

**Caracterización electroforética y cromatográfica del veneno del alacrán
*Rhopalurus junceus***

**Electrophoretic and chromatographic characterization of the *Rhopalurus
junceus* scorpion venom**

**Dr. C. Oscar Hernández Betancourt ^I; Lic. Oscar Compte Alberto ^{II}; Téc.
Lidice Quesada Leiva ^I; Dra. Ayní Rodríguez Pargas ^I**

I Universidad de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba.

II Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Camagüey, Cuba.

RESUMEN

Fundamento: el veneno del alacrán azul, *Rhopalurus junceus* es actualmente comercializado con el nombre de Escozul. Este producto natural se emplea en el tratamiento de diferentes patologías, sin embargo en la literatura revisada no aparece información referente a la caracterización bioquímica del extracto de este ejemplar cubano.

Objetivo: hacer una caracterización bioquímica preliminar del veneno crudo del alacrán cubano mediante el empleo de dos técnicas destinadas a estos fines.

Método: se empleó la electroforesis discontinua de proteínas en gel de poliacrilamida al 15 % y la cromatografía de alta presión.

Resultados: se identificó un patrón difuso correspondiente a péptidos de talla inferiores a catorce KDa, mientras que por HPLC se determinaron trece picos en el veneno crudo de esta especie.

Conclusiones: el veneno del alacrán azul presenta una composición molecular similar a la descrita para otras especies con una mezcla molecular inferior a catorce KDa.

DeCS: venenos de escorpión, cromatografía, electroforesis.

ABSTRACT

Background: the blue scorpion venom, *Rhopalurus junceus* is currently marketed with the name of Escozul. This natural product is used in the treatment of different pathologies; however in the revised literature doesn't appear concerning information to the biochemical characterization of the extract of this Cuban specimen.

Objective: to make a preliminary biochemical characterization on the crude venom of the Cuban scorpion by means of the employment of two techniques dedicated to these purposes.

Method: the discontinuous electrophoresis of proteins was used in polyacrylamide to 15 % and the chromatography of high pressure.

Results: a diffuse pattern corresponding to inferior size peptides to fourteen KDa was identified, while for HPLC thirteen peaks were determined in the crude venom of this species.

Conclusions: the blue scorpion venom presents a similar molecular composition to the one described for other species with an inferior molecular mixture to fourteen KDa.

DeCS: scorpion venoms, chromatography, electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Datos preliminares del Anuario Estadístico del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) indican que el cáncer cobró 17 490 vidas en Cuba en el año 2002, que equivale al 23 % del total de muertes registradas en ese año. ¹

En el tratamiento de este grupo de enfermedades se utilizan tradicionalmente los fármacos citostáticos, las radiaciones y la cirugía; pero en la actualidad han surgido una serie de tratamientos alternativos que incluyen la terapia génica, elementos promotores de inmunogenicidad y otros que aceleran el proceso de apoptosis celular. ²⁻⁴

El empleo terapéutico de la toxina del alacrán azul (*Rhopalurus junceus*) fue descubierto al cabo de una década de trabajo por el biólogo cubano Misael Bordier, quien inició el criadero de escorpiones y su investigación en la Facultad de Ciencias Médicas de Guantánamo a finales de los años 80 del siglo pasado. La toxina, una vez formulada y esterilizada constituye el producto natural Escozul. A la misma se le atribuyen propiedades antimicrobianas y antitumorales demostradas a través de algunos estudios preclínicos.³ El aislamiento y caracterización molecular de los extractos obtenidos de organismos y su evaluación farmacológica es un aspecto esencial del proceso de descubrimiento de la droga. Precisamente los avances en el área de las técnicas in vitro han transformado sustancialmente esta faceta de la química de productos naturales.

En la literatura revisada no aparece información alguna sobre estudios que caractericen bioquímicamente el producto natural obtenido de esta especie de alacrán y comercializada con el nombre de Escozul.

A pesar de los resultados obtenidos en investigaciones preclínicas y clínicas mediante la administración de este veneno,^{7, 8} las autoridades sanitarias cubanas no reconocen como evidencia científicamente documentada los reportes realizados hasta el momento, aunque las referencias sobre sus efectos y curas son sugerentes de una posible actividad y utilidad terapéutica.⁹ Partiendo de estos argumentos, se pretende caracterizar mediante métodos bioquímicos el extracto natural obtenido a partir de la estimulación eléctrica del apéndice terminal del alacrán azul.

MÉTODOS

Colección y preparación de la toxina

Se colectó el veneno de 50 alacranes de la especie *Rhopalurus junceus* en un volumen de 20ml de agua destilada, mediante la aplicación de corriente a baja intensidad en el apéndice terminal. Con la finalidad de concentrar la muestra se realizó una precipitación salina con NH_4SO_4 al 70 %, seguidamente se resuspendió en 5ml de PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na_4HPO_4 , 1.47mM KH_4PO_4) y se procedió a dializar durante 48h a 4° C en PBS 1X. Se determinó la concentración de proteínas totales a través del método de Lowry.¹⁰ La toxina fue filtrada utilizando membranas de 0.2mm.

Caracterización bioquímica del veneno

En la caracterización bioquímica de las muestras se utilizaron dos métodos: electroforesis de proteínas y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), los que permitieron la estimación de su pureza, composición y peso molecular.

Electroforesis de Proteínas

Se realizó una electroforesis de proteínas discontinua empleando un gel de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturalizantes.¹⁰ Los marcadores de peso molecular utilizados fueron de 67, 43 y 14 KDa que se correspondieron con la albúmina bovina, ovoalbúmina y lisozima, respectivamente.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

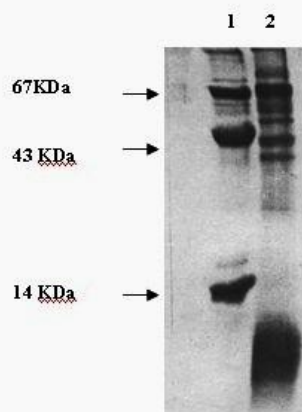
Para la separación de las principales fracciones de proteínas y péptidos que conforman la mezcla del crudo de veneno, se utilizó un sistema de cromatografía de alta presión (HPLC), del inglés High Pressure Liquid Chromatography. (LKB Pharmacia, Suecia). Como matriz separadora se utilizó una columna analítica XK50/30, con 25ml de resina de intercambio iónico DEAE Sepharose Fast flow (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), equilibrada con diez volúmenes de tampón PBS1X (pH 7.2).

La elusión se realizó con un gradiente creciente de molaridades de cloruro de sodio (NaCl) desde 0.1M hasta 1M de NaCl diluido en tampón PBS1X, pH 7.2. Las corridas se realizaron a un flujo de 0.8ml/min y una presión de 1.5 mPa, con un rango de absorbancia de 0.02. Se utilizó en las lecturas un UVICORD S2138. La velocidad del papel fue de 5mm/min. En cada corrida se aplicaron 80 µg totales del crudo diluidos en tampón fosfato (PBS 1X, pH 7.2).

RESULTADOS

Caracterización bioquímica del veneno. La electroforesis de proteína desnaturalizante empleando gel de poliacrilamida al 15 % permitió observar un patrón de bandas bien definidas en el orden de los 43 KDa de peso molecular o superiores a este. Sin embargo, el empleo de estas condiciones electroforéticas en el ensayo, no permitió una mayor resolución de las bandas que se encuentran por debajo del marcador de peso molecular de 14 KDa y que se corresponden con la mezcla de péptidos descritos en la literatura. Con la finalidad de caracterizar esta zona se procedió a efectuar una cromatografía de alta presión (HPLC). Figura 1

Figura 1. Electroforesis discontinua de proteínas (PAGE reducida 15 %).

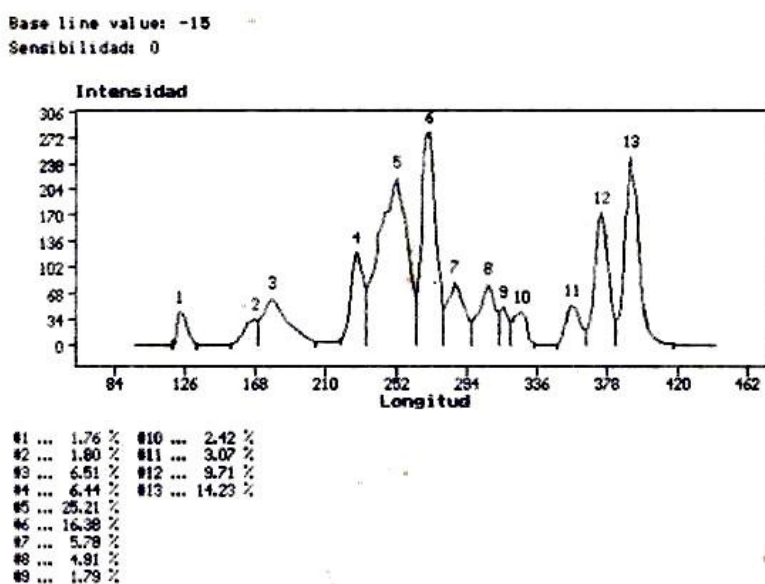


Línea 1: marcadores de peso molecular.
 Línea 2: Crudo del veneno de alacrán posterior a la precipitación salina con sulfato de amonio al 70%.

Cromatografía de alta presión. Una vez chequeada la concentración y características electroforéticas de los componentes del Escozul, resultó interesante determinar cual era el patrón de proteínas presentes en dicha solución.

El fraccionamiento utilizando esta columna de intercambio iónico, resultó en la resolución de 13 picos claramente identificables, siendo mayoritarias en este orden las fracciones 3, 4, 5, 6, 12 y 13, con más del 50 % del total de la muestra. Figura 2

Figura 2. Cromatograma del crudo del veneno de alacrán obtenido por HPLC. 80 μ g de proteínas totales fueron aplicados. En la parte inferior aparecen los por cientos correspondientes a cada pico.



DISCUSIÓN

Las toxinas producidas por diversos organismos han llamado desde hace mucho tiempo la atención de los investigadores por sus propiedades terapéuticas. Entre los más estudiados se encuentran las serpientes, escorpiones y diversos organismos marinos.^{11, 12, 16, 20}

Varios estudios coinciden en que el veneno de los escorpiones es una mezcla compuesta por varios péptidos de bajo peso molecular que tienen su efecto sobre los canales iónicos (fundamentalmente de Ca^{2+} , Na^+ y K^+) de mamíferos, insectos y crustáceos.¹⁹⁻²²

Todas estas toxinas producen una perturbación severa de los procesos de excitación y conducción del impulso nervioso debido a una modificación de la permeabilidad iónica de la membrana, alterando los procesos neuroquímicos celulares y con consecuencias importantes para los sistemas nervioso y cardiovascular.^{13, 14, 24, 25} El primero de estos grupos de investigación identificó y caracterizó cuatro péptidos en el veneno del escorpión chino *Mesobuthus martensii*, también conocido como *Buthus martensii* Karsch. En dichas especies las toxinas variaron entre 36 y 71 residuos de aminoácidos y presentaron entre tres y cuatro puentes disulfuro.

Los autores coinciden en la acción del veneno asociada con la activación de los canales de sodio Na^+ y potasio K^+ , lo cual es tóxico para insectos y mamíferos. Además se ha reportado que esta familia de proteínas mantienen un motivo estructural conservado integrado por un núcleo compacto formado por una a hélice y tres hojas plegadas b.²⁶ La característica más singular de este veneno es que, a diferencia de los venenos de serpientes, avispas, abejas u hormigas, carece de fosfolipasas, proteasas y factores de irritación. Su letalidad radica en la presencia de toxinas dirigidas a sitios específicos de la membrana citoplasmática, que modifican el comportamiento de los mecanismos de selección iónica imprescindibles para la fisiología celular. La media de los perfiles cromatográficos realizados mostraron que estos son representativos para cada especie, pudiéndose utilizar como indicadores de especie. Además se demostró que todos los venenos están formados por proteínas de pesos moleculares semejantes.²⁷

El presente trabajo hace el primer acercamiento a la caracterización molecular de la mezcla de compuestos presentes en el producto natural estudiado, pues es imprescindible la identificación de los diferentes elementos con actividad biológica que intervienen directa o indirectamente en su acción a nivel de membranas celulares. En la caracterización bioquímica de estas mezclas de proteínas donde aparecen moléculas de bajo peso molecular, comúnmente se emplea la

electroforesis en gel de poliacrilamida no convencional, con la finalidad de alcanzar un mayor poder resolutivo.^{28, 29}

Debido a la carencia de evidencias sobre la composición molecular del extracto y con el objetivo de evaluar la pureza y el peso molecular de la toxina presente en el veneno del alacrán *R. junceus*, se empleó la electroforesis convencional acrilamida/bisacrilamida al 15 % debido a la no disponibilidad de los reactivos necesarios para las electroforesis no convencionales antes mencionadas. El patrón de proteínas obtenido coincide con las referencias encontradas en la literatura donde se observan varias bandas de mayor peso molecular, ubicadas entre 43 y 67 KDa.

Diversos autores informan además la presencia de una mezcla de péptidos en una zona difusa conformada por pequeños moléculas inferiores a 14 KDa^{20, 21, 23, 30} y observadas en este trabajo. Debido al poco poder resolutivo de la técnica empleada, estos péptidos no pudieron ser observados por separado.

Como puede apreciarse en el cromatograma mostrado en la figura 2, en el fraccionamiento utilizando esta columna de intercambio iónico, el Escozul muestra un perfil integrado por trece fracciones claramente identificables, cuando se utiliza una columna de intercambio iónico acoplada a un sistema cromatográfico de alta resolución. Dentro de los picos mayoritarios se encontraron por este orden el 3,4, 5, 6, 12 y 13.

CONCLUSIONES

Este trabajo brinda las condiciones experimentales necesarias para el aislamiento de las moléculas que componen el extracto. Los estudios moleculares para verificar la similitud estructural de esta toxina con las toxinas antes discutidas y propias de otras especies, no han sido llevados a cabo aún. El aislamiento y estudio molecular ayudará a comprender su mecanismo de acción celular y así poder utilizar este producto natural en la terapia de diversas patologías con una base científica. El veneno del alacrán azul presenta una composición molecular similar a la descrita para otras especies con una mezcla molecular inferior a 14 KDa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anuario Estadístico 2006 [fecha de acceso 4 de marzo del 2008]. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/cgi-bin/wxis/anuario/?IsisScript=anuario>

2. Ruggles JA, Kelemen D, Baron A. Emerging therapies: controlling glucose homeostasis, immunotherapy, islet transplantation, gene therapy, and islet cell neogenesis and regeneration. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; 33(1):239-52.
3. Rodríguez R, Guerra O, Baro E, Silva J, Magdelaine R. Acción antimicrobiana del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* (Scorpionida: buthidae). *Rev Cub Farm* 2004; 38(2):134.
4. Gao L, Yu S, Wu Y, Shan B. Effect of spider venom on cell apoptosis and necrosis rates in MCF-7 cells. *DNA Cell Biol* 2007; 26(7):485-9.
5. Konety BR, Getzenberg RH. Novel therapies for advanced prostate cancer. *Semin Urol Oncol* 1997; 15(1):33-42.
6. Rahman A, Iqbal M, Thomsen W. Bioassay techniques for drug development. Harward Academic Publishers. ISBN 90-5823-051-1; 2001.
7. Pérez M, Rodríguez C, Guevara I, Romeaux R. Estudio de toxicidad aguda de las toxinas de los escorpiones *Rophalurus junceus* y *Centruroides gracilis*. *Rev Cub Farm* 2004; 38(4).
8. Kinast H. El veneno del alacrán en cáncer. *Escozul*. Cap 43. Disponible en: <http://kinastchile.cl/ccc43.htm>
9. Granma. Nota Oficial del Ministerio de Salud Publica. [serial online] 2004 Nov 17[cited2007]. Disponible en: http://granma.cubaweb.cu/2004/11/17/national/articulo_21/html
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2da Ed. Cold Spring Harbor NY, 1989.
11. Cao ZY, Mi ZM, Cheng GF, Shen WQ, Xiao X, Liu XM, Liang XT, Yu DQ. Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensi* Karch. *J Pept Res* 2004; 64(1):33-41.
12. Rash LD, King RG, Hodgson WC. Evidence that histamine is the principal pharmacological component of venom from an australian wolf spider (*Lycosa godeffroyi*). *Toxicon* 1998; 36(2):367-75.
13. Serafim FG, Reali M, Cruz MA, Fontana MD. Action of *Micrurus dumerilii* carinicauda coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon* 2002; 40(2):167-74.
14. Giron ME, Aguilar I, Romero L, Sanchez EE, Perez JC, Rodriguez A. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. *Rev Med Trop Sao Paulo* 2005; 47(3): 147-52.
15. Mora R, Maldonado A, Valverde B, Gutierrez JM. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. *Toxicon* 2006; 47(1): 75-86.

16. Villalobos JC, Mora R, Lomonte B, Gutierrez JM, Angulo Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A (2) homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. *Toxicol In Vitro* 2007. (en prensa)
17. Pita M, Casanella O, Rodríguez A, López T, Perea S, Castañeda O. Capacidad antiproliferativa de fracciones cromatográficas procedentes de animales marinos en líneas tumorales in vitro. *Rev Cub Farm* 2004; 38 (2):152.
18. Rundbert T, Sándwik M, Larsen K, Pizarro G, Reguera B, Castberg T, et al. Extraction of microalgal toxins by large-scale pumping of seawater in Spain and Norway, and isolation of okadaic acid and dinophysistoxin-2. *Toxicon* 2007; 50(7):960-70.
19. Gerbig GG, Walker RD, Baker JC, Foster JS, Moore RN. Calcium ion involvement in the action of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet Microbiol* 1989; 19(4):325-35.
20. Liebau S, Propper C, Bockers T, Lehmann F, Storch A, Grissmer S, Wittekindt OH. Selective blockage of Kv1.3 and Kv3.1 channels increases neural progenitor cell proliferation. *J Neurochem* 2006; 99(2):426-37.
21. Sarriaga M, Otero R. Los escorpiones: aspectos ecológicos, biológicos y toxicológicos. *Med UNAB* 2000; 3(7):17-23.
22. Selisko B, Garcia C, Becerril B, Delepierre M, Posan L. An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann. cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. *Eur J Biochem* 1996; 242:235-242.
23. Tytgat J, Chandy G, Garcia M, Gutman G, Martin-Euclaire M-F, Walt J, et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *TIES* 1999; 20:444-447.
24. D'Suze G, Sevcik C. Características biológicas del veneno. Disponible en: <http://caibco.ucv.ve/caibco/ESCORPIO/Escorpio.htm>
25. Schägger H, von Jagow G. Tricine - Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 1987; 166: 368- 379.
26. Wiltfang J, Arold N, Neuhoff V. A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis* 1991; 12:352-366.
27. Crachi M, Hammer L, Hodgson W. A pharmacological examination of venom from the Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). *Toxicon* 1999; 37(12):1721-34.

28. Schägger H, von Jagow G. Tricine - Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 1987; 166: 368- 379.
29. Wiltfang J, Arold N, Neuhoff V. A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis* 1991;12:352-366.
30. Velázquez L, Escobar E. Purification and partial characterization of a toxin (Hm3) from *Hadruroides mauryi* (Francke y Soleglad, 1980) (Scorpiones, Iuridae) venom. *Rev Peru Biol* 2004; 11(2). ISSN 1727-9933

Recibido: 3 de octubre de 2008.

Aceptado: 21 de noviembre de 2008.

Dr. Oscar Hernández Betancourt. Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor Titular. Investigador Auxiliar. Centro de Inmunología y Productos Biológicos CENIPBI. Universidad de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba. *E-mail:* oscarhb@iscmc.cmw.sld.cu