Becerril, B.; Delepiere, M. y Tytgat, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *European Journal of Biochemistry*, 264: 287-300.
- Prendini, L. y Wheeler, W. 2005. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistic*, 21: 446-494.
- Pouny, Y.; Rapaport, D.; Nicolas, P.; Shai, Y. 1993. Interaction of antimicrobial dermasepin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31:12416-23.
- Quiroga, M.; Illanes, A.; González, A. y Jaramillo, E. 1982. Mantención de escorpiones en el laboratorio, orden Scorpionida, Buthidae, *Rhopalurus laticauda* (THORELL, 1876). Influencia de la alimentación. *Acta Científica de Venezuela*, 33: 502-508.
- Quiroga, M.; De Sousa, L.; Parrilla-Alvarez, P. y Manzanilla, J. 2004. The first report of *Tityus* (Scorpiones: Buthidae) in Anzoátegui State, Venezuela. A new species. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease*, 10(1): 10-33.
- Rojas-Runjaic, F. J. y De Sousa, L. 2007. Catálogo de los escorpiones de Venezuela (Arachnida: Scorpiones). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 40: 281-307.
- Saldarriaga, M. A. y Otero, R. 2000. Los escorpiones: aspectos ecológicos, biológicos y toxicológicos. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga*, 3: 17-23.

- Tempone, A. G.; Andrade, H. F. Jr; Spencer, P. J.; Lourenço, C. O.; Rogero, J. R.; Nascimento, N. 2001. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280: 620–624.
- Tytgat, J.; Chandy, K. G.; Garcia, M. L.; Gutman, G. A.; Martin-Eauclaire, M. F.; Van der Walt, J. J. y Possani, L. D. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacology Science*, 20: 444-447.
- Zeng, X-C.; Corzo, G. y Hahin, R. 2005. Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges. *IUBMB Life*, 57: 13–21.
- Wang, M.S.; Pang, J.S. y Selsted, M.E. 1997. Semidry Electroblothing of Peptides and Proteins from Acid-Urea Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemical*. 253: 225–230.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD DEL VENENO DEL ESCORPIÓN <i>Tityus gonzalespongai</i> (Scorpiones, Buthidae) SOBRE <i>Leishmania mexicana mexicana</i>
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Bravo S., José R	CVLAC	12661637
	e-mail	jose_bravo2005@yahoo.es
	e-mail	jbravofunrevi@gmail.com
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Escorpiones, Promastigotes, <i>Leishmania</i> , Leishmaniosis, <i>Tityus gonzalespongai</i> .

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química

Resumen (abstract):

Se caracterizó, desde los puntos de vista químico y biológico, los componentes proteicos presentes en el veneno del escorpión *Tityus gonzalespongai* que presentan actividad sobre promastigotes del parásito *Leishmania mexicana mexicana*, el cual es responsable de la Leishmaniasis cutánea. Se demostró que el efecto leishmanicida producido por el veneno de *T. gonzalespongai*, así como el del escorpión *T. discrepans*, depende de la dosis del tóxico. La cromatografía mediante exclusión molecular en Sephadex G-50 del veneno de *T. gonzalespongai* produjo tres fracciones (*TgI*, *TgII* y *TgIII*), de las cuales *TgIII* presentó la mayor actividad leishmanicida (77% de mortalidad en promastigotes), en comparación con el veneno crudo (81%). La fracción *TgIII* fue posteriormente sujeta a fraccionamiento mediante cromatografía líquida a alta presión en fase reversa, generándose 16 subfracciones. De éstas, HPLC-13 Y HPLC-14 presentaron el mayor efecto leishmanicida, con 100% y 80% de mortalidad en *L. m. mexicana*, respectivamente, ensayadas a 1 µg/ml. La evaluación de la composición de HPLC-13 mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF y electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de urea y ácido acético, reveló la presencia de un único componente con una masa molecular de 6,88097 g/mol. Estos hallazgos corroboran evidencias previas sobre la potencia antiparasitaria del veneno de escorpiones venezolanos y permiten caracterizar, por vez primera, los componentes antiparasitarios presentes en el veneno de *T. gonzalespongai*, los cuales se podrían servir de base para el diseño de nuevas drogas leishmanicidas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Borges S., Adolfo	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	borges.adolfo@gmail.com
	e-mail	
Rojas, Luisa	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	lrojas40@yahoo.com
	e-mail	
De Sousa, Leonardo	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	leonardodesousa@yahoo.com
	e-mail	
D' Armas, Haydelba	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2010	8	11
-------------	----------	-----------

Lenguaje: Español

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-bravoj.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial : internacionalTemporal: Temporal

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en química

Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciado

Área de Estudio:

Química

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

[Escribir texto]

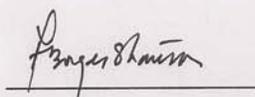
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Acepto la publicación de los datos mostrados en la presente investigación



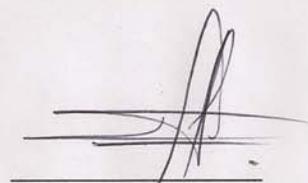
Bravo S., José R.



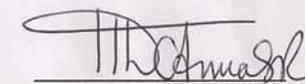
Dr. Adolfo Borges



Dra. Luisa Rojas



Dr. Leonardo De Sousa



Dra. Haydelba D' Armas

POR LA COMISIÓN DE TESIS:



Dra. Maj Britt Mostue

