

Perfil cromatográfico de las proteínas del veneno del escorpión *Hadruidoidea charcasus*

Chromatographic profile of scorpion venom proteins *Hadruidoidea charcasus*

Orlando Pérez-Delgado^{1*}; Nohora Angélica Vega-Castro²; Edgar Antonio Reyes-Montaño²

¹Coord. Lab. Microbiología, Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo, Chiclayo

²Grupo de Investigación en Proteínas, Universidad Nacional de Colombia

*Autor correspondiente: operezd@gmail.com (O. Pérez)

RESUMEN

La presente investigación tiene el objetivo de determinar el perfil cromatográfico de las proteínas del veneno de la especie *Hadruidoidea charcasus*. El veneno de escorpión es una mezcla de proteínas de diferente peso molecular y con un mecanismo activo de acción de los péptidos presentes y no depende de la interacción (Targino et al., 2015). Se recolectaron 40 escorpiones de ambos sexos. Por estimulación eléctrica se obtuvo el veneno y posteriormente fue cuantificado por el método de relación de absorbancias, $[mg/mL] = (1,56 \times Abs\ 280nm) (0,76 \times Abs\ 260nm)$. A través del sistema Amicon® Ultra – 0.5, se concentraron de las fracciones de proteínas y péptidos. La purificación de las proteínas se realizó mediante HPLC en fase reversa, con una columna analítica Chromolith RP-18e. Se determinó la presencia de 50 señales o picos eluidos del retentato del Amicon con tamaño de exclusión 10 KDa, 54 picos eluidos del retentato y 45 picos eluidos del difusato del Amicon con tamaño de exclusión de 3 KDa. Del que se concluye que *H. charcasus* presenta un patrón cromatográfico uniforme de especies peptídicas determinadas por el sistema Amicon 0,5, siendo un posterior estudio la determinación de cada una de las proteínas del veneno útil con fines terapéuticos.

Palabras clave: *Hadruidoidea charcasus*; veneno de escorpión; Cromatografía; HPLC.

ABSTRACT

The present investigation has the objective of determining the chromatographic profile of the venom proteins of the species *Hadruidoidea charcasus*. Scorpion venom is a mixture of proteins of different molecular weight and with an active mechanism of action of the present peptides and does not depend on the interaction (Targino et al., 2015). 40 scorpions of both sexes were collected. The venom was obtained by electrical stimulation and subsequently quantified by the absorbance ratio method, $[mg / mL] = (1.56 \times 280nm\ Abs) (0.76 \times 260nm\ Abs)$. Through the Amicon® Ultra-0.5 system, they concentrated on the protein and peptide fractions. The purification of the proteins was carried out by means of HPLC in reverse phase, with an analytical column Chromolith RP-18e. The presence of 50 eluted signals or peaks of the Amicon retentate was determined with exclusion size 10 KDa, 54 eluted peaks of the retentate and 45 eluted peaks of the Amicon diffusate with an exclusion size of 3 KDa. From which it is concluded that *H. charcasus* presents a uniform chromatographic pattern of peptide species determined by the Amicon 0.5 system, with a subsequent study being the determination of each of the venom proteins useful for therapeutic purposes.

Keywords: *Hadruidoidea charcasus*; scorpion venom; Chromatography; HPLC.

1. INTRODUCCIÓN

Las toxinas producidas por diversos organismos han llamado la atención de los investigadores hace muchos años por sus propiedades terapéuticas como se reporta del escorpión azul cubano de la especie *Rhopalurus junceus* que es empleado en la terapia anticancerígena (García et al., 2011; Hernández et al., 2009) y varios estudios coinciden en que el veneno del escorpión es una mezcla compuesta por varios péptidos de diferente peso molecular que son considerados como los compuestos bioactivos por tener actividad de inhibir el

crecimiento o proliferación de bacterias, hongos, células cancerígenas (Escobar et al., 2008; Pérez, 2013; Harrison et al., 2014).

Los venenos de animales venenosos son fuentes ricas de compuestos bioactivos y los péptidos son compuestos con una variedad de acciones y en los venenos de escorpión son los más notables de sus actividades de bloqueo de canales anti-iónicos. Se clasifican en cuatro grupos según sus efectos sobre los canales de sodio (Na⁺), potasio (K⁺), calcio (Ca²⁺) y cloruro (Cl⁻) (Uawonggul et al., 2007).

Además de estos péptidos que interactúan con los canales iónicos, cuya función principal es inducir dolor, inmovilizar o paralizar las presas, los escorpiones también tienen un arsenal de péptidos antimicrobianos y citolíticos (Kuhn-Nentwig, 2003).

En la actualidad diferentes microorganismos de importancia clínica vienen generando resistencia a los antibióticos convencionales, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas en la quimioterapia antimicrobiana.

Los péptidos antimicrobianos han surgido en los últimos 25 años como una familia de sustancias con gran potencial para uso clínico, debido a sus múltiples mecanismos de acción, amplio espectro de actividad y bajo potencial de resistencia y La composición de aminoácidos, su carga neta (generalmente catiónica), así como sus características anfipáticas y de tamaño, favorecen su interacción con bicapas lipídicas, principalmente aquellas que forman las membranas citoplasmáticas de patógenos (bacterias, hongos, virus envueltos y parásitos), en las que forman poros. Recientemente su rango de acción se ha extendido al citoplasma bacteriano, en donde alteran la formación del septo de la membrana citoplasmática, inhiben la síntesis de la pared celular, la de ácidos nucleicos, la de proteínas, así como algunas actividades enzimáticas (Castañeda et al., 2009).

Los péptidos antimicrobianos (AMP) representan un mecanismo de defensa antiguo que a través del espectro evolutivo y sigue siendo una estrategia eficaz contra patógenos invasores. Debido a su selectividad para las membranas procariontas y sus mecanismos de membrana disruptiva para los que los microbios tienen poca resistencia natural, el centro de atención en los últimos años se ha orientado hacia el desarrollo de nuevos antibióticos a partir de estos péptidos (Zasloff, 2002).

Esto motivó a la formulación del problema científico en el presente trabajo de investigación ¿Cuál es el perfil cromatográfico del veneno del escorpión *Hadruidoidea charcasus*?, se planteó en el presente estudio cuyo objetivo es, Determinar el perfil cromatográfico del veneno del escorpión *Hadruidoidea charcasus*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Obtención del veneno

Cuarenta escorpiones de la especie *H. charcasus*, de ambos sexos fueron colectados en cerros aledaños del distrito de Chongoyape ubicado en la latitud 6° 37' 40.0'' y longitud 79° 25' 21.4'' y las especies fueron mantenidos en el laboratorio en frascos de plástico y alimentados con *Acheta domesticus* (grillos). Para su identificación se empleó la clave para géneros de escorpiones peruanos (Francke, 1977) y, las orientaciones para la identificación de la especie y el sexo fueron realizadas por el Dr. José Ochoa Cámara, taxónomo y docente de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica de cada uno de los escorpiones, sobre la parte dorsal y en la glándula productora de veneno (Zavaleta, 1983), utilizando un impulso de 23 voltios. La muestra de veneno fue colectada en cinco tubos eppendorf de 0.2 mL y posteriormente diluida con agua desionizada, se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos y el pellet fue resolubilizado con agua desionizada. El procedimiento fue repetido cinco (5) veces con el objetivo de obtener una mayor cantidad de material soluble; lavado y purificado para posterior ensayo cromatográfico. Las fracciones solubles fueron almacenadas en un pool a -20 °C.

2.2. Cuantificación, identificación y estimación de pesos moleculares de los componentes proteicos del veneno

La cuantificación de la proteína se realizó por el método de absorción (SmartSpec Plus Spectrophotometer – BioRad) empleando la relación: [mg/mL]= (1,56 x Abs 280nm) – (0,76 x Abs 260nm) (Fernández, 2016; Shevchenko et al 1996). Cada una de las muestras cuantificadas por este método eran incoloras y traslucidas por lo tanto no se presentaron interferentes en la región de 220-280nm.

2.3. Separación de las proteínas del veneno de *Hadruidoidea charcasus* mediante cromatografía líquida a alta presión (HLPC) en fase reversa

Previo a la purificación, se empleó el método de ultrafiltración a través del sistema Amicon® Ultra – 0.5, para concentrar las fracciones del veneno de 10KDa y 3KDa.

Se procedió al lavado del extracto del veneno, luego a la purificación y a la separación y determinación de las proteínas mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC) en fase reversa, empleando para ello un cromatógrafo HPLC HITACHI con un detector UV y utilizando una columna analítica en fase reversa Chromolith RP-18e, con dimensiones de 4,6x150mm y tamaño de partícula de 5µm.

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 efectuó por 75 min, con un flujo de 1 mL/min y se detectó a 210 nm (Borges et al., 2013).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Veneno de escorpión es una mezcla de proteínas de diferente peso molecular y con un mecanismo activo como antiinflamatorio, antiplasmina, antibacteriano y otros efectos farmacológicos (Wan et al., 2017). Los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) son componentes importantes del sistema inmunitario innato, y muestran un espectro de acción en el exterior contra los microbios, se cree que el mecanismo de acción de estos péptidos no depende de la interacción con un receptor específico, lo que convierte a producto de la presente investigación una alternativa terapéutica interesante en comparación con los antibióticos disponibles (Targino et al., 2015).

En la Figura 1 se muestra el perfil de elución obtenido en una columna C18, sometida a las condiciones cromatográficas descritas en la metodología, se emplearon 50 µg de proteína del retentado del Amicon con un tamaño de exclusión de 10 KDa, se mostró al menos 50 picos o señales entre los tiempos de retención de 0 a 35 minutos se mostró separación de componentes proteicos del veneno y el perfil muestra un solo un pico con mayor amplitud de adsorción de 0,8.

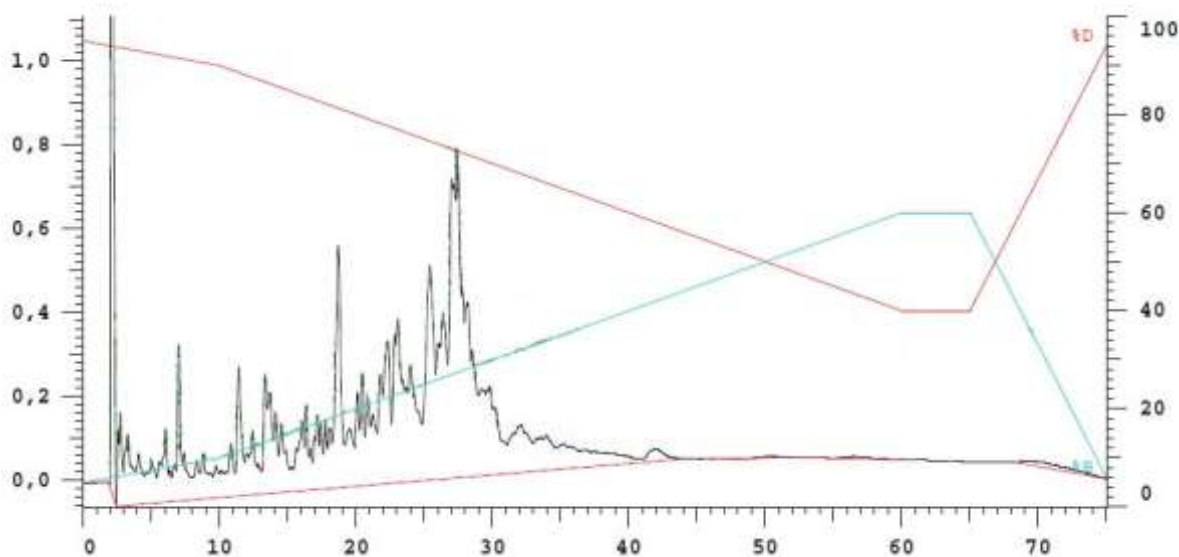


Figura 1. Perfil cromatográfico de RP-HPLC del veneno de escorpión del sistema Amicon® Ultra – 0.5 del retentado de tamaño de exclusión de 10KDa.

En la Figura 2 presenta el perfil de elución obtenido en una columna C18, sometida a las condiciones cromatográficas descritas en la metodología, se emplearon 50 µg de proteína del retentado del Amicon con un tamaño de exclusión de 3 KDa, con al menos 54 picos o señales entre los tiempos de retención de 0 a 35 minutos, se mostró separación de componentes proteicos del veneno y el perfil muestra un solo un pico con mayor amplitud de adsorción de 0,2.

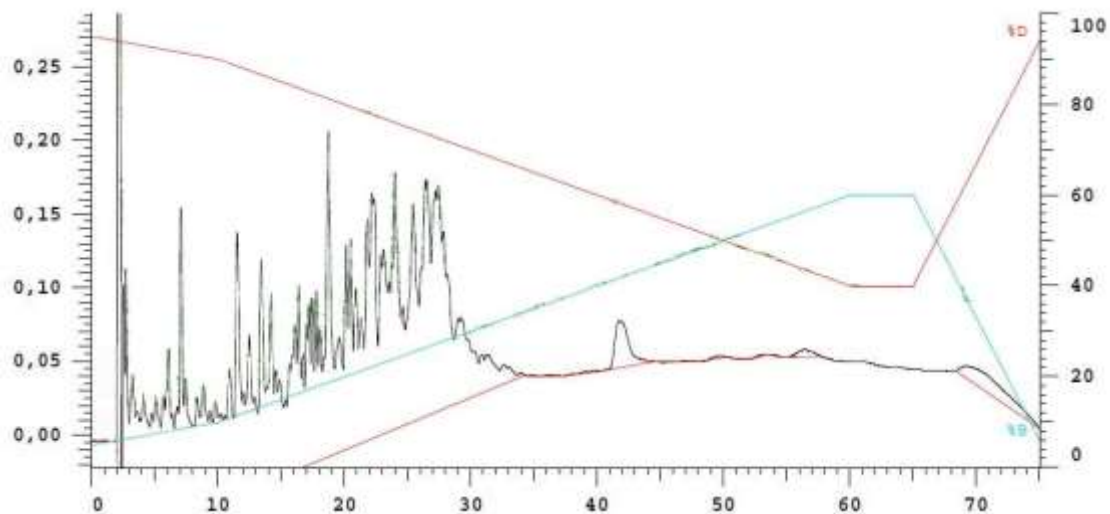


Figura 2. Perfil cromatográfico de RP-HPLC del veneno de escorpión del sistema Amicon® Ultra – 0.5 del retentado de tamaño de exclusión de 3KDa.

En la Figura 2 presenta el perfil de elución obtenido en una columna C18, sometida a las condiciones cromatográficas descritas en la metodología, se emplearon 49.8 µg de proteína del difusato del Amicon con un tamaño de exclusión de 3 KDa con al menos 45 picos o señales entre los tiempos de retención de 0 a 30 minutos se mostró separación de componentes proteícos del veneno y el perfil muestra dos picos con mayor amplitud de adsorción de 0,14.

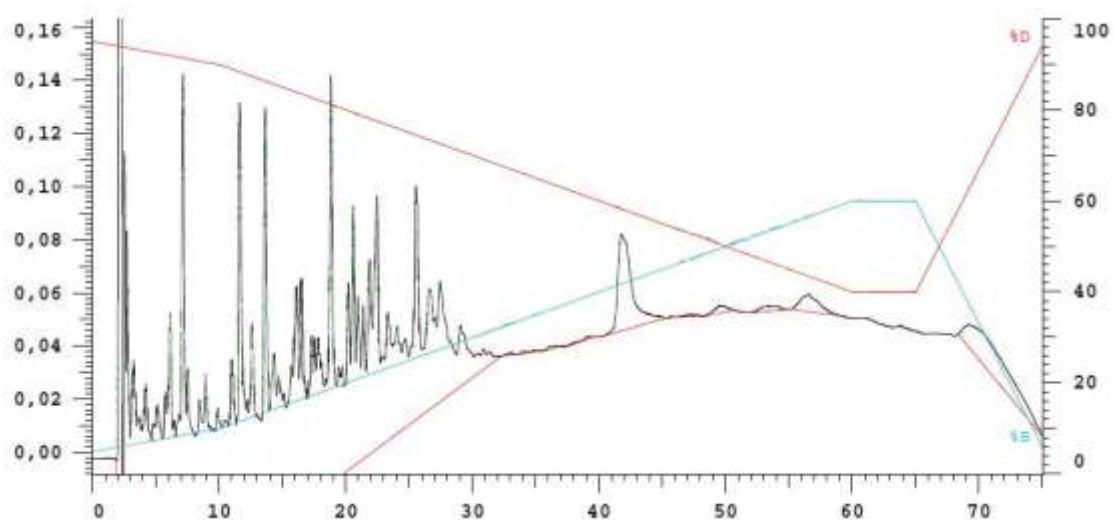


Figura 3. Perfil cromatográfico de RP-HPLC del veneno de escorpión del sistema Amicon® Ultra – 0.5 del difusato de tamaño de exclusión de 3KDa.

En la Figura 4, se muestra el perfil de elución obtenido en una columna C18 de los dos sistemas Amicon 3 DKa (difusato y retentato) y 10 KDa (retentato), la amplitud de los picos han disminuido dependiendo de la concentración presente del difusato 3KDa al retentato 10 KDa, además que varios picos de proteína han conservado su mismo tiempo de retención pero otros picos han desaparecido o han disminuido su intensidad.

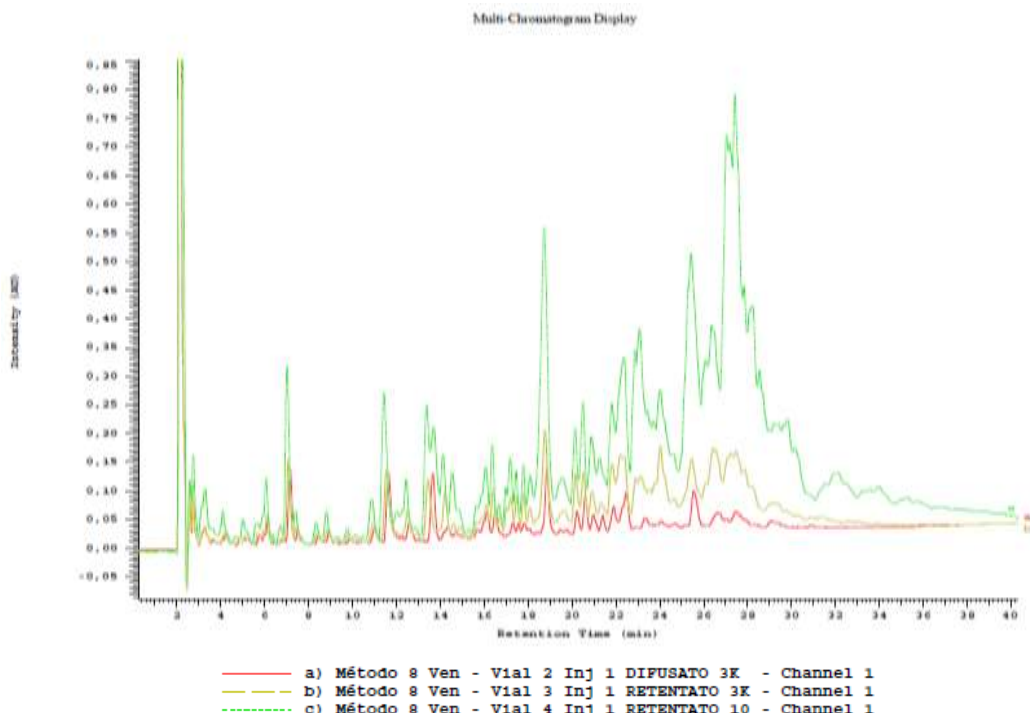


Figura 4. Comparación del perfil cromatográfico de RP-HPLC del veneno de escorpión del sistema Amicon® Ultra – 0.5 del difusato del Amicon 3KDa y del retentato del Amicon 3KDa y 10KDa.

En la Figura 4, con respecto al perfil RP-HPLC del veneno de *H. charcasus*, presentaron un patrón uniforme señales o picos de elución entre el difusato y retentato del sistema Amicon® 0.5 con tamaños de exclusión de 3KDa y 10 KDa, para este estudio se empleó 0,05 mg de proteína en diferentes tamaño de exclusión de sistema Amicon® 0.5, mostraron 50, 54 y 49 señales o picos de elución en un tiempo de 35 minutos (Figura 1,2 y 3), en comparación del perfil cromatográfico con RP-HPLC del veneno total de *Tityus macrochirus* que emplearon 0,018 mg de proteína total del veneno en un método lineal en fase inversa ya que en el presente estudio se detectaron claramente 19 señales (Rincón, 2017), esto sugiere que la número de especies peptídicas es proporcional a los miligramos de proteínas presentes en el veneno.

Por otro lado, los resultados de estudio difiere con el veneno de *Hadrurus gertschi*, en la purificación y caracterización del péptido Hadrucalcina (HdCa), que a partir de 4 mg de veneno soluble mediante HPLC, en un tiempo de 60 min, se mostraron aproximadamente 28 señales o picos de elución y además en un tiempo de retención de 12.24 min se encontró el péptido es HdCa (Schwartz et al., 2009), Asimismo, en otro estudio aislamiento y determinación del péptido Vejevina, que a partir de 2 mg de proteína de veneno soluble de *Vaejovis mexicanus* mediante RP-HPLC, se mostraron 28 señales o picos de elución, muy diferente al perfil de *H. charcasus* empleando menor cantidad de proteína y con más señales o picos de elución. (Hernández et al., 2011).

Consecuentemente también mostró diferencias con el veneno de *Tityus discrepans* con la purificación de péptidos denominados Bactridinas, que obtuvieron un perfil cromatográfico durante 45 minutos, la presencia de veintiocho señales o picos de elución (Diaz et al., 2009). Como también a partir de 0.03 mg de un pool de proteínas del veneno de *Tityus gonzalespongai* obtuvieron un perfil cromatográfico con 16 señales o picos de elución (Borges et al., 2013)

Con el resultado del presente estudio, se tiene un perfil preliminar cromatográfico que difiere a otros venenos de diferentes especies de escorpión, sobre todo en el número de señales o picos eluibles, siendo de interés evaluar su actividad biológica.

4. CONCLUSIONES

Se concluye:

El perfil cromatográfico del veneno de escorpión observado en cinco especies, permitieron determinar que los péptidos del extracto del veneno de escorpión *Hadruroides charcasus* presenta un patrón cromatográfico uniforme de péptidos útil con fines terapéuticos.

Presentaron mayor cantidad de señales o picos de elución al final de la cromatografía, considerados como péptidos más hidrofóbicos, luego de emplear el sistema Amicon® Ultra 0.5 de tamaño de exclusión de 10 KDa y 3KDa permite la concentración componentes proteicos con bajo peso molecular.

Las señales o picos o de elución del veneno de *H. charcasus* son semejantes a las bactridinas aisladas y caracterizadas del veneno de *T. discrepans* con secuencias aminoacídicas de 61 y 64 aa y con actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento al Grupo de Investigación en Proteínas de la Universidad nacional de Colombia sede en Bogotá, por la oportunidad para el desarrollo del trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borges, A.; Delgado, O.; Silva, S.; Bravo, J.; Velasco, E.; Rojas de Astudillo, L; De Sousa, L. 2013. Aislamiento y caracterización de un péptido del veneno de *Tityus gonzalespongai* (scorpiones, buthidae) con actividad sobre promastigotes de Leishmania (Leishmania) Mexicana. *Saber*. 25(4): 399-413.
- Castañeda, J.; Ortega, JA.; Venegas, AM.; Aquino, A.; Serafín, J.; Estrada, S.; Estrada, I. 2009. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. 18(1):16-29
- Díaz, P.; D'Suze, G.; Salazar, V.; Sevcik, C.; Shannon, JD.; Sherman, NE.; Fox, JW. 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon*. 54: 802–817
- Escobar, E.; Flores, L.; Rivera, C. 2008. Péptidos antibacterianos de los venenos de *Hadruroides mauri* y *Centruroides margaritatus*. *Rev. Perú. Biol*. 15(1): 139-142.
- Francke, O. 1977. Escorpiones y escorpionismo en el Perú VI, Lista de especies y claves para identificar las familias y los géneros, *Rev. Peru. Ento*. 20(1): 73-76.
- Fernández, E.; Galván, A. Métodos para la cuantificación de proteínas. [Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2016].
- Recuperado a partir de: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/27%20M%C3%89%20TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>
- García, BI.; Coronas, FIV.; Restano, R.; Rodríguez, RR.; Possani, LD. 2011. Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. *Toxicon*. 58: 18–27
- Harrison, PL.; Abdel, MA.; Miller, K.; Strong, PN. 2014. Antimicrobial peptides from scorpion venoms *Toxicon*. 88: 115 – 137
- Hernández, O.; Casado, I.; Iglesias, E.; Ramírez, A.; Del Risco, J.; Rodríguez, A. 2009. Evaluación de la toxicidad *in vitro* del veneno del alacrán *Rhopalurus junceus* a través de un ensayo celular *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 28(1): 1 -11
- Hernández, CA.; Silva, J.; Quintero, V.; Rodríguez, A.; Balderas, C.; Possani, LD.; Gurrola, GB. 2011. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus* *Toxicon*. 57 84–92
- Kuhn-Nentwig, L. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci* 60, 2651–2668.
- Pérez, O. 2013. Patrón Electroforético de Proteínas del veneno de escorpión *Hadruroides charcasus*. *Rev. Tzhoeco*. 5(1): 17 – 33.
- Rincón-Cortés, CA.; Reyes-Montaño, EA.; Vega-Castro, NA. 2017. Purificación parcial de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* (Buthidae) y evaluación preliminar de su actividad citotóxica. *Biomédica*. 37: 238 – 49
- Schwartz, EF.; Capes, EM.; Diego-García, E.; Zamudio, FZ.; Fuentes, O.; Possani, LD.; Valdivia, HH. 2009. Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *British Journal of Pharmacology*. 157, 392–403

- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. 1996. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* 68: 850 – 858.
- Targino, E.; Bergamo, A.; Gomes, EC.; Lima, PR.; Silva, KJ.; Melo, T.; Carvalho, E.; Matos, JP.; Silva-Junior, AA.; Guimarães, E.; Fernandes-Pedrosa, M. 2015. Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin. *Peptides.* 68: 3 – 10
- Wan, T.; Li, L.; Zhu, Z.; Liu, S.; Zhao, Y.; Yu, M. 2017. Scorpion Venom Active Polypeptide May Be a New External Drug of Diabetic Ulcer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* ID 5161565:1- 7.
- Uawonggul, N.; Thammassirirak, S.; Chaveerach, A.; Arkaravichien, T.; Bunyatratthata, W.; Ruangjirachuporn, W.; Jearanaiprepame, P.; Nakamura, T.; Matsuda, M.; Kobayashi, M.; Hattori, S.; Daduang, S. 2007. Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon.* 49: 19 – 29
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415 (6870): 389 -395.
- Zavaleta, A. 1983. El veneno del escorpión: Bioquímica y Farmacología, *Boletín de Lima* 30. 75-88