



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



PERFIL PROTEICO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL
VENENO DE *Scolopendra gigantea*.

Presentado por: Br. Claudio Granado

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Tutores

Lic. Eucandis Fuentes R.

Lic. Carmen Andara

Valencia, Junio 2014

DEDICATORIA

A mi madre, por haberme convertido en hombre de bien, por enseñarme que todo con esfuerzo se logra, por ser esa mujer que levanto a sus 5 hijos con sacrificio pero con mucho amor. A ti mama, TE AMO.

A mi papa, aunque este en otro plano, sé que desde allí aun me apoya como siempre. Gracias por todo.

A mi hermana Belkys, por ser mi ejemplo a seguir, por ser una de las pocas personas que nunca me pone peros, todo para lograr lo que me propusiera. Por enseñarme que la dedicación y responsabilidad son pilares fundamentales en una persona.

A mi hermana Yasmel, por dedicarme parte de su tiempo en afianzar cada uno de mis conocimientos. Por esas tardes y horas en las que me enseñaste a leer y sumar, todo para ser siempre el mejor.

A mis hermanos, Benjamin y Domingo, por sacarme de esos pequeños aprietos técnicos con mis maquetas, trabajos manuales y cualquier cantidad de actividades metalúrgicas, de pintura, entre otros., en las que me metía sin saber siquiera si las podía hacer.

A mis sobrinos Dominic, Daimary, Daniel, Dairimar, Catherinne, Gabriel, Luis Manuel, Santiago y Eduardo, por hacerme reír con sus ocurrencias y a veces sacarme de quicio. Todo eso me hace sentir orgulloso de ser su tío.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Candi, por haber aceptado este reto conmigo y por hacerlo tuyo. Por sufrir conmigo el miedo de manipular a las niñas (escolopendras) hasta hacernos los mejores criadores de ciempiés. Por quedarse hasta tarde ayudándome, y también por esas tardes de café que me despertaban el ánimo. Más que una tutora, se convirtió en una gran amiga.

A mi tutora Carmen, por lanzarse conmigo en este gran proyecto, por creer en las capacidades de este Gallo Claudio y por darle rienda suelta a mis ideas locas sobre el protocolo de cría, porque tenía la convicción de que lograría eso y más. Los resultados hablan sobre eso. Muchas gracias.

A mi jurado Carlos Moreno, por su guía, por su atención con mi trabajo, por siempre encontrar ese detalle no visible que enriquecía cada vez mi investigación. Por sus chistes malos y por enseñarme a ver bandas fantasmales en los geles de electroforesis.

Al profesor Rafael Fernández, por su apoyo incondicional a mi trabajo y sus consejos, por esas tardes que en conjunto con mis tutores y amigos, compartimos mientras montaba un gel o una actividad enzimática.

A mis dos peques Valeria y Leonardo, mis organismos simbioses del laboratorio, por esos días enteros de trabajo, los almuerzos de todos los días, por sus sugerencias y aportes a mi Trabajo Especial de Grado. Gracias amigos, son LOS MEJORES.

A mis otras dos peques, Ángeles y Claudia. Por su increíble sinceridad y por siempre esperarme (o presionarme) para comer todos juntos a la hora. Por siempre ser parte de esos amigos que me quieren tal cual como soy, con mis arranques y ocurrencias.

Al técnico de laboratorio Luis Gaviria, por siempre tenernos las soluciones de laboratorio al día y por esos momentos de conversación que me ayudaban a despejar la mente y pensar que todo iba por un buen camino.

A la profesora Mariela Forti y al técnico de Laboratorio Dayana Araujo, por permitir y alojar los terrarios de mis pequeñas en el Laboratorio de Docencia IX.

A Emil Hurtado y su familia, por abrirnos las puertas de su casa durante la salida de campo de mi investigación. Muchas gracias por su ayuda incondicional y por la calidez de su hogar.

Al señor Antonio, por aceptar a llevarme a mis salidas de campo. También por ayudarme a capturar a mis ciempiés.

Y a todo el mancomunado que conforma el Departamento de Biología y afines, que aportaron un granito de arena para la ejecución de mi tesis. Gracias Ricardo Gámez, Patricia Díaz, Ana Karina, Prof. Jonathan Liria, Prof. Mario Palacios, Clara, Oriana, Denys, Manuel Piñero, Petit, Vilisa, Wendy, Aurita, Javier Rodríguez, Eduardo, Sennia, Maurelys, entre otros más.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	2
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo General	6
1.3.2. Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	8
2.1. Biología de Chilopoda	8
2.2. Morfología y ecología del Género <i>Scolopendra</i>	9
2.3. <i>Scolopendra gigantea</i> en Venezuela.....	10
2.4. Veneno y manifestaciones clínicas	11
2.5. Reportes de emponzoñamientos con ciempiés en Venezuela	13
2.6. Purificación de extractos proteicos y actividades enzimáticas asociadas al veneno de especies del Género <i>Scolopendra</i>	15
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	21
3.1. Zonas de colecta de ejemplares de <i>Scolopendra gigantea</i>	21
3.2. Identificación taxonómica de los ejemplares de <i>S. gigantea</i>	22
3.3. Protocolo de cría de <i>Scolopendra gigantea</i>	22
3.3.1. Terrario	24
3.3.2. Condiciones de temperatura, humedad y luz.....	24

3.3.3.	Alimentación	25
3.3.4.	Lugar de mantenimiento de los especímenes	25
3.3.5.	Destino de los ejemplares al finalizar la investigación	26
3.4.	Extracción del veneno	26
3.5.	Determinación de proteínas totales	27
3.6.	Perfil electroforético del veneno	27
3.7.	Detección de actividad proteasa mediante zimografía.....	28
3.8.	Estudio de la actividad enzimática del veneno	30
3.8.1.	Actividad hemolítica	30
3.8.2.	Actividad coagulasa	31
3.9.	Determinación cualitativa de carbohidratos presentes en el veneno de <i>S. gigantea</i>	32
3.9.1.	Determinación de presencia de carbohidratos.....	32
3.9.2.	Determinación de monosacáridos y disacáridos reductores	32
3.9.3.	Determinación de aldosas y cetosas	33
3.9.4.	Determinación de pentosas y hexosas	33
3.9.5.	Determinación de polisacáridos	34
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....		35
4.1.	Proteínas totales en el extracto de veneno de <i>S. gigantea</i>	35
4.2.	Actividad proteasa del veneno de <i>S. gigantea</i>	44
4.3.	Actividad hemolítica del veneno <i>S. gigantea</i>	49
4.4.	Actividad coagulasa del veneno <i>S. gigantea</i>	52
4.5.	Identificación de carbohidratos en el veneno de <i>S. gigantea</i>	53
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....		54

5.1.	Proteínas totales y perfil electroforético del veneno de <i>S. gigantea</i>	54
5.2.	Enzimas proteolíticas en el veneno <i>S. gigantea</i>	58
5.3.	Hemólisis directa y efecto coagulante del veneno <i>S. gigantea</i>	62
5.4.	Presencia de carbohidratos en el veneno de <i>S. gigantea</i>	64
5.5.	Consideraciones finales.....	65
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		66
6.1.	CONCLUSIONES	66
6.2.	RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA		69
APÉNDICE		1

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de calibración de Suero Albúmina Bovino (BSA) 1mg/ml para la reacción de Bradford, utilizada para determinar la concentración de proteínas en las soluciones de veneno.....	11
Figura 2. Curva de calibración del Marcador de Peso Molecular utilizada para el perfil proteico al 12% de acrilamida-bisacrilamida.	11
Figura 3. Perfil proteico del veneno de <i>S. gigantea</i> al 12% de acrilamida-bisacrilamida, en condiciones nativas y desnaturalizantes. A) Perfil proteico obtenido mediante fotografía. B) Esquema del perfil proteico diseñado para visualizar mejor las bandas de proteínas presentes en la fotografía. C1 (carril 1): marcador de peso molecular (MPM); C2 (carril 2): muestra de veneno en condiciones nativas; C3 (carril 3): muestra de veneno en condiciones desnaturalizantes.....	37
Figura 4. Curva de calibración del marcador de peso molecular utilizada para el perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-16.5% de acrilamida-bisacrilamida para el veneno de <i>S. gigantea</i>	12
Figura 5. Perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-16.5% acrilamida-bisacrilamida del veneno de <i>S. gigantea</i> en condiciones nativas y desnaturalizantes. A) Perfil proteico obtenido mediante fotografía. B) Esquema del perfil proteico diseñado para visualizar mejor las bandas de proteínas presentes en la fotografía. C1 (carril 1): marcador de peso molecular (MPM); C2 (carril 2): muestra de veneno en	

condiciones nativas;. C3 (carril 3): muestra de veneno en condiciones desnaturalizantes.39

Figura 6. Curva de calibración del Marcador de Peso Molecular utilizada para el perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-14% de acrilamida-bisacrilamida..... 12

Figura 7. Perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-14% de acrilamida-bisacrilamida del veneno de *S. gigantea* en condiciones nativas y desnaturalizantes. A) Perfil proteico obtenido mediante fotografía. B) Esquema del perfil proteico diseñado para visualizar mejor las bandas de proteínas presentes en la fotografía. C1 (carril 1): marcador de peso molecular (MPM); C2 (carril 2): muestra de veneno en condiciones nativas. C3 (carril 3): muestra de veneno en condiciones desnaturalizantes.42

Figura 8. Actividad proteolítica del veneno de *Scolopendra gigantea* en geles de 12% acrilamida-bisacrilamida, suplementados con un sustrato de gelatina al 0.1% p/v. A) Fotografía inversa de la zimografía, denotando las areas oscuras como las zonas de actividad enzimática. B) Sección del esquema del perfil proteico al 12% de acrilamida-bisacrilamida. C) Fotografía de la zimografía, denotando las areas claras como las zonas de proteólisis. Las zonas de las fotografías marcadas con el rectangulo rojo son las que presentaron las actividades enzimáticas. Las bandas de color azul presentes en el esquema del perfil proteico, son las que presentan actividad enzimática. C1 y C2: muestras desnaturalizadas; C3 y C4: muestras nativas; C6: control positivo, tripsina 0.05 µg/µL; y C7: control negativo, TFA 0.1% v/v.45

Figura 9. Actividad proteolítica del veneno de *Scolopendra gigantea* en geles de 12% acrilamida-bisacrilamida, suplementados con una sustrato de gelatina al 0.1% v/v y con acción del inhibidor PMSF 10 mM. Las zonas sombreadas con el rectángulo negro son las bandas sin actividad enzimática, mientras que las sombreadas con el rectángulo rojo si presentaron degradación enzimática en el gel. C1 y C2: muestras nativas; C3: control positivo, tripsina 0.05 µg/µL; C4: control negativo, TFA 0.1% v/v.47

Figura 10. Actividad proteolítica del veneno de *Scolopendra gigantea* en geles de 12% acrilamida-bisacrilamida, suplementados con una sustrato de gelatina al 0.1 % v/v y con acción del inhibidor EDTA 0.1 M. Las zonas sombreadas con el rectángulo negro son las bandas sin actividad enzimática, mientras que las sombreadas con el rectángulo rojo si presentaron degradación enzimática en el gel. C1 y C2: muestras nativas; C3: control positivo, tripsina 0.05 µg/µL; C4: control negativo, TFA 0.1% v/v.....49

Figura 11. Diagrama de cajas para los porcentajes de hemólisis obtenidos según el volumen de veneno y el tiempo de incubación.52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Concentración proteica final del veneno en las muestras de actividad hemolítica, según el volumen añadido.	50
Tabla II. Análisis de Varianza (ANOVA) del porcentaje de hemólisis para dos factores (volumen de veneno y tiempo de incubación). F: valor en la distribución; p (iguales): probabilidad de las varianzas del error y del tratamiento sean iguales.	50
Tabla III. Comparaciones múltiples de los porcentajes de hemólisis para dos factores (volumen de veneno y tiempo de incubación). p (iguales): probabilidad de que los tratamientos comparados sean iguales.	51
Tabla IV. Pruebas bioquímicas para la determinación cualitativa de carbohidratos en el veneno de <i>S. gigantea</i> . Leyenda: + (aparición de coloración y/o precipitado), - (sin aparición de coloración y/o precipitado).....	53



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología.
Departamento de Biología



PERFIL PROTEICO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL VENENO DE *Scolopendra gigantea*

Autor: Claudio Granado

Tutores: Eucandis Fuentes y Carmen Andara

RESUMEN

La expansión de poblaciones humanas hacia los nichos ecológicos del quilópodo ponzoñoso *Scolopendra gigantea*, ha provocado el incremento de los casos por emponzoñamiento con este animal. No existen tratamientos específicos para contrarrestar el considerable efecto nocivo de su veneno en la región afectada, debido a la escasa información sobre su naturaleza bioquímica. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar el perfil proteico y la actividad enzimática del veneno de *S. gigantea*. Ejemplares de *S. gigantea* fueron colectados en el Estado Falcón y mantenidos en cautiverio con fotoperiodicidad nula, 80% de humedad relativa y 26-30°C de temperatura. Se empleó SDS-PAGE continuo y en gradiente discontinuo para el perfil proteico, y zimogramas para la actividad proteasa empleando EDTA y PMSF como inhibidores. La actividad hemolítica y la coagulasa se evaluaron en eritrocitos (ORh⁺) y en suero humano, respectivamente. Se determinó la presencia de carbohidratos mediante pruebas bioquímicas cualitativas. El perfil proteico al 8-14% presentó la mejor resolución de bandas proteicas, con 28 en condición nativa y 22 en condición reductora de entre 22-250 KDa. Se observaron 4 bandas con actividad serinproteasa (100, 116 y dos $\geq$ 250 KDa), y 3 bandas con actividad metaloproteasa (51, 26 y 22 KDa). Se obtuvo 89.57% de hemólisis inicial para 2 μ L de veneno, con hemólisis completa a las 2 h, lo que sugiere la presencia de toxinas con elevada actividad hemolítica. No se evidenció actividad coagulante. La presencia de cetosas podría relacionarse a glicoproteínas, posiblemente de tipo hialuronidasa.

Palabras clave: actividad hemolítica, proteólisis, toxinas, actividad coagulasa.



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología.
Departamento de Biología



PROTEIC PROFILE AND ENZIMATIC ACTIVITY OF THE VENOM OF *Scolopendra gigantea*

Author: *Claudio Granado*

Tutors: *Eucandis Fuentes y Carmen Andara*

ABSTRACT

The expansion of human settlements into the ecological niches of the venomous centipedes *Scolopendra gigantea* has provoked the increment of cases of poison by this animal. There are not specific treatments to counteract the damaging effect of its poison in the affected area, due to the limited information about its biochemical nature. Because of this, the goal of this study was determine the proteic profile and the enzymatic activity of the venom of *S. gigantea*. Specimens of *S. gigantea* were collected at Falcon state and maintained in captivity with null photoperiodism, 80% of relative humidity and 26-30°C of temperature. It was used continuous SDS-PAGE and in discontinuous gradient to the proteic profile, and zymograms for the protease activity using EDTA and PMSF as inhibitors. The hemolytic activity and the coagulase were evaluated in erythrocytes (ORh⁺) in human blood serum, respectively. It was determined the presence of carbohydrates by qualitative biochemical tests. The proteic profile at 8-14% presented the best resolution of proteic bands, with 28 in native condition and 22 in reductive condition of 22-250KDa. It was observed 4 bands with serinprotease activity (100, 116 and two $\geq$ 250 KDa), and 3 bands with metalloprotease activity (51, 26 and 22 KDa). It was obtained 89.57% of initial hemolysis for 2 μ L of poison, with complete hemolysis at 2 hours, which suggest the presence of toxins with elevated hemolytic activity. It wasn't observed coagulated activity. The presence of ketoses could be related to glycoproteins, probably the hyaluronidase type.

Keywords: hemolytic activity, proteolysis, toxins, coagulase activity.

INTRODUCCIÓN

Los ciempiés pertenecientes al género *Scolopendra* (Clase Chilopoda), son invertebrados que poseen como característica principal la presencia de un par de patas modificadas, denominadas forcípulas (Edgecombe & Giribet, 2007). A través de estas forcípulas, los ciempiés tienen la capacidad de inocular veneno para defensa y captura de presas, provocando problemas sistémicos en los animales que sufren su mordedura, a causa de la presencia de una gran variedad de toxinas (Yildiz *et al.*, 2006). A nivel global, son muchas las especies de este género de ciempiés que han sido estudiadas para determinar la composición bioquímica de su coctel tóxico, y su posible implicación en contactos traumáticos en humanos (Malta *et al.*, 2008). En Venezuela, se han realizado trabajos ecológicos y fisiopatológicos de *Scolopendra gigantea*, a causa del número de accidentes por emponzoñamiento asociados a este invertebrado, en distintas áreas rurales y urbanas (González *et al.*, 2000; Molinari *et al.*, 2005; Parrilla *et al.*, 2008). Pero es muy escasa la información sobre las moléculas biológicamente activas de este veneno, lo que deriva en tratamientos poco específicos y de efectividad limitada para controlar y minimizar la afectación del veneno en personas que han sufrido mordeduras por parte de este quilópodo (Cazorla *et al.*, 2012). Debido a esto, en el siguiente trabajo se determinó el perfil proteico del veneno de *S. gigantea*, y las actividades enzimáticas asociadas a esta sustancia nociva natural, con la finalidad de generar las bases bioquímicas necesarias para la implementación de estrategias farmacológicas específicas que permitan contrarrestar la acción dañina de este veneno.

CAPÍTULO I.

EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Generalmente, los extractos de veneno de los animales ponzoñosos son mezclas complejas compuestas casi en su totalidad por moléculas proteicas, en formas biológicamente activas como enzimas, o toxinas con actividad neurotóxica y/o hemolítica. Dichas proteínas cumplen funciones específicas al ingresar al organismo de las presas, ya sea para digerir sus tejidos, provocar parálisis corporal u otras reacciones sistémicas, que permitan al depredador capturar y consumir dichos animales (Calvete *et al.*, 2009). Ofidios, algunos himenópteros, escorpiones y arañas, son los grupos animales más estudiados en el campo de la biología, en lo que se respecta a la composición y acción de sus venenos en los sistemas biológicos, así como también su comportamiento y ecología, lo cual ha sentado las bases para disminuir los contactos traumáticos con estos animales y encontrar fármacos más eficientes para contrarrestar los efectos de sus toxinas (D'Suze *et al.*, 2011). Dentro de este grupo, los ciempiés, también tienen un papel toxicológico importante, pero que se ha menospreciado por la poca información que se posee sobre ellos.

Al igual que los demás animales ponzoñosos, los ciempiés presentan una gran variedad de componentes proteicos asociados a distintas alteraciones fisiológicas, por lo cual estos invertebrados han adquirido una relevancia médica en estos tiempos, siendo las especies más estudiadas, tanto ecológica como bioquímicamente,

Scolopendra morsitans (Balit *et al.*, 2004; Rowland *et al.*, 2005; Cupul-Magaña, 2010), *Scolopendra angulata* (Rates *et al.*, 2007), *Scolopendra viridicornis* (Bhagirath *et al.*, 2006; Rates *et al.*, 2007), *Scolopendra viridis* (Cupul-Magaña, 2007; González-Morales *et al.*, 2009) y *Scolopendra subspinipes* (Wenhua *et al.*, 2006). En nuestro país, la especie en estudio es *S. gigantea*, habiendo varias publicaciones sobre sus hábitos alimenticios (Molinari *et al.*, 2005), pruebas histopatológicas de su veneno (sobre todo relacionado con lesiones de rabdomiólisis y necrosis a nivel muscular) (González *et al.*, 2000) y desarrollo de un suero antiescolopéndrico para combatir los efectos por envenenamiento con este tipo de ciempiés (Parilla-Álvarez *et al.*, 2008). Dichos trabajos solo han identificado algunas de las posibles moléculas que componen el veneno de *S. gigantea*, y que pueden estar relacionadas con el desencadenamiento de las reacciones alérgicas y lesiones traumáticas en las personas que sufren su mordedura, pero ninguno ha e.

En Venezuela, existen pocos estudios centrados en la composición bioquímica del veneno de los quilópodos, específicamente para el género *Scolopendra*. La gran mayoría de las investigaciones realizadas estuvieron basadas en taxonomía y ecología de estos invertebrados. La falta de interés en conocer la composición bioquímica del veneno de estos escolopendromorfos, además de verse afectada por lo poca información disponible sobre estos animales, también está influenciada por la baja mortalidad relacionada con sus mordeduras, en comparación con los casos clínicos con escorpiones y ofidios, y por la poca evidencia de síntomas graves a nivel sistémico causados por su veneno (Rates *et al.*, 2007).

Considerando que la generación de tratamientos específicos requiere información detallada sobre la composición del veneno, las proteínas son el principal punto de enfoque en este trabajo. El estudio sobre la composición proteica del coctel tóxico de estos animales venenosos permiten evaluar sus posibles interacciones sinérgicas, y sus actividades enzimáticas (Calvete *et al.*, 2009; Ruiz & Ruiz, 2009). Con respecto a este último punto, las enzimas han tenido un trato importante para determinar su implicación en los distintos daños epidérmicos y tisulares del veneno, siendo las proteasas, las principales enzimas estudiadas (Ruiz & Ruiz, 2009). Así mismo, enzimas de naturaleza lipopolipeptídicas y glicoproteicas, han sido evidenciadas en tales extractos de veneno, actuando como agentes dispersores y maximizadores de las reacciones alérgicas del veneno (Borges & De Souza, 2006).

De acuerdo con lo antes expuesto, este trabajo se ha planteado con la finalidad de aportar información relevante acerca de la composición del veneno de este invertebrado ponzoñoso y de cómo podría actuar a nivel sistémico, de acuerdo a las actividades enzimáticas que pueda poseer el mismo.

1.2. Justificación

2. El envenenamiento de seres humanos a causa de mordeduras de animales ponzoñosos, representa uno de las problemáticas médicas actuales, donde la incidencia de casos relacionados al efecto de estas toxinas naturales, han ido en aumento por la expansión urbanística de ciudades y pueblos, conllevando a la ocupación de los espacios naturales de estos organismos venenosos (D'Suze *et al.*, 2011).

El emponzoñamiento con quilópodos, particularmente los que pertenecen al género *Scolopendra* -denominado escolopendrismo-, es uno de los diferentes casos por envenenamiento con invertebrados venenosos en la gran mayoría de la región neotropical (Machado-Allison & Rodríguez-Acosta, 1998; Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000). Esto se debe a que las poblaciones humanas se han asentado en los ambientes naturales de estos animales, aumentando el número de encuentros entre los ciempiés y humanos, ya que estos miriódodos prefieren sitios húmedos y sombreados, siendo las viviendas un medio idóneo para usarlo como refugio (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000). Esto constituye un factor de riesgo, debido a que, tal como se mencionó anteriormente, la mordedura de estos miriódodos -en particular los quilópodos- generalmente produce en adultos eritemas, edemas, intenso dolor, fiebre, debilidad, linfagitis local, isquemia, rabdomiólisis y necrosis del área afectada, haciéndose indispensable el uso de antihistamínicos por vía oral y endovenosa (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000; Yildiz *et al.*, 2006; Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008; Bashir, 2010).

El estudio de la composición proteica del extracto de veneno de *Scolopendra gigantea*, sentaría las bases para posibles tratamientos farmacológicos, identificando los componentes tóxicos del veneno que ejercen mayor incidencia sistémica y usarlos como blancos terapéuticos, ya sea generando moléculas bloqueadoras de las actividades proteolíticas o la inhibición de las posibles neurotoxinas presentes en coctel tóxico (Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008). La determinación de las actividades hemolíticas y coagulantes de un veneno, son fundamentales ya que permiten evitar

posibles complicaciones hemorrágicas en los individuos afectados por la mordedura de un animal venenoso, debido a que se alteran los factores de la cascada de coagulación sanguínea y disminuye el transporte de oxígeno hacia los tejidos por la lisis de los eritrocitos (Yoshida-Kanashiro *et al.*, 2003). Así mismo, el estudio de la presencia de carbohidratos dentro de la mezcla de veneno, determinaría enzimas de naturaleza glicoproteicas, lo cual permitiría realizar tratamientos para evitar su acción difusora de los complejos tóxicos (Malta *et al.*, 2008).

Por último, la identificación de las actividades biológicas de cada uno de los componentes del veneno de este ciempiés, asomaría la posibilidad de que estas moléculas sean purificadas y utilizadas con un fin médico y biotecnológico, tal como lo han realizado investigadores del Sur de Asia con otras especies del Género *Scolopendra* (Yang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Debido a las premisas antes mencionadas, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar el perfil proteico del veneno del ciempiés *Scolopendra gigantea*, y las actividades proteolíticas asociadas al veneno de este quilópodo.

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo General

- Estudiar el perfil proteico y la actividad enzimática del veneno de *Scolopendra gigantea*, mediante pruebas bioquímicas, celulares y moleculares.

2.1.2. Objetivos específicos

- Determinar el perfil electroforético de las fracciones proteicas del veneno de *S. gigantea*.
- Detectar mediante técnicas zimográficas las actividades proteasas del veneno de *S. gigantea*.
- Evaluar la actividad hemolítica y coagulasa del veneno de *S. gigantea* en muestras de eritrocitos humanos tipo ORh⁺.
- Identificar cualitativamente la presencia de carbohidratos en el veneno de *S. gigantea*.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1. Biología de Chilopoda

Los miriápodos de la Clase Chilopoda son invertebrados que tienen un cuerpo aplanado, formado por un tronco y la cabeza compuesta por un complejo sistema bucal. Generalmente, viven en ambientes terrestres con alta humedad relativa, escondiéndose entre troncos y piedras, y presentan hábitos nocturnos ya que son muy sensibles a las altas temperaturas (Edgecombe & Giribet, 2007; Hickman *et al.*, 2008). Su cuerpo está formado entre 15 y 197 segmentos, que varían de acuerdo al Orden, y cada uno de ellos contiene un par de patas articuladas, que constituyen el carácter morfológico utilizado para su identificación taxonómica. El primer par de patas de su primer segmento está modificado en uñas o colmillos venenosos, denominados forcípulas, usado para defensa o captura de presas; su último par de patas presentan una longitud muchos mayor que las demás, y se cree que posee función sensorial (Hickman *et al.*, 2008). Poseen pequeños ocelos en la placa cefálica, con un par de antenas y con uno o dos pares de maxilares. Presentan separación de sexos, con reproducción ovípara en la mayoría de las especies (Hickman *et al.*, 2008).

Estos quilópodos están representados por más de 3500 especies de ciempiés distribuidos principalmente en zonas neotropicales como el norte de Colombia, Venezuela, Brasil, Trinidad y Tobago, Curazao, Aruba e India, y zonas templadas

como la Península Ibérica, países cercanos al Mar Mediterráneo, Argentina, Chile, México, Estados Unidos, China, Japón, entre otros (Khanna & Yadav, 2005). Tales invertebrados se encuentran organizados en 5 ordenes principales: Scutigleromorpha, Lithobiomorpha, Craterostigmomorpha, Scolopendromorpha y Geophilomorpha (Edgecombe & Giribet, 2007). El orden Scolopendromorpha contiene las especies de quilópodos con mayor talla y con una especialización de su sistema bucal, proveyendo la formación de glándulas venenosas acopladas a sus forcípulas. El género más representativo de este orden es *Scolopendra* (Edgecombe & Giribet, 2007).

2.2. Morfología y ecología del Género *Scolopendra*

Los escolopendromorfos, principalmente del género *Scolopendra*, presentan las forcípulas más desarrolladas de los miriápodos, usándolos como herramienta de captura de presas gracias a la inoculación de veneno a través de dichas estructuras (Edgecombe & Giribet, 2007). Este sistema venenoso deriva de un par de patas modificadas que poseen un conducto que conecta a una glándula de veneno, productora de un conjunto de sustancias entre las cuales se encuentra histamina, lípidos, polisacáridos y varias enzimas, que son inyectadas a sus presas para inmovilizarlas y poder lograr su digestión completa (Yildiz *et al.*, 2006).

La talla de las especies pertenecientes al género *Scolopendra* puede oscilar entre 27-30 cm de largo, formado por 21 segmentos, (Shelley & Kiser, 2000), siendo los quilópodos de mayor tamaño a nivel mundial, contando con aproximadamente 90

especies para este género, siendo la última revisión taxonómica, la realizada por Attems (1930). Así mismo, su hábito alimenticio, se basa principalmente en la depredación de ranas y sapos menores a 95 mm, lagartijas y serpientes jóvenes menores a 247 mm, aves juveniles y pequeños mamíferos como los ratones domésticos (Carpenter & Gillingham, 1984). Molinari *et al* (2005), reportaron en La Cueva del Guano de la Península de Paraguaná en Venezuela, la depredación por parte de *Scolopendra gigantea* de tres especies de murciélagos (*Mormoops megalophylla*, *Pteronotos davayi* y *Leptonycteria curasoae*). En este evento se observó que el ciempiés escalaba hasta el techo de las cuevas y atrapaba a los murciélagos antes de que alzaran vuelo, sometiendo a estos mamíferos de mayor peso. Esto le confiere una ventaja como depredador ya que captura sus presas donde ellas consideran estar a salvo y refugiadas.

2.3. *Scolopendra gigantea* en Venezuela

En territorio venezolano, el representante más común del género *Scolopendra*, es *S. gigantea*. Estos individuos presentan coloración marrón-negruzca, marrón rojiza o marrón verdosa, la cual estará determinada por la región del país en la cual habitan (González *et al.*, 2000). Suelen encontrarse en zonas aledañas al piedemonte de la Cordillera de la Costa, por lo cual su distribución es amplia a lo largo de este complejo montañoso (González *et al.*, 2000). También se pueden encontrar en zonas xerófilas del estado Nueva Esparta y Falcón, siendo reportadas en cavernas asociadas a grandes grupos de quirópteros (Molinari *et al.*, 2008).

Esta especie de escolopendromorfo es la más grande conocida, llegando a tener una longitud máxima reportada de 30 cm. Su cuerpo está compuesto por 21 segmentos, cada segmento con un par de patas, de los cuales el primer par de patas está modificado en forcípulas, y los últimos dos pares (dirigidos hacia atrás) funcionan como sistema sensorial (González *et al.*, 2000). El complejo bucal está formado por un par de mandíbulas, un par de primeros maxilares y otro par de segundos maxilares, con los cuales desgarran a sus presas. Su respiración se basa en un sistema traqueal con aberturas externas llamadas espiráculos, ubicándose detrás de las patas entre las capas quitinosas superior e inferior, las cuales estos espiráculos están posicionados en los segmentos 4, 6, 8, 11, 15, 17, 19 y 21 en esta especie de quilópodo (González *et al.*, 2000). Debido a la gran talla que presenta esta especie, suele asociarse como animal potencialmente peligroso por su capacidad para inocular veneno a través de su aparato forcipular (González *et al.*, 2000).

2.4. Veneno y manifestaciones clínicas

Un veneno o toxina, es una sustancia que puede producir un efecto nocivo en los seres vivos, desequilibrando sus sistemas dinámicos (Monzón & Blasco, 1997). En el caso de invertebrados venenosos, como los ciempiés, escorpiones y arañas, este veneno es un coctel o mezcla de sustancias formadas por secreción de una estructura glandular (o glándula venenosa), acoplada a una estructura anatómica especializada en su inoculación. Por ello, los animales considerados ponzoñosos son aquellos que presentan dicha estructura (Navarrete *et al.*, 2006). Estas sustancias nocivas

generalmente son producidas para usarlas como mecanismo de defensa o para depredación (Navarrete *et al.*, 2006).

Los venenos generalmente están constituidos por dos componentes primordiales: enzimas y toxinas. Entre las enzimas están las proteasas que realizan una actividad predigestiva de los tejidos, trabajando en conjunto con fosfolipasas que digieren las membranas plasmáticas de las células afectadas, y con hialuronidasas encargadas de la difusión de los componentes tóxicos del veneno por el torrente sanguíneo de la presa (Menez, 2002). Las toxinas cumplen un papel importante actuando a nivel sináptico, presináptico o postsináptico, modulando los canales iónicos de las células excitables (Gawade, 2007). En el momento en que este complejo de toxinas es introducido en un organismo vivo, mediante la mordedura de los invertebrados antes mencionados, se genera una respuesta fisiológica que promueve o inhibe una reacción bioquímica compleja, donde el sistema inmune participa induciendo anticuerpos neutralizantes o antitoxinas, provocando un conjunto de síntomas y lesiones que comprometen la supervivencia del animal afectado (Wallace, 2007; Núñez, 2011).

En el caso del género *Scolopendra*, este veneno puede poseer serotonina, acetilcolina, histamina, lípidos, polisacáridos y enzimas como proteasas, hialuronidasas y esterases (Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008). En mamíferos, este coctel de veneno induce un incremento del ritmo cardiovascular, consecuencia sistémica de la activación de receptores muscarínicos (Yildiz *et al.*, 2006). Así mismo, puede generar edemas severos, fiebre, linfagitis local y hasta necrosis del área afectada (Parrilla-Álvarez *et al.*, 2008). También se ha reportado que puede generar rabdomiolisis en tejido

muscular, y hepatocitos con generación hidrópica en el hígado (González *et al.*, 2000). Los pocos tratamientos existentes para las mordeduras de estos animales están basados en la disminución del dolor (antihistamínicos), debido a la presencia de histaminas, acetilcolina y otras moléculas involucradas en reacciones alérgicas (Yildiz *et al.*, 2006).

2.5. Reportes de emponzoñamientos con ciempiés en Venezuela

En Venezuela, en el año 1999, se reportó un caso notable sobre la mordedura por *S. gigantea* en un recién nacido. En el mismo describen que un neonato de 28 días de nacido recibió una mordedura por parte de este invertebrado, produciéndose en el área afectada un edema, dolor intenso, fiebre y presencia de coágulos en la mordedura, por lo cual fue tratado con hidrocortisona endovenosa y acetaminofen oral, en base al cuadro clínico presentado (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000). Para el año 2004, Acosta & Cazorla registraron 17 casos de accidentes con *Scolopendra* sp., en la población rural de Río Seco, Estado Falcón, Venezuela. Así mismo, Cazorla *et al.*, (2012), presentaron 11 casos de emponzoñamiento por ciempiés en la Bahía de Adícora de la Península de Paraguaná, Estado Falcón, entre los años 2006 y 2007, donde la mayoría de las personas afectadas estaban en un rango de edad de 39-62 años, principalmente residentes de la zona, con mordeduras en los miembros inferiores producidas durante la noche y presentándose los casos clínicos generalmente en la estación seca comprendida entre los meses de diciembre-abril.

Desde el año 2002 hasta el 2009, la Dirección de Información Social y Estadística, ha reportado un total de 51 muertes de individuos (5 hembras y 46 varones) por contacto traumático con ciempiés (DISE, 2003; DISE, 2004). El rango de edad de los individuos que perecieron por este tipo de envenenamiento, estuvo comprendido entre 15-34 años (DISE, 2010; DISE, 2011). El aumento del número de muertes y casos de afecciones por escolopendrismo, sugiere que esta situación podría estar en auge.

Los casos de emponzoñamiento relacionados con quilópodos, se encuentran focalizados principalmente en el Estado Falcón, una de las áreas con mayor cantidad de personas afectadas por las mordeduras de ciempiés (Cazorla *et al.*, 2012). Además, esta mordedura suele confundirse con las picaduras de Himenópteros debido a los síntomas presentados (inflamaciones y dolor), restándole importancia en su tratamiento en los ambulatorios, lo que pone en riesgo la salud de los individuos, principalmente niños y ancianos (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000; Acosta & Cazorla, 2004). Estas particularidades antes mencionadas, le ha restado importancia como problema de salud pública, lo cual se traduce a que no se generan programas de vigilancia y control, así como también planes educativos para prevención de emponzoñamiento, los cuales no deben solo involucrar a las poblaciones afectadas sino también a los médicos de las zonas rurales y urbanas para que puedan atender de forma debida los traumas asociados a los ciempiés (Acosta & Cazorla, 2004; Cazorla *et al.*, 2012).

2.6. Purificación de extractos proteicos y actividades enzimáticas asociadas al veneno de especies del Género *Scolopendra*.

Las investigaciones basadas en quilópodos han estado orientadas en la identificación de los componentes presentes en su veneno, y en la acción que este último ejerce sobre tejidos animales. La mayoría de los trabajos bioquímicos con este tipo de invertebrados han sido llevados a cabo en zonas tropicales debido a que estas presentan la mayor diversidad de estos ejemplares. Mohamed *et al.* (1983), realizaron una de las primeras caracterizaciones en el extracto del veneno de quilópodos, identificando proteínas, lípidos, lipoproteínas y enzimas en el extracto de veneno de *Scolopendra morsitans* de la India. Sus estudios estuvieron basados en el uso de electroforesis en discos de gel y cromatografía de capa fina. En la electroforesis se obtuvieron 13 bandas de proteínas: 6 con movimientos lentos hacia el ánodo (densamente teñidas, lo que indica que poseen un alto peso molecular), 7 cercanas al ánodo (con indicios de un peso proteico pequeño). Respecto a la cromatografía realizada con sílica gel, ellos identificaron la presencia de lipoproteínas y otros componentes lipídicos como fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos, esteres de colesterol y escualeno; también identificaron cuatro tipos de isoenzimas: esterasas, fosfatasas alcalinas y ácidas, y un ácido amino naftilamidasa.

A partir del año 2000, comenzaron a publicarse gran número de trabajos con los extractos de veneno de varias especies del género *Scolopendra*. González *et al.* (2000), se centraron en los aspectos bioecológicos de *Scolopendra gigantea* en y la actividad histopatológica de su veneno. A través de microscopía óptica, reportaron

daños en el tejido muscular estriado (rabdomiólisis) en ratones, por efecto de la inoculación del veneno de este ciempiés, acompañado de zonas de necrosis, hipercontracción y plegamientos de sarcolema. También se evidenció un hígado agrandado, con presencia de hepatocitos con degeneración hidrópica y vacuolación.

Gutiérrez *et al.* (2003), trabajaron con una fracción tóxica de *Scolopendra* sp., inyectada al ganglio ventral del crustáceo *Cambarellus cambarellus*. Para ello, hicieron un fraccionamiento del veneno, obteniendo que la fracción V presentó letalidad al momento de su administración. En esta fracción, y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), se observó la presencia de siete bandas de proteínas, las cuales eran capaces de modificar la permeabilidad de la membrana del ganglio (a través de los canales de sodio), produciendo la liberación masiva de los neurotransmisores GABA y glutamato.

En el año 2005, Abarca *et al.*, determinaron que un componente tóxico de 24 KDa proveniente del veneno de *Scolopendra viridis* Say, actuó sobre el sistema nervioso de un acocil, específicamente en su cordón ganglionar, provocando la liberación endógena del neurotransmisor inhibitorio GABA. Durante este mismo año, Muñoz *et al.*, aislaron y caracterizaron, en el veneno de *Scolopendra viridis*, una proteína de 50 KDa con actividad hialuronidasa. También determinaron su constantes cinéticas y se obtuvo una velocidad máxima (V_{max}) de 4.617 μg de HA/min y una constante cinética (K_M) de 90.942 μg de HA/ml.

Para el 2006, Whenjua *et al.* clonaron un péptido del veneno de *Scolopendra subspinipes mutilans* y lograron su inducción en *Escherichia coli*. Este péptido tuvo actividad antimicrobiana sobre bacterias gram negativas, gram positivas y algunos hongos. Dicha proteína heteróloga, denominada Scolopendrina I, tuvo una masa molecular de 4 KDa. En el mismo año, Yoon *et al.*, identificaron tres alcaloides de quinolina que funcionan como antioxidantes en la prevención de la aterosclerosis, principalmente sobre la proteína oxidada de baja de densidad (ox-LDL). Estos fueron aislados del cuerpo seco de *Scolopendra subspinipes*, denominándolos 3,8-dihidroxiquinolina (compuesto 1), y 2,8-dihidroxi- 3,4-dimetoxiquinolina (compuesto 2). En ambos se presentó actividad secuestradora de radicales libres, y solo en el compuesto 2 se presentó actividad quelante del metal cobre.

Luego Rates *et al.* (2007), se centraron en un análisis del veneno por cromatografía líquida de dos dimensiones, y secuencia N-terminal de proteínas de *Scolopendra viridicornis nigra* y *Scolopendra angulata*. Se observaron para *S. viridicornis nigra* pesos de proteínas entre 3 y 20,99 KDa, de un total de 62 masas moleculares. Para *S. angulata* se reportaron pesos entre 1 y 22,63 KDa, de un total de 65 masas moleculares. Además, los N-terminales de representantes de 10 familias de péptidos fueron secuenciados con éxito, y nueve de ellos fueron nuevos registros, al compararlos con la base de datos Swiss-Prot.

En el año 2008, Parilla *et al.*, elaboraron un *antiescolopéndrico* empleando inmunoglobulinas derivadas de huevos de gallina contra el veneno de *S. gigantea*. Para ello, realizaron la inyección subcutánea e intramuscular de diluciones del veneno

en gallinas, obteniéndose huevos que presentaron 8,4 mg de inmunoglobulinas Y, por yema de huevo. Las fracciones de inmunoglobulinas Y aisladas, fueron inyectadas en ratones que previamente habían sido intoxicados con el veneno de este escolopendromorfo, utilizando una dosis letal media (LD_{50}) del veneno de 0,3 mg/20 g de ratón, obteniéndose un 100% de supervivencia.

También en el 2008, Malta *et al.*, realizaron ensayos de actividad tóxica del veneno de ciempiés brasileiros de las especies *Otostigmus pradoi*, *Cryptops iheringi* y *Scolopendra viridicornis*, mediante electroforesis en gradiente de concentración (4-20%), y encontraron diferencias significativas entre los componentes de estos tres quilópodos, presentándose bandas de proteínas con un peso entre 7 y 190 KDa. Estos resultados fueron corroborados mediante Western Blot. Los ensayos de medición de actividad enzimática mediante zimografías indicaron que las proteínas presentes en estos venenos poseen actividad hialuronidasa, caseinolítica, fibrinógena y proteasa. Así mismo, la mayor actividad hemolítica la presentó *O. parodis*, aumentando progresivamente a medida que aumentaba las concentración de veneno.

González-Morales *et al.* (2009), separaron los componentes del veneno de *Scolopendra viridis* Say mediante HPLC, obteniendo 54 fracciones diferentes, en donde la fracción de 46,24 min presentó actividad fosfolipasa. Esta enzima fue purificada, se identificaron sus 25 residuos aminoácidos mediante reacción de Edman, y el peso molecular determinado fue de 13,72 KDa. Esto presentó, coincidencia con una fosfolipasa obtenida sintéticamente que proviene de veneno de

ofidios, lo que indicó que hubo una evolución convergente de esta enzima en dicho quilópodo. Dicha enzima fue denominada Scol/Pla.

Para el año 2010, Peng *et al.*, caracterizaron funcional y estructuralmente dos péptidos antimicrobianos del veneno de *Scolopendra subspinipes mutilans* denominados Scolopin 1 y 2. Los mismos presentaron actividad microbiana contra bacterias gram-negativas y gram-positivas, y en hongos. Esos péptidos también presentaron actividad hemolítica moderada en glóbulos rojos de humanos y conejos. Yang *et al.* (2012), identificaron 26 neurotoxinas del veneno de *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch. Las mismas fueron analizadas con peptidómica combinada con análisis de transcriptoma, lo que permitió dilucidar que estas neurotoxinas presentan cada una 2-4 puentes disulfuros intramoleculares, lo que las diferencia de las encontradas en los animales 5S (arañas, escorpiones, caracoles marinos cono, anémonas de mar y serpientes). Estas neurotoxinas presentaron capacidad insecticida al cambiar la modulación de canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje. Estos ensayos fueron realizados en *Periplaneta americana*, *Musca domestica* y larva de *Tenebrio molitor*.

Kong *et al.* (2013), purificaron y caracterizaron un nuevo péptido antitrombótico del veneno de *Scolopendra subspinipes mutilans*. El peso obtenido mediante espectrometría de masas ionizante por electrospray (ESI-MS, por sus siglas en inglés) fue de 0,34 KDa. Su estructura primaria está conformada por Serina-Glutamina-Leucina (determinada por degradación de Edman), y presenta prolongación parcial del tiempo de tromboplastina activada (TTPa) e inhibición de agregación plaquetaria,

lo cual lo hace ideal para el tratamiento de afecciones cardiovasculares. Por último, Yang *et al.*, (2013), hallaron un inhibidor selectivo para el canal de sodio dependiente de voltaje $\text{Na}_v1.7$ (denominado μ - SLPTX-Ssm6a), que proviene del veneno de *S. subpinipes mutilans*, y mostró una eficacia analgésica superior a la morfina en modelos de dolor en roedores. Ello indicó que esa molécula podría funcionar para la fabricación de nuevos analgésicos enfocados a minimizar el dolor en ciertas patologías humanas.

CAPÍTULO III.

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Zonas de colecta de ejemplares de *Scolopendra gigantea*

Se colectaron un total de 18 ejemplares de *S. gigantea* en una zona xerófila adyacente al Parque Zoológico de Paraguaná Gustavo Rivera, en el sector Cardón, Punta Cardón, Municipio Curirubana, Estado Falcón (11°39'05.39"N, 70°13'18.19"O), según lo reportado por González *et al.*, (2000) y Parrilla-Álvarez *et al.*, (2008), donde indican que en esa zona de Falcón se pueden encontrar tales invertebrados. La forma de colecta fue mediante búsqueda manual revisando debajo de las cortezas de troncos, piedras, agujeros y hojarasca. Para ello, se tomaron previsiones necesarias para el resguardo de la integridad del espécimen (uso de pinzas modificadas en su punta con goma espuma para evitar causarle algún daño al momento de la captura), y de las personas involucradas en su captura (uso de guantes de carnaza y de botas plásticas hasta las rodillas).

Los ciempiés fueron colectados en envases plásticos de 4 L, previamente agujereados para permitir la entrada de oxígeno, y después los ejemplares fueron cambiados a sus respectivos terrarios. Así mismo, en los diferentes sitios de colecta se midieron parámetros ambientales (temperatura, humedad relativa y radiación), que se utilizaron para idear las condiciones de cautiverio óptimas para estos ciempiés. Los equipos utilizados para la medición de estos parámetros climáticos fueron: termohidrómetro portátil Fisher Scientific y refractómetro digital solar light PMA 2100.

3.2. Identificación taxonómica de los ejemplares de *S. gigantea*

Utilizando el trabajo realizado por Shelley & Kiser (2000), donde describen los caracteres morfológicos para *Scolopendra gigantea*, se identificaron los ciempiés colectados en el Municipio Curirubana del Estado Falcón, concordando con lo descrito por dichos investigadores. Así mismo, los especímenes fueron comparados con ejemplares contenidos en la colección entomológica del Museo del Instituto de Zoología Agrícola (MIZA) de la Universidad Central de Venezuela, Núcleo Maracay, corroborando nuevamente que los invertebrados colectados son de la especie *S. gigantea*.

3.3. Protocolo de cría de *Scolopendra gigantea*

Para sentar las bases del protocolo de cría en cautiverio para el quilópodo *S. gigantea*, se partió de un ensayo preliminar con un individuo de esta especie colectado en el sector El Ereigüe del Municipio San Joaquín, Estado Carabobo, Venezuela (10°17'38.93"N, 67°47'49.45"O) (**Figura A-1**). Dicho ejemplar se conservó dentro de un contenedor plástico de 1 m de altura para que no lograra escapar del mismo, y que contuviera superficie lisa para que no pudiese subir por el recipiente. El ciempiés se mantuvo con una fotoperiodicidad prácticamente nula, para no afectar su hábito nocturno.

Se le colocó un sustrato compuesto por tierra para helechos, hojas de árboles (como hojas de mango), y piedras pequeñas, el cual fue cambiado cada 15 días. El sustrato retuvo mas humedad colocándole solo tierra para helechos, ya que la presencia de

hojas evaporizaba más rápido el agua. Además, el uso de piedras en el sustrato, lastimaba al ciempiés durante la manipulación y/o transporte del espécimen al Laboratorio de Docencia I, donde se le extraía el veneno.

La humedad relativa dentro del recipiente que funcionó como terrario, se mantuvo gracias a la aspersión de agua cada dos días, de manera de que se mantuviese siempre húmedo el sustrato y que el ciempiés pudiese captar con sus antenas el agua que ingiere. La temperatura se mantuvo entre 25-30°C en el Cepario del Departamento de Biología, pero este parámetro no fue controlado, así que su variabilidad dependía de la temperatura ambiente que se registraba durante todo el día.

La alimentación estuvo basada en ratones NMRI no consanguíneos adultos, ofrecidos mensualmente. Se observó que el ejemplar de *S. gigantea*, al principio de la etapa en cautiverio, capturaba fácilmente al ratón. Pero a medida que pasó el tiempo, la eficiencia de captura fue disminuyendo, debido a la rapidez de los roedores, dificultando su alimentación. También se probó el uso de cucarachas como alimento, pero el ciempiés, a pesar de haber atacado a la presa por mordedura, no la ingirió. Todo esto produjo la pérdida de talla en el espécimen, evidenciable por la retracción de sus segmentos corporales y por la pérdida de agresividad, lo que conllevó a su muerte luego de un tiempo total en cautiverio de 8 meses.

El resultado de este ensayo preliminar, se utilizó para estandarizar el protocolo de cría en cautiverio para *S. gigantea*. Las condiciones de cautiverio modificadas se presentan a continuación:

3.3.1. Terrario

Se utilizaron cajas plásticas multiusos de 17,50 L, de 11,50 cm de altura y 32,50 cm de ancho y longitud (base cuadrada). Mediante el uso de un taladro Dewalt 3/8 modelo Dwd014 y una mecha de taladro 1/16, se abrieron agujeros de 5 mm de diámetro en sus cuatro lados, 2 cm por debajo del borde superior del recipiente (**Figura A-2**). Esto garantizó que la entrada de aire fuera continua a través de los agujeros, pero con un tamaño suficientemente pequeño para no permitir que los animales en estudio se salgan por los mismos.

La composición del sustrato en los terrarios fue de un 100% de tierra para helechos o concha de coco (**Figura A-3**). Este sustrato sirvió para retener los fluidos corporales de estos quilópodos, así como también retener la humedad dentro del terrario. No se usó hojarasca porque el alto porcentaje de humedad en los terrarios podría favorecer la aparición de hongos que comprometerían la salud de los animales en estudio. Este sustrato fue cambiado cada 15 días para minimizar la posible contaminación del mismo por patógenos u hongos.

3.3.2. Condiciones de temperatura, humedad y luz.

La temperatura de los terrarios estuvo entre 26-30°C, siendo relativamente estable ya que los ejemplares de *S. gigantea* estaban guardados en un depósito aislado del Laboratorio de Docencia IX, donde los cambios de temperatura no eran muy variables. Se mantuvo una humedad relativa alrededor de 80% en el sustrato del terrario, mediante aspersión de agua cada dos días. Esto se realizó en horas de la tarde

para evitar la pérdida de agua durante el horario de actividad natural de los ejemplares (noche). El monitoreo de la temperatura y humedad relativa dentro de los terrarios fueron medidos con un termohigrómetro portátil Fisher Scientific.

Por último, la fotoperiodicidad también fue un parámetro aplicado durante el tiempo de cautiverio de los ciempiés. La misma fue leve o ausente, tomando en cuenta el hábito nocturno que poseen tales invertebrados. Para ello, los niveles de luz sólo aumentaban levemente cuando se manipulaban los ejemplares para su alimentación, revisión diaria y extracción de veneno (**Figura A-4**).

3.3.3. Alimentación

Se usaron camadas de ratones NMRI no consanguíneos de 10 días de nacidos o con pesos inferiores a 10 g, ya que ratones de mayor tamaño dificultaban su captura por ser más activos. Todos los ejemplares fueron alimentados cada 15 días, procurando darle las presas en horas de la tarde, ya que correspondían al inicio de su actividad nocturna (**Figura A-5 y A-6**).

3.3.4. Lugar de mantenimiento de los especímenes

Los ejemplares fueron mantenidos en cautiverio en el Laboratorio de Docencia IX (Ecología Terrestre) del Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT), Universidad de Carabobo.

3.3.5. Destino de los ejemplares al finalizar la investigación

Del total de los ciempiés colectados en cada una de las áreas antes mencionadas, el 25% de los mismos serán reintroducidos a sus ambientes naturales. Del otro 75%, un 25% será donado al Museo de Zoología del Departamento de Biología, FACYT-UC, así como también al Laboratorio II de Docencia de la misma dependencia., mientras que el restante 50% será mantenido en cautiverio para estandarizar aun más el protocolo de cría.

3.4. Extracción del veneno

La extracción de veneno se realizó según el protocolo descrito por Malta *et al.* (2008), cada 15 días mediante electroestimulación directa sobre las forcíparas, usando un estimulador eléctrico Phipps & Bird modelo 7092-611. Este proceso se inicio induciendo estrés a los ciempiés (**Figura A-7**) para que cargaran el veneno en sus conductos forcíparos, procediendo luego a bajar su actividad locomotora a través de frío (**Figura A-8**) y por último, se le aplicó un voltaje entre 80-100 mV durante 30 segundos en la zona forcipular previamente humedecida con agua (**Figura A-9**). El veneno soluble que sale de las uñas venenosas fue tomado con una micropipeta automática de 20-200 μ L y se depositó en tubos de criopreservación de 2 mL. El volumen total de veneno se mezcló para formar un pool, diluido en ácido trifluoracético (TFA) 0.1% v/v ó Tampón Fosfato Salino (PBS) 1X pH 7.4. La escogencia del diluyente estuvo sujeta al tipo de ensayo en el que se iba a emplear el veneno. Por ejemplo, para el perfil proteico y zimografías se uso veneno diluido en

TFA (en relación 1:100), mientras que para las actividades hemolíticas y coagulasa se usó veneno diluido en PBS 1X a diferentes concentraciones. Una vez diluido el veneno, fue preservado a 4°C.

3.5. Determinación de proteínas totales

Se utilizó el método descrito por Bradford (1976), para determinar la concentración de proteínas totales. Para ello, se mezclaron entre 5-7 µL de la solución de veneno con 1000 µL del reactivo de Bradford. Se agitó y se esperó la aparición de la coloración azul, producto de la interacción iónica del colorante Coomassie Blue G-250 con las proteínas presentes en una solución ácida. Esta reacción fue medida en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV de THERMO a una longitud de onda de 595 nm. Así mismo, se usó una curva de calibración de Suero Albúmina Bovino (BSA, por sus siglas en inglés) 1 mg/ml, para detectar microgramos (µg) de proteínas (Yapp *et al.*, 2001).

3.6. Perfil electroforético del veneno

Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970), con las siguientes modificaciones: geles continuos de 12% de poliacrilamida-bisacrilamida, y geles en gradiente discontinuo de 8-16.5% y 8-14% de poliacrilamida-bisacrilamida. Estos se utilizaron para generar los perfiles proteicos del veneno de *S. gigantea*, en condiciones nativas y en condiciones desnaturalizantes. Para la realización de los geles electroforéticos en gradiente discontinuo, se usó la

metodología empleada por Moreno (2010). La separación de las tres secciones de acrilamida-bisacrilamida usadas (8-12-16.5% y 8-12-14%), se lograron mediante diferencias de densidades entre estas soluciones de acrilamida, usando glicerol para este fin.

La concentración de proteínas colocada en los carriles de los geles de electroforesis estuvo entre 10 y 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El marcador de peso molecular usado como referencia, fue uno estandarizado y preteñido de BioRad, con un rango de peso molecular entre 10-250 KDa. La corrida electroforética fue realizada en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAM 3 Electrophoresis Cell de Bio-Rad, a 100 V a bajas temperaturas ($\approx 4^\circ\text{C}$) durante aproximadamente 2 horas. La tinción de las bandas de proteínas se hizo mediante una solución de Coomassie Blue R-250 de 0.1 % p/v (Malta *et al.*, 2008). El revelado de los perfiles proteicos se obtuvo con un transiluminador Chemidoc XRS system 170-8170 de Bio-Rad, y se uso el programa Piximetre versión 5.7 para la medición de la migración de las bandas de proteínas y la correspondiente asignación de los pesos moleculares aproximados.

3.7. Detección de actividad proteasa mediante zimografía

Para la determinación de la actividad proteasa, se realizaron geles al 12% de acrilamida-bisacrilamida copolimerizado con gelatina comercial al 0.1% p/v, esto último como sustrato para la actividad enzimática. La corrida electroforética se realizó en condiciones no reductoras. La concentración de proteínas de las muestras colocadas en los pocillos de los geles de acrilamida fue de 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Como control

negativo se usó la solución de TFA al 0.1% v/v, y como control positivo se usó la enzima tripsina a una concentración de 0.05 µg/µL. Las condiciones de corrida electroforética fueron las mismas usadas el apartado 3.6.

Luego de la corrida electroforética, los geles se sumergieron en una Solución de Lavado (Tritón X-100 2.5% v/v en agua destilada) para eliminar el SDS. Después se incubó por 18 h en un Buffer de Replegamiento (tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl₂ 50 mM y NaCl 0.2 M) que dio las condiciones ideales para la actividad enzimática (Hernández, 2011). Las actividades proteasas se evidenciaron por la aparición de zonas blancas o de degradación del sustrato, que indican actividad enzimática en los zimogramas. Así mismo, para poder determinar a que banda de proteína pertenecía esa zona de actividad enzimática, se comparó con el perfil proteico realizado en el apartado 3.6, de 12% de acrilamida-bisacrilamida. Luego de obtener todas las actividades proteolíticas, se procedió a realizar nuevamente los zimogramas, pero agregando inhibidores enzimáticos específicos al Buffer de Replegamiento, para identificar la naturaleza enzimática de las proteasas presentes en el veneno. Para ello, se usó Etilen Diamino Tetra Acético (EDTA) 0.1 M como inhibidor de metaloproteasas, y Fenil-Metil-Sulfonil Fluoruro (PMSF) 10 mM como inhibidor de serin-proteasas (Hernández, 2011).

3.8. Estudio de la actividad enzimática del veneno

3.8.1. Actividad hemolítica

Se empleó una modificación del protocolo descrito por Malta *et al* (2008), en la cual se recolectó sangre humana de tipo ORh⁺ (por punción en la vena del individuo), a la cual se le añadió como anticoagulante EDTA en relación 1mg/mL de sangre. Se utilizó una concentración de sangre con anticoagulante de 1:250 de mezcla total, empleando volúmenes del extracto del veneno de 2, 4, 6 y 8 µL, y completando el volumen con Solución Salina Fisiológica (SSF). Se usó como control positivo la muestra de sangre con anticoagulante en agua destilada (1:250), lo que representó el 100% de hemólisis. Como control negativo se empleó la muestra de sangre con anticoagulante en SSF (1:250), lo que representó el 0% de hemólisis. Una vez añadidas las soluciones correspondientes a cada muestra de sangre, se mezclaron suavemente y se dejaron por media hora. A partir de este punto, los siguientes pasos se realizaron a dos tiempos: 0 y 2 horas. Una vez culminado el tiempo correspondiente, se centrifugaron las muestras a 2500 rpm por 5 min, y se midió absorbancia a 595 nm. Cada concentración y control positivo o negativo fue realizado por triplicado para cada uno de los tiempos evaluados.

Se determinó el porcentaje de hemólisis mediante estimación, empleando como 100% de hemólisis el promedio de absorbancia obtenido para el control positivo. Se confirmó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk, y la homogeneidad de varianza mediante contraste de Levene. Las diferencias entre los porcentajes de hemólisis, según la cantidad de veneno y el tiempo, se evaluaron

mediante el programa SPSS versión 20.0., realizando una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para dos factores. Los resultados de las pruebas de ANOVA fueron empleados para realizar comparaciones múltiples con la Prueba de Tukey. En todas las pruebas los valores de probabilidad (p) menores a 0.05 fueron considerados significativos.

3.8.2. Actividad coagulasa

Tomando nuevamente el protocolo usado por Malta *et al.* (2008), se recolectó sangre humana de tipo ORh⁺, diluyéndola en citrato de sodio 0.15 M en relación 9:1, para posteriormente centrifugarla a 2000 rpm por 10 min en una centrífuga DSC-200T de DIGISYSTEM. Se separó la fracción sérica, y se colocaron 50 µL en tubos de vidrio. Se adicionó en cada tubo un volumen específico de veneno (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 µL). Para los controles del ensayo se adicionaron en unos de los tubos con suero (sin veneno) 50 µL de trombina (control positivo para verificar la hidrólisis de fibrinógeno), y en otros se adicionaron 2 µL de SSF (control negativo). Los tubos se sumergieron parcialmente en baño de maría a 37°C, y se tomó el tiempo hasta observar la aparición de coágulos. Este ensayo se realizó por triplicado para cada volumen de veneno y controles.

3.9. Determinación cualitativa de carbohidratos presentes en el veneno de *S. gigantea*

Se realizaron diferentes pruebas bioquímicas para identificar la presencia de carbohidratos y las conformaciones que presentan, en el veneno de *S. gigantea*. Dichas pruebas se mencionan a continuación:

3.9.1. Determinación de presencia de carbohidratos

Se usó la reacción de Molish con las siguientes modificaciones: se mezcló veneno y reactivo de Molish en relación 2:1, adicionándose luego una parte de ácido clorhídrico (HCl) concentrado. La aparición de una interfase de coloración púrpura es producto de la formación de un compuesto furfural o 5 hidroximetilfurfural (Sanz, 1967; Ode *et al.*, 2010). Como control positivo se usó sacarosa 1% p/v, y como controles negativos se utilizaron urea 1% p/v y TFA 0.1% v/v (**Figura A-11**).

3.9.2. Determinación de monosacáridos y disacáridos reductores

Basándose en la Reacción de Barfoed, se mezcló el reactivo con la muestra de veneno en relación 1:1, y se incubó en baño de maría a 100°C por 30 min. Si la aparición de un precipitado de óxido cuproso (Cu_2O) ocurre entre 2-5 min, se debe a la presencia de monosacáridos reductores, y si ocurre entre 7-12 min se debe a la presencia de disacáridos reductores (Sanz, 1967; Ode *et al.*, 2010). Como controles positivos para monosacáridos reductores se utilizó xilosa 1% p/v, mientras que para disacáridos

reductores se utilizó maltosa 1% p/v. Los controles negativos fueron úrea 1% p/v y TFA 0.1% v/v.

3.9.3. Determinación de aldosas y cetosas

Mediante el uso de la Reacción de Seliwanoff, se mezcló veneno con el reactivo de Seliwanoff en relación 1:2, y luego se incubó el tubo en un baño de agua hirviendo (100 °C) para observar el tiempo de aparición de una coloración. La aparición de una coloración rojiza en 2 min evidencia la presencia de cetosas, la aparición de una coloración verde-azulado en más de 2 min evidencia la presencia de aldosas (Sanz, 1967; Dutra *et al.*, 2008). El control positivo utilizado para cetosas fue sacarosa 1% p/v, y para aldosas fue xilosa 1% p/v. Nuevamente se usaron úrea 1% p/v y TFA 0.1% v/v como controles negativos (**Figura A-12**).

3.9.4. Determinación de pentosas y hexosas

Mediante la Reacción de Bial, se mezcló reactivo de Bial con veneno en relación 2:1, y luego se sumergió el tubo en baño de agua hirviendo. La aparición de una coloración azul evidencia la presencia de pentosas, y la aparición de una coloración amarillo-marrón evidencia la presencia de hexosas (Sanz, 1967; Ode *et al.*, 2010). El control positivo utilizado para pentosas fue xilosa 1% p/v, mientras que para hexosas fue sacarosa 1% p/v. Úrea 1% p/v y TFA 0.1% v/v se emplearon como controles negativos.

3.9.5. Determinación de polisacáridos

Usando la Reacción de Lugol, se mezcló veneno con reactivo de Lugol en relación 2:1. La aparición de una coloración violeta evidencia la presencia de polisacáridos. Como control positivo se utilizó almidón 1% p/v y como controles negativos úrea 1% p/v y TFA 0.1% v/v (Ode *et al.*, 2010).

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS

4.1. Proteínas totales en el extracto de veneno de *S. gigantea*

Para realizar los diferentes ensayos bioquímicos y celulares, en primer lugar se determinó la concentración de proteínas mediante la reacción de Bradford. Para ello, se usó como curva patrón Suero Albumina Bovino (BSA) a una concentración de 1 mg/ml (**Figura A-11**). Con la ecuación de la recta, y verificando que la curva presente un elevado ajuste al modelo lineal para una eficiente estimación de proteínas (coeficiente de correlación lineal, $R^2 = 0.9884$), se determinó la concentración de proteínas diluidas en TFA o PBS. Se obtuvo un promedio de concentración de proteínas de 243,56 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en las diluciones con TFA o PBS, lo cual indica una concentración muy elevada, considerando que la dilución del extracto de veneno con el diluyente fue 1:100. En base a esto, el promedio de concentración de proteínas en el extracto crudo de veneno fue de 2,4356 mg/ μL . Perfil electroforético de *Scolopendra gigantea*.

Utilizando 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de concentración de proteínas para las muestras de veneno diluido en TFA, se procedió a la determinación del perfil proteico del veneno de *S. gigantea*. El primer perfil electroforético obtenido fue al 12% de acrilamida-bisacrilamida, determinando los pesos moleculares de las bandas proteicas a partir de una curva de calibración obtenida con el Marcador de Peso Molecular utilizado como patrón (**Figura A-12**). Como se observa en la **Figura A-12**, el R^2 estimado fue de

0.9887, lo cual demuestra un elevado ajuste de los datos al modelo lineal obtenido para el marcador de peso molecular. Esto es ideal para la estimación de los pesos moleculares de las bandas del perfil electroforético.

El perfil proteico al 12% de acrilamida-bisacrilamida se presenta en la **Figura 1**, donde se observan un total de 22 bandas de proteínas en forma nativa en el carril 2 (C2) y 17 bandas proteicas en formas desnaturizada en el carril 3 (C3), con pesos moleculares entre ≥ 250 y 19 KDa. Las bandas contenidas entre la sección de 75-20 KDa, fueron las únicas a las que se les determinó el peso molecular mediante el marcador de peso molecular (MPM), ya que las bandas que se presentaban por encima 75 KDa podrían estar sujetas a subestimación o sobreestimación. De igual forma, es importante destacar que se presentan bandas proteicas por encima de 75 KDa, un total de 5 bandas para C2, y 3 bandas para C3. El carril 2 presenta cierta similitud con algunas bandas de proteínas del carril 3, que no fueron afectadas por el efecto desnaturizante del β -mercaptoetanol ni la temperatura. Estas bandas son las de 51, 40, 38, 26, 22 y 19 KDa. También se puede observar como ciertas bandas de proteínas que aparecen en C2 y desaparecen en C3, posiblemente por rompimiento de puentes disulfuros, dan paso a otras bandas proteicas en C3. Estas nuevas bandas de proteínas se ubican en un rango entre 58 y 19 KDa.

En el frente de corrida de ambos carriles (C2 y C3), se puede observar una mancha oscura, producto de proteínas de bajo peso molecular, por lo cual se procedió a realizar perfiles en gradiente discontinuo para aumentar la resolución de esa zona de

proteínas, así de cómo también poder estimar los pesos moleculares de las bandas presentes por encima de 75 KDa.

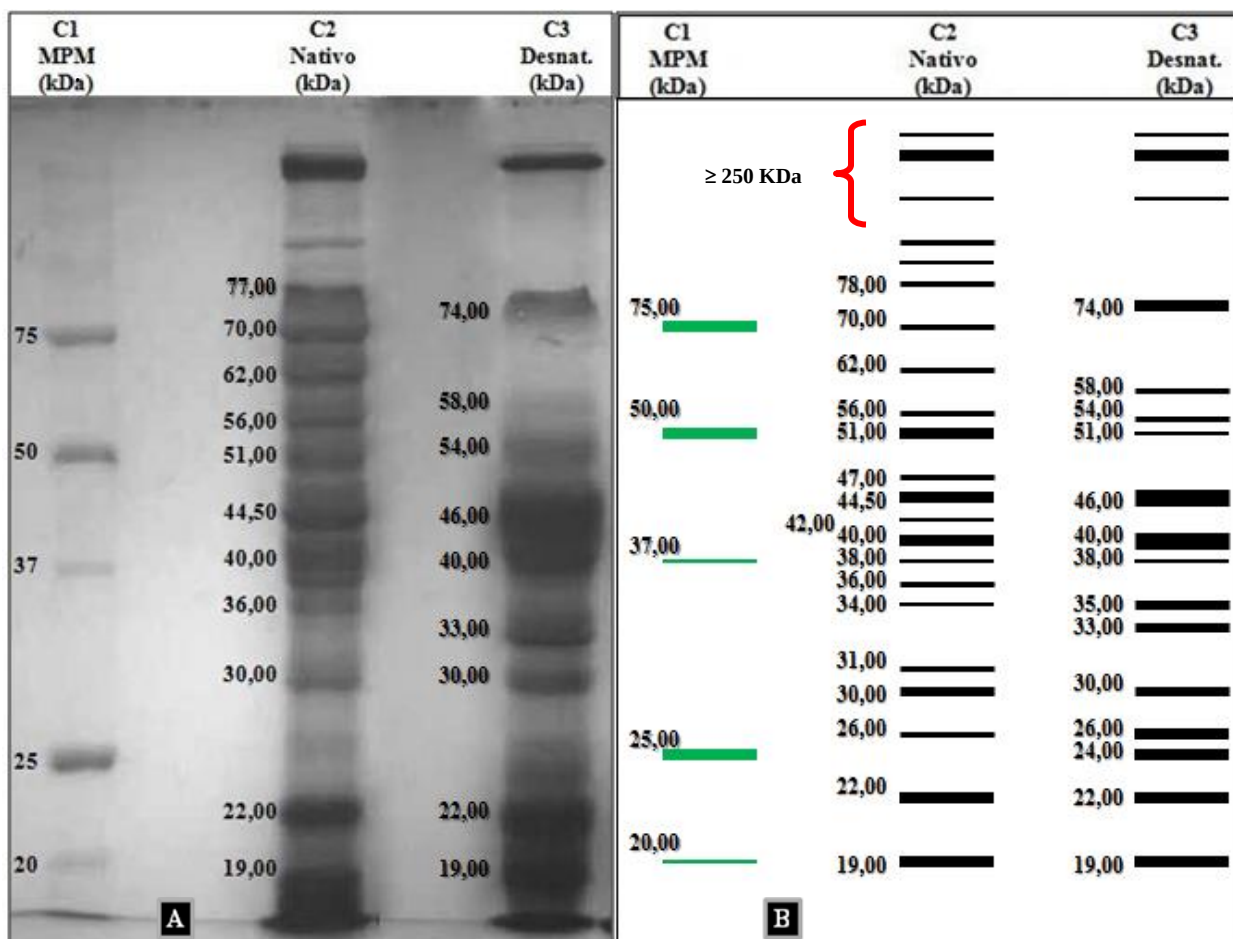


Figura 1. Perfil proteico del veneno de *S. gigantea* al 12% de acrilamida-bisacrilamida, en condiciones nativas y desnaturalizantes. A) Perfil proteico obtenido mediante fotografía del gel de electroforesis. B) Esquema del perfil proteico diseñado para visualizar mejor las bandas de proteínas presentes en la fotografía. C1 (carril 1): Marcador de Peso Molecular (MPM); C2 (carril 2): muestra de veneno en condiciones nativas; C3 (carril 3): muestra de veneno en condiciones desnaturalizantes.

En la **Figura A-13**, se presenta la curva de calibración para el gel en gradiente discontinuo de 8-16.5% acrilamida-bisacrilamida. El valor del coeficiente de correlación lineal ($R^2 = 0,9842$), muy cercano a 1, indica que los datos se ajustan en

98,42% al modelo lineal. Por tanto, el ajuste obtenido con el marcador de peso molecular fue ideal para determinar las bandas de proteínas presentes en dicho perfil.

El perfil proteico en gradiente discontinuo de 8-16.5% de acrilamida-bisacrilamida obtenido de las muestras del veneno de *S. gigantea*, se muestra en la **Figura 2**. En este perfil se presentó un total de 25 bandas de proteínas en el carril 2 (C2) de la muestra en condiciones nativas, mientras que para la muestra desnaturalizada en el carril 3 (C3), hubo un total de 19 bandas, desde ≥ 250 -21 KDa. Se calculó los pesos moleculares solo a las bandas que se visualizaron entre 100 y 25 KDa. Para C2, tales bandas van desde 90 hasta 21 KDa, y para C3 hay bandas desde 78,50 hasta 21 KDa. Al igual que el perfil proteico de 12% acrilamida-bisacrilamida, se presentan proteínas de alto peso molecular por encima de 100 KDa. En C2 se presentan un total de 5 bandas y 3 bandas para C3.

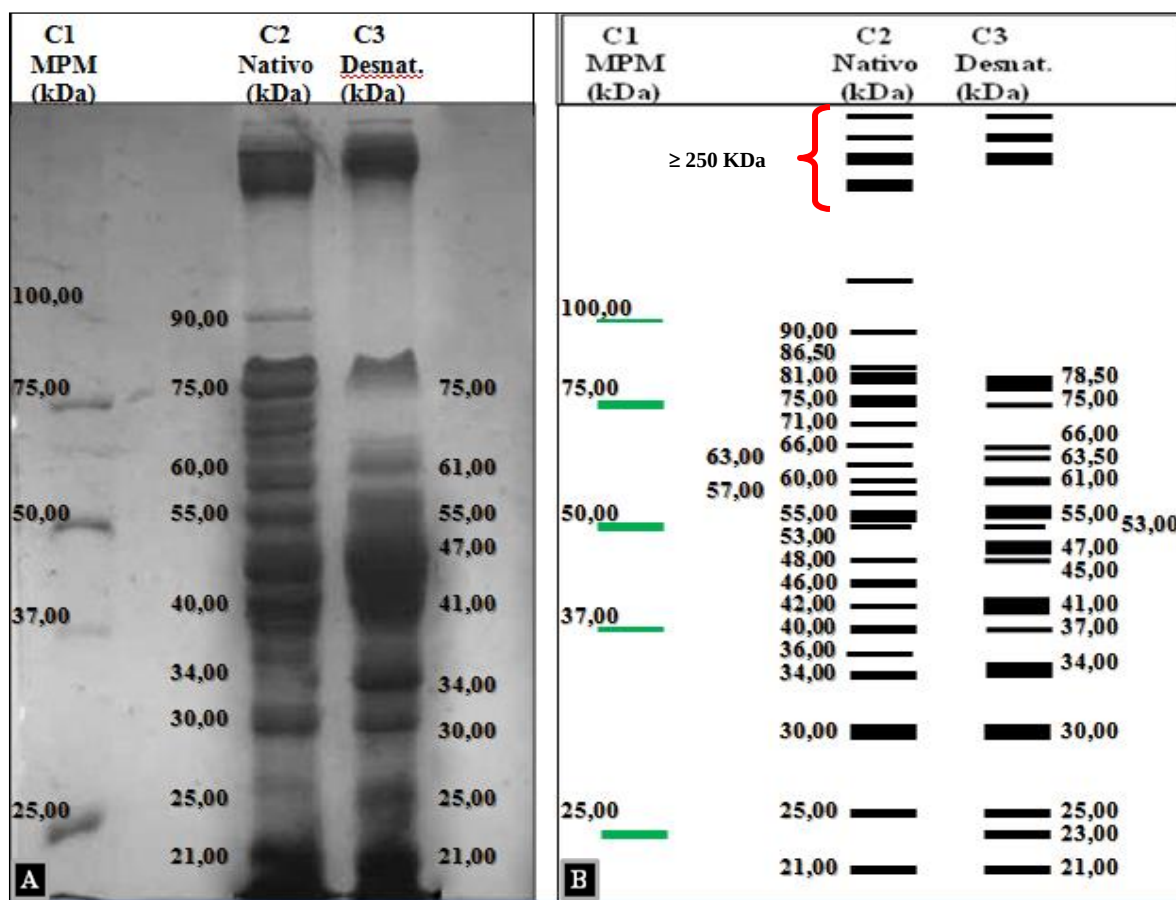


Figura 2. Perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-16.5% acrilamida-bisacrilamida del veneno de *S. gigantea* en condiciones nativas y desnaturalizantes. A) Perfil proteico obtenido mediante fotografía del gel de electroforesis. B) Esquema del perfil proteico diseñado para visualizar mejor las bandas de proteínas presentes en la fotografía. C1 (carril 1): Marcador de Peso Molecular (MPM); C2 (carril 2): muestra de veneno en condiciones nativas;. C3 (carril 3): muestra de veneno en condiciones desnaturalizantes.

Asi mismo, en la **Figura 2**, se puede apreciar como el gel en gradiente discontinuo mejoró la resolucion de las bandas de proteínas presentes en el veneno, debido a que aparecieron más bandas entre las secciones de 75-50 KDa. Para la sección de 75-50 KDa se contabilizó un total de 8 bandas, mientras que para esa misma sección

en el perfil proteico al 12% de acrilamida-bisacrilamida, solo se visualizaron 4 bandas. Comparándolo con la sección de 37-50 KDa del gel de 12% acrilamida-bisacrilamida, que tuvo 5 bandas, para este nuevo gel se obtienen solo 4 bandas con nuevos pesos moleculares, sumándose alguna banda a la sección de 75-50 KDa producto del mejoramiento de la resolución del gel. Cabe destacar que, debido a la acción desnaturalizante, se observó nuevamente la pérdida de bandas de proteínas en C3, obteniéndose zonas de bandas de proteínas que representan un apilamiento de partes proteicas, y que se ubican entre 75 y 21 KDa. Estas zonas son las bandas de 75, 55, 47, 41 y 21 KDa. También se presentaron bandas comunes entre C2 y C3 de 75, 66, 55, 34, 30, 25 y 21 KDa. Debido a la presencia del marcador molecular para 100 KDa, se mejoró el calculo del peso molecular de algunas bandas por encima de 75 KDa. Este es el caso de las bandas de 81, 86.50 y 90 KDa para el carril 2 de la muestra nativa; mientras que para el carril 3 sólo se obtuvo una banda de 78.50 KDa.

También es importante resaltar, que las zonas donde se encuentran la mayoría de las bandas de proteínas entre los perfiles de 12% y 8-16.5% acrilamida-bisacrilamida, es la zona comprendida entre 37-75 KDa, conteniendo 50% o mas del total de las bandas de proteínas obtenidas en ambos geles. Además, se distinguen dos zonas comprendidas por proteínas de alto peso molecular por encima de 100 KDa, y otra sección de bandas por debajo de 37 y 20 KDa. Con respecto a la zona comprendida por el marcador de peso molecular de 25 KDa, se puede apreciar sobrestimación de ciertas bandas por encima y por debajo de este marcador. Esto ocurrió debido a que esa zona pertenece a la sección de 16.5% acrilamida-bisacrilamida, y por poseer

poros mas pequeños, no permitió una buena estimación del peso molecular de tales bandas. Por ello, se realizó un último gel para mejorar y corregir esas incongruencias.

Para el perfil proteico en gradiente discontinuo de 8-14% acrilamida-bisacrilamida, también se usó una curva de calibración obtenida mediante el marcador de peso molecular (**Figura A-14**), cuyo ajuste al modelo lineal también fue elevado ($R^2 = 0.971$), lo cual permitió estimar con alta confiabilidad el peso de cada una de las bandas de proteínas presentes en este gel de electroforesis.

En la **Figura 3** se presenta el perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-14% acrilamida-bisacralimida. Se obtuvo un total de 28 bandas proteicas en condiciones nativas en el carril 2 (C2) y 22 bandas en condiciones desnaturalizantes en el carril 3 (C3). Debido a que en este perfil apareció el marcador de peso molecular practicamente completo, se mejoró más aun la estimación de los pesos moleculares de las bandas de proteinas contenidas en el veneno de *S. gigantea*.

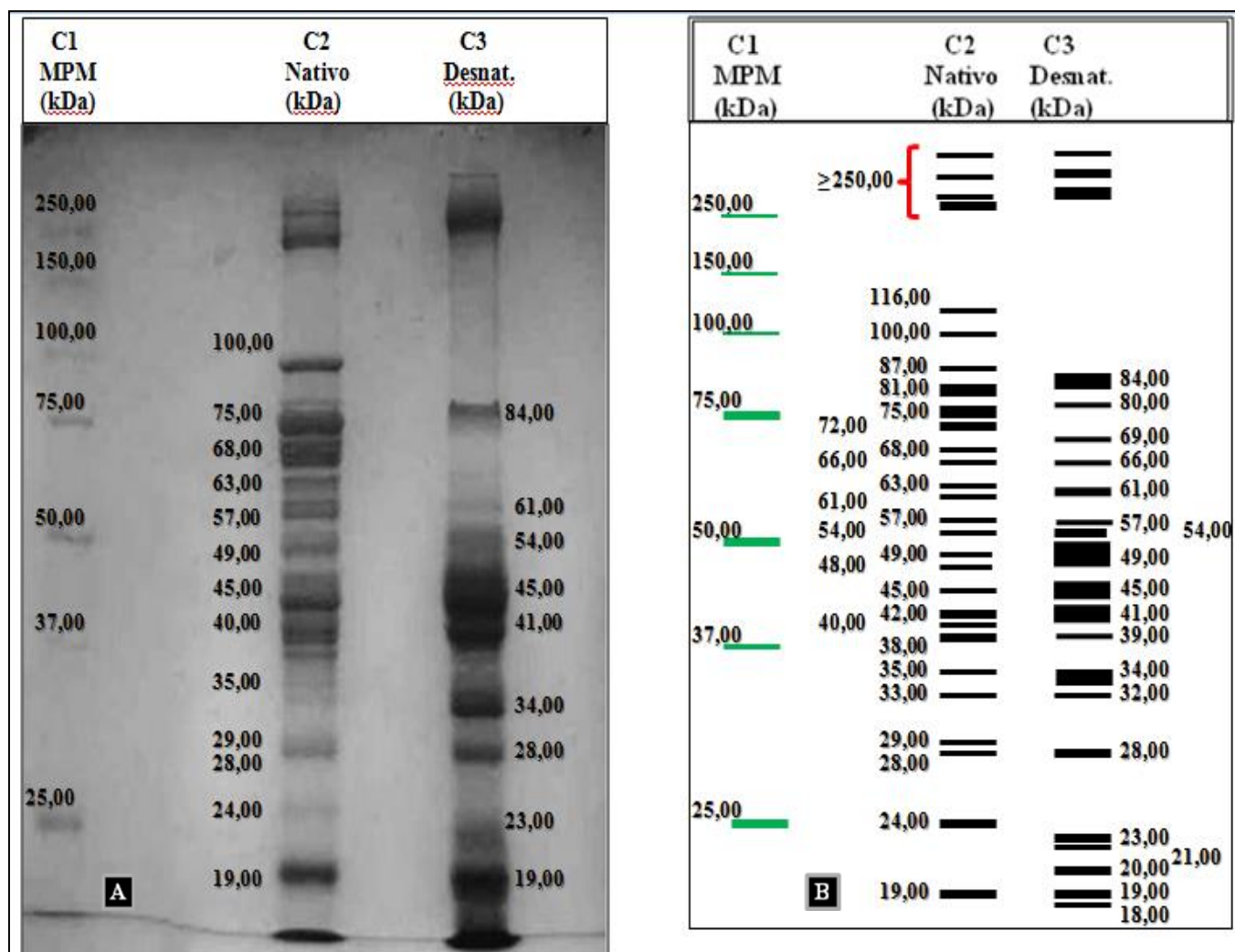


Figura 3. Perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-14% de acrilamida-bisacrilamida del veneno de *S. gigantea* en condiciones nativas y desnaturalizantes. A) Perfil proteico obtenido mediante fotografía del gel de electroforesis. B) Esquema del perfil proteico diseñado para visualizar mejor las bandas de proteínas presentes en la fotografía. C1 (carril 1): Marcador de Peso Molecular (MPM); C2 (carril 2): muestra de veneno en condiciones nativas. C3 (carril 3): muestra de veneno en condiciones desnaturalizantes.

Nuevamente se presentan la mayoría de las bandas de proteínas en la sección del gel que va de 75 a 37 KDa (**Figura 3**). En la sección de 37-50 KDa se presentan 2 nuevas

bandas de proteínas, para un total 7, en comparación con las 5 bandas obtenidas en el perfil a 12% de acrilamida-bisacrilamida, y con las 4 bandas en el perfil de 8-16.5% acrilamida-bisacrilamida. Con la sección de 75-50 KDa se presentaron las mismas 8 bandas de proteínas que en el perfil de 8-16.5% de acrilamida-bisacrilamida, pero con pesos moleculares diferentes, solo manteniéndose en esa sección las bandas de 75, 66 y 63 KDa. Entre los dos carriles (C3 y C4), se mantuvieron las siguientes bandas proteicas: 66, 61, 57, 49, 45, 28 y 19 KDa. Al igual que los perfiles anteriores, desaparecieron bandas en el carril 3 correspondiente a las muestras desnaturalizadas, observándose zonas de apilamiento de proteínas en las bandas de 84, 49, 45, 41 y 34 KDa.

También se puede apreciar en la **Figura 3**, como una banda por encima de 100 KDa modificó su peso molecular, debido a la aparición en el marcador de peso molecular de la banda patrón de 150 KDa. Dicha banda obtuvo un peso de 116 KDa. Así mismo, se corrobora que las bandas de alto peso molecular están por encima de los 250 KDa, siendo un total de 4 bandas para C2 y 3 bandas para C3. En cuanto a la región cercana a la banda patrón de 25 KDa del marcador de peso molecular, permitió corregir los pesos moleculares de las bandas adyacentes. De manera que, la banda de 30 KDa (presente en los perfiles proteicos de 12% y 8-16.5% de acrilamida-bisacrilamida), se dividió en dos bandas de 29 y 28 KDa. Lo mismo ocurrió para la banda de 25 KDa en el gel de 8-16.5% acrilamida-bisacrilada, a la que ahora se le estimó un peso de 24 KDa. También se corrige la banda de 21 KDa por una de 19 KDa, que también apareció en el perfil proteico de 12% de acrilamida-bisacrilamida.

Lo anteriormente expuesto, evidencia como muchas de las bandas de proteínas que se presentaban como una sola en los perfiles proteicos anteriores, ahora se presentaron como dos bandas diferentes. Tal es el caso de la banda de 55 KDa presente en el carril 2 del perfil de 8-16.5% de acrilamida-biscacrilamida, que ahora son dos bandas de proteínas de 57 y 54 KDa. Esto ocurrió debido a lo cercano de sus pesos moleculares.

Según lo obtenido en este perfil proteico, aún se puede apreciar una pequeña acumulación de proteínas de bajo peso molecular en el frente de corrida de este gel, lo cual denota que por debajo de 19 KDa la resolución del gel no fue suficiente para evidenciarlas.

4.2. Actividad proteasa del veneno de *S. gigantea*

Luego de haberse obtenido el perfil proteico del veneno de *S. gigantea*, la evaluación de posibles actividades proteolíticas se llevó a cabo mediante zimografías al 12% de acrilamida-bisacrilamida copolimerizado con gelatina al 0.01% p/v como sustrato enzimático. Los resultados se presentan a continuación.

En la **Figura 4** se presenta la zimografía general de las muestras de veneno del ciempies *S. gigantea*, donde se observan 8 actividades proteolíticas evidenciadas por las zonas oscuras (**Figura 4-A**) o claras (**Figura 4-C**) presentes en los geles. Las zonas donde se presentó digestión enzimática fueron: 4 bandas por encima de 75 KDa, 1 banda cercana a 50 KDa, 1 banda por debajo de 37 KDa, y 2 bandas cercanas a 25 KDa. Comparando los geles de la zimografía con el perfil electroforético de 12%

acrilamida-bisacrilamida, da como resultado que las actividades proteolíticas se deben a las bandas de 22, 26, 34, 51, 100 y 116 KDa y 2 bandas ubicadas en la región de proteínas de alto peso molecular, mayores a 250 KDa.

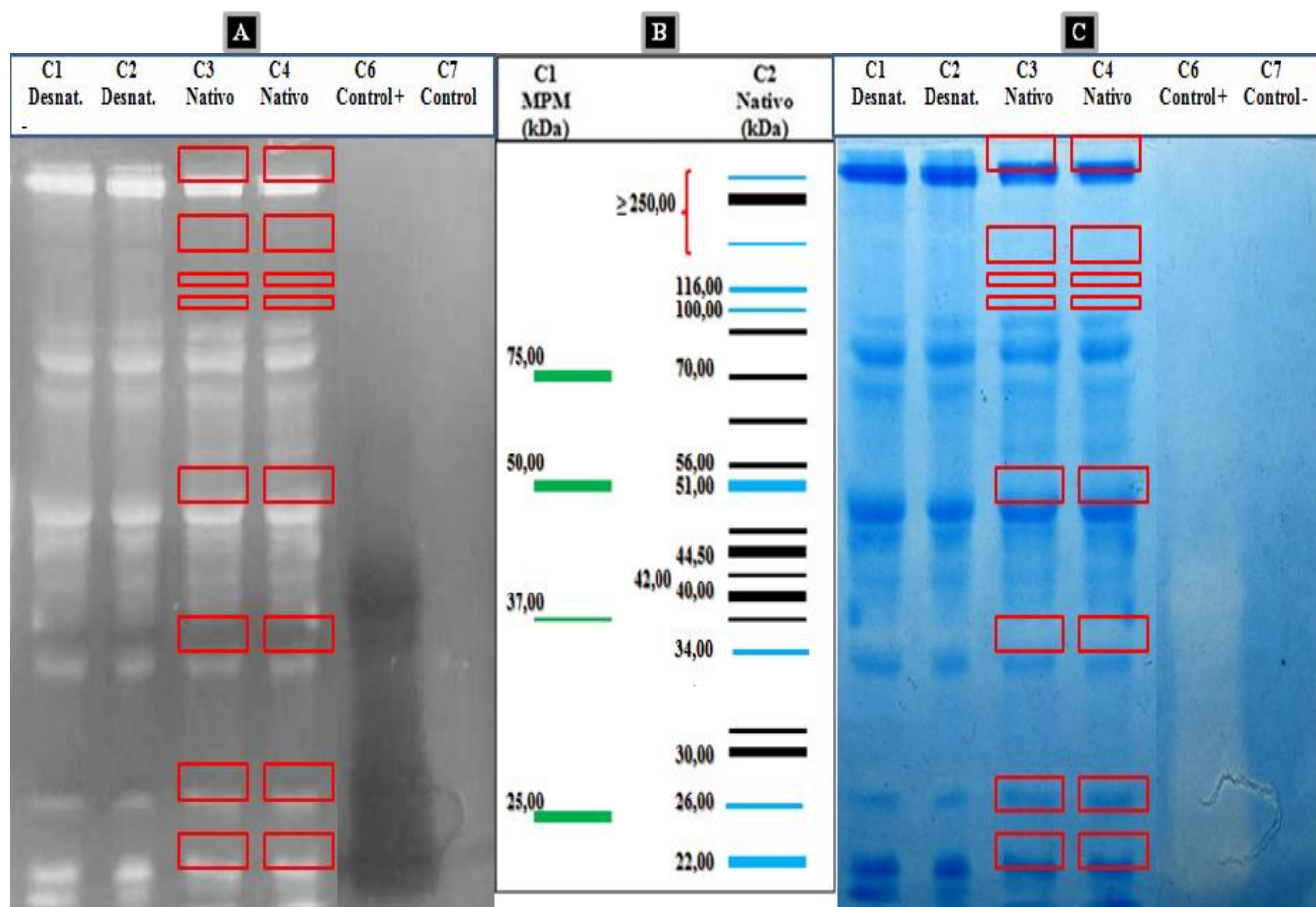


Figura 4. Actividad proteolítica del veneno de *Scolopendra gigantea* en geles de 12% acrilamida-bisacrilamida copolimerizado con gelatina al 0.1% p/v. A) Fotografía inversa de la zimografía, denotando las áreas oscuras como las zonas de actividad enzimática. B) Sección del esquema del perfil proteico al 12% de acrilamida-bisacrilamida. C) Fotografía de la zimografía, denotando las áreas claras como las zonas de proteólisis. Las zonas de las fotografías marcadas con el rectángulo rojo son las que presentaron las actividades enzimáticas. Las bandas de color azul presentes en el esquema del perfil proteico, son las que presentan actividad enzimática. C1 y C2: muestras desnaturalizadas; C3 y C4: muestras nativas; C6: control positivo, tripsina 0.05 µg/µL; y C7: control negativo, TFA 0.1% v/v.

Tomando en cuenta las correcciones de las bandas obtenidas con el perfil electroforético de 8-14% acrilamida-bisacrilamida, las bandas de proteínas que mantienen su peso molecular son las 100, 116 y 26 KDa y las dos bandas mayores a 250 KDa. Mientras que la banda de 22 KDa posiblemente sea la banda de proteínas de 24 KDa; la banda de 34 KDa pase a 33 KDa, y por último, la banda de 51 KDa sea la de 49 KDa. En tales zimografías se presentaron zonas con más actividad que otras, siendo la banda de 34 KDa la que presentó una mayor digestión proteolítica, debido a la gran zona oscura presente en la fotografía. Esta proteasa esta seguida, con respecto a actividad, por la banda de 26, 22 y 51 KDa, y el resto de las bandas por encima de 100 KDa. A pesar de que no se evidencia una zona de digestión notable en estas bandas de alto peso molecular, el hecho de que esa sección del gel esté muy clara y que dichas bandas proteicas no se observen, ya es una evidencia de que están cumpliendo un rol degradativo de la gelatina presente en el gel.

El gel presentado en la **Figura 4**, tiene la particularidad de que se encuentran muestras en forma nativa y desnaturalizadas. Las zonas con una degradación más evidente se presentaron en las muestras que aún mantienen su conformación nativa, mientras que en los carriles con muestras desnaturalizadas dichas actividades proteicas son nulas o muy pequeñas.

Con el zimograma general obtenido, se procedió a investigar la naturaleza enzimática de las bandas que presentaron degradación enzimática. Para ello, se usaron inhibidores enzimáticos específicos que permitieron corroborar que tipo de actividad enzimática presentaron esas bandas. En la **Figura 5**, se observa que en la región

donde al zimograma se le aplicó el inhibidor para serinproteasas (PMSF), las bandas con pesos moleculares de 51, 100 y 116 KDa, y las dos bandas mayores a 250 KDa, no tuvieron actividad enzimática. Esto se debió a que no se observaron zonas de degradación enzimática y además aparecieron bandas proteicas lo que indica que el inhibidor PMSF ejerció su acción sobre esas enzimas. Este resultado sugiere que dichas enzimas son serinprotesas. Así mismo, tres bandas no presentaron inhibición alguna con el PMSF. Estas fueron las bandas de 51, 34 y 26 KDa.

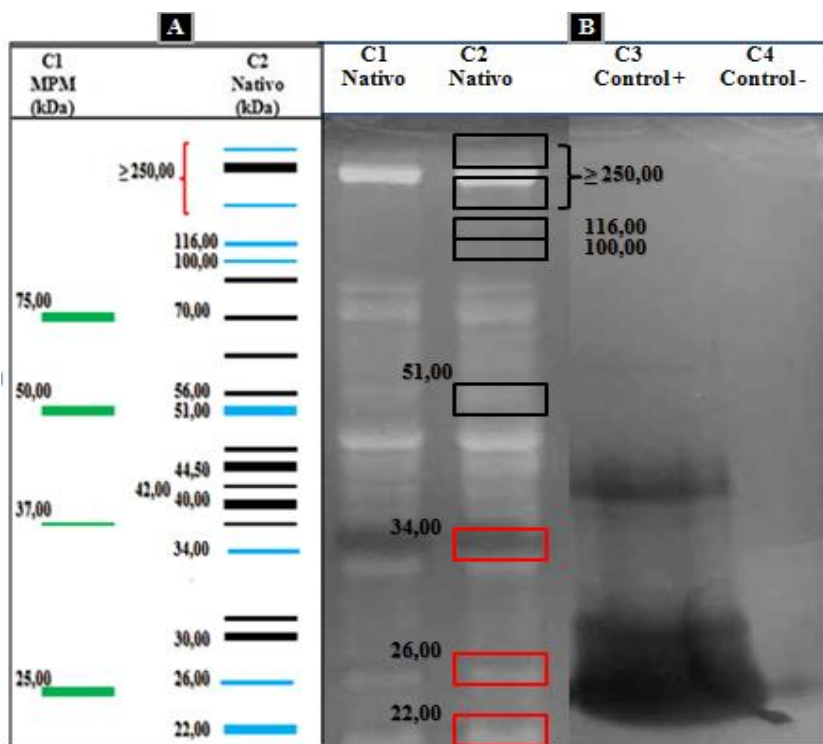


Figura 5. Actividad proteolítica del veneno de *Scolopendra gigantea* en gel de 12% acrilamida-bisacrilamida copolimerizado con gelatina al 0.1% v/v y 10 mM del inhibidor PMSF. Las zonas sombreadas con el rectángulo negro son las bandas sin actividad enzimática, mientras que las sombreadas con el rectángulo rojo si presentaron degradación enzimática en el gel. C1 y C2: muestras nativas; C3: control positivo, tripsina 0.05 µg/µL; C4: control negativo, TFA 0.1% v/v.

Con respecto al zimograma con el inhibidor EDTA para metaloproteasas, se presentan los resultados en la **Figura 6**. En esta imagen se puede apreciar que las bandas de 100 KDa, 116 KDa y las dos mayores de 250 KDa, siguen sin presentar actividad enzimática, presumiblemente por la inhibición general que puede realizar el EDTA sobre varios tipos de enzimas.

Además, las enzimas de 26, 22 y 51 KDa, dejaron de presentar actividad enzimática. Esto puede indicar que los bandas candidatas a ser metaloproteasas son las de 26, 22 y 51 KDa. La banda de 34 KDa, presentó una degradación proteolítica leve, casi perceptible donde claramente no disminuyó del todo su actividad enzimática, lo que deja la opción abierta de que esta banda proteica tenga actividad aspartilproteasa, cisteinproteasa u otra actividad enzimática.

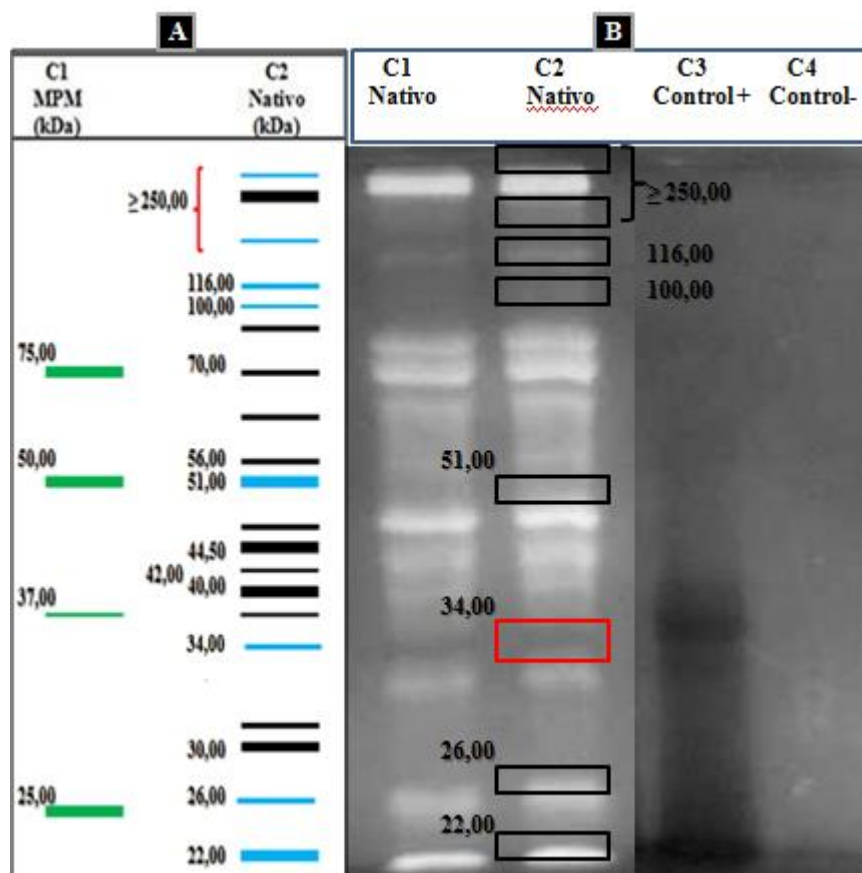


Figura 6. Actividad proteolítica del veneno de *Scolopendra gigantea* en geles de 12% acrilamida-bisacrilamida, copolimerizado con gelatina al 0.1 % v/v y 0.1 M del inhibidor EDTA. Las zonas sombreadas con el rectángulo negro son las bandas sin actividad enzimática, mientras que las sombreadas con el rectángulo rojo si presentaron degradación enzimática en el gel. C1 y C2: muestras nativas; C3: control positivo, tripsina 0.05 µg/µL; C4: control negativo, TFA 0.1% v/v.

4.3. Actividad hemolítica del veneno *S. gigantea*

Con la curva de calibración de Bradford (**Figura A-11**), se obtuvo que la concentración de proteínas totales presentes en la dilución del veneno con PBS 1X fue de 1,5514 µg/µL. Esta concentración de proteínas fue la utilizada para el ensayo de actividad hemolítica, y con ella se calculó la concentración proteica final del

veneno en las muestras para evaluar la actividad hemolítica, obteniéndose los resultados que se presentan en la **Tabla I**.

Tabla I. Concentración proteica final del veneno en las muestras de actividad hemolítica, según el volumen añadido.

Volumen de Veneno (uL)	Concentración Final (ug/uL)
2	0,0207
4	0,0414
6	0,0621
8	0,0827

Los resultados de la prueba de ANOVA (**Tabla II**) indicaron que hay diferencias significativas para el volumen de veneno y para el tiempo, pero no para la interacción entre ambas variables.

Tabla II. Análisis de Varianza (ANOVA) del porcentaje de hemólisis para dos factores (volumen de veneno y tiempo de incubación). F: valor en la distribución; p (iguales): probabilidad de las varianzas del error y del tratamiento sean iguales.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	p (iguales)
Tiempo (h)	1295,962	1	1295,962	42,288	0,000
Volumen (uL)	570,798	3	190,266	6,208	0,005
Tiempo * Volumen	52,156	3	17,385	0,567	0,644
Error	490,343	16	30,646	-	-
Total	263367,772	24	-	-	-

La prueba de Tukey para comparaciones múltiples (**Tabla III**) indica que sólo existen diferencias significativas (valores en rojo) entre los volúmenes de veneno 2 y 8, y entre 4 y 8.

Tabla III. Comparaciones múltiples de los porcentajes de hemólisis para dos factores (volumen de veneno y tiempo de incubación). p (iguales): probabilidad de que los tratamientos comparados sean iguales.

Volumen (uL)		Diferencia de medias (I-J)	p(iguales)
2	4	-3,57	0,684
	6	-7,34	0,141
	8	-13,17	0,004
4	6	-3,76	0,649
	8	-9,60	0,038
6	8	-5,84	0,298

El diagrama de cajas que se presenta en la **Figura 7**, muestra una tendencia significativamente creciente en cuanto al volumen del veneno y en cuanto al tiempo. Resaltan la alta variabilidad (distancia entre máximos y mínimos) y el sesgo de los datos (ubicación de la mediana en la caja), para un volumen de veneno de 4 μ L a un tiempo de incubación de 2 h. También hay un marcado sesgo para un volumen de veneno de 8 μ L a un tiempo de 0 h. Se observa además que existen valores que superan el tope del 100% de hemólisis en relación al control negativo. El promedio del porcentaje de hemólisis para el menor volumen empleado (2 μ L) fue de 89.57% (Desviación Estándar, SD $\pm$ 2.09) a un tiempo de 0 h, mientras que a las 2 h ya se había completado la hemólisis.

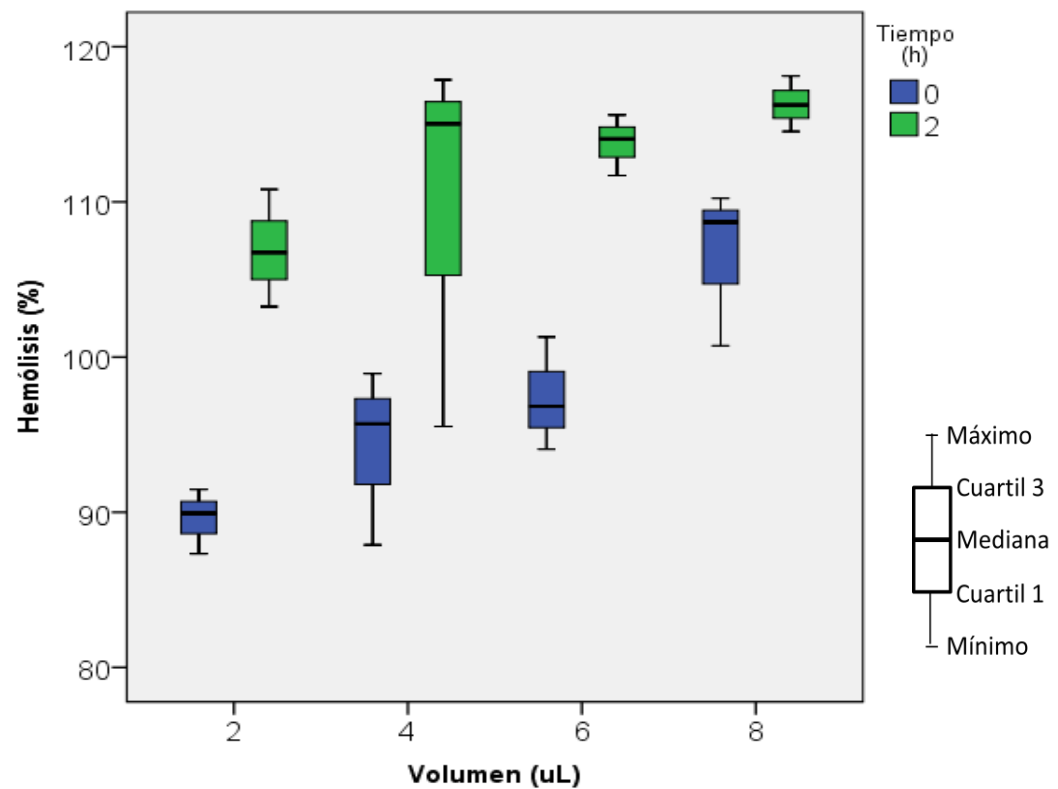


Figura 7. Diagrama de cajas para los porcentajes de hemólisis obtenidos según el volumen de veneno y el tiempo de incubación.

4.4. Actividad coagulasa del veneno *S. gigantea*

Con respecto a la posible actividad coagulasa del veneno de *S. gigantea*, se demostró que los volúmenes de veneno utilizados para esta prueba (ver apartado 3.8.2), no indujeron la formación de coágulos de fibrina en el suero, luego de 15 min de haber sido añadido. Una vez pasado ese tiempo, se decidió añadir a esos tubos la misma cantidad de trombina que en el control positivo del ensayo (50 μ L), y se obtuvieron los mismos resultados que en el control positivo. Es importante destacar, que la formación del coagulo de fibrina bajo la presencia de la trombina, se ubicó dentro de los parámetros normales de coagulación (entre 11-15 segundos).

Tabla IV: Actividad coagulasa realizada para el veneno del ciempiés *Scolopendra gigantea*. Leyenda:

+ (formación de coágulo), - (sin formación de coágulo).

Veneno (μL)	Actividad coagulasa	
	Veneno	Trombina
0,50	-	+ (11 segundos)
1,00	-	+ (13 segundos)
1,50	-	+ (15 segundos)
2,00	-	+ (11 segundos)

4.5. Identificación de carbohidratos en el veneno de *S. gigantea*

En la determinación de trazas de carbohidratos en el veneno de *S. gigantea* se realizaron pruebas bioquímicas, obteniéndose los resultados visualizados en la **Tabla IV**. Para la prueba de Molish, el veneno dió positivo con una coloración púrpura, lo cual indica la presencia de carbohidratos en el coctel tóxico de este invertebrado (**Figura A-**). Además, la reaccion de Seliwanoff dió positiva pasado unos 8:00 minutos, con una coloración rojiza muy tenue que evidencia la presencia de moléculas de quetosa (**Figura A-**). Cabe destacar que el TFA 0.1% v/v dió negativo en todas las pruebas cualitativas, por lo que su presencia no afectó los resultados de estas pruebas.

Tabla IV. Pruebas bioquímicas para la determinación cualitativa de carbohidratos en el veneno de *S. gigantea*. Leyenda: + (aparición de coloración y/o precipitado), - (sin aparición de coloración y/o precipitado).

Reacción	Molish	Barfoed	Seliwanoff	Bial	Lugol
Veneno de <i>S. gigantea</i> en TFA 0.1% v/v	+	-	+ Quetosa	-	-

CAPÍTULO V.

DISCUSIÓN

5.1. Proteínas totales y perfil electroforético del veneno de *S. gigantea*

Para el extracto crudo de veneno obtenido mediante electroestimulación de los ejemplares de *S. gigantea* usados en esta investigación, se estimó una concentración promedio de proteínas de 2435,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo cual pareciera ser un reflejo de lo observado en cada uno de los perfiles proteicos del veneno de *S. gigantea* (**Figuras 1, 2 y 3**). Esto representa un aumento de casi 6.5 veces mayor a lo reportado por Parrilla-Álvarez *et al.* (2008), donde para la misma especie de ciempiés, determinó una concentración proteica de 375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en el veneno crudo. Esto es bastante elevado, considerando que los ejemplares usados en esta investigación también provienen de la zona de colecta (Estado Falcón) de los ejemplares que usaron Parrilla-Álvarez *et al.* (2008).

Es importante destacar que este aumento drástico de las concentraciones de proteínas en el extracto de veneno crudo de *S. gigantea*, puede deberse a las condiciones de cautiverio en las cuales se mantuvo a cada uno de los ciempiés. La alimentación basada en camadas de ratones proporcionados a los quilópodos cada 15 días, se tradujo en ejemplares de mayor talla y peso, con glándulas más grandes dentro del complejo forcípular que posiblemente generó un mayor volumen de veneno. Así mismo, como dichos ejemplares no tenían por qué luchar por su territorio (ya que se almacenaban de forma individual en cada terrario), no se veían presionados en utilizar

su veneno como defensa. También el cambio de sustrato quincenalmente, permitió que no se desarrollaran hongos u otros patógenos que pudiesen comprometer la salud de los ciempiés. Otro factor que pudo haber influenciado sería el proceso de estrés físico a los cuales fueron sometidos cada ejemplar de *S. gigantea*, permitiendo que cargaran veneno en sus conductos forcípuales, de manera que cuando se les aplicará la electroestimulación, se obtenía una mayor cantidad de veneno, tanto en volumen como en concentración de proteínas.

En los perfiles proteicos obtenidos para el veneno de *S. gigantea* (**Figuras 1, 2 y 3**), se totalizó un total de 28 bandas de proteínas en condiciones no reductoras, obteniéndose un perfil proteico más completo en comparación con el reportado por Parrilla-Álvarez *et al.* (2008), donde para esta misma especie, solo obtuvo 10 bandas de proteínas 190 KDa a 6 KDa. Así mismo, se observan 4 bandas mayores a 250 KDa, lo cual indica que la zona de resolución de 8% acrilamida-bisacrilamida, mejoró considerablemente los pesos moleculares de estas bandas proteicas. Por lo tanto, el perfil proteico en gradiente discontinuo de 8-14% acrilamida-bisacrilamida, generó una mejor resolución de las bandas de proteínas contenidas en el veneno del quilópodo en estudio.

Perfiles proteicos de otras especies, pertenecientes al género *Scolopendra*, muestran semejanzas en el rango de los pesos moleculares de las bandas obtenidas. Para *S. viridicornis*, se muestran bandas que van desde 114 KDa a 88 KDa, en condiciones no reductoras, mientras que en condiciones desnaturalizantes aparecen un rango de bandas entre 82-40 KDa (Malta *et al.*, 2008). Rates *et al.* (2007), muestran para

S. viridicornis nigra un total de 62 especies moleculares que van en un rango de 3 KDa a 20 KDa, y para *S. cingulata* muestran 65 especies moleculares entre 1.3 KDa y 22 KDa. En este último caso, se obtuvo una cantidad considerable de proteínas de bajo peso molecular, que posiblemente también se encuentren en *S. gigantea* (o al menos estén presentes proteínas de pesos similares), tomando en cuenta que en los perfiles de electroforesis realizados en este trabajo, reflejados en las **Figuras 1, 2 y 3**, aún se observaban zonas oscuras o de apilamiento de proteínas, en el frente de corrida de los carriles que contenían las muestras de veneno.

Al respecto, es necesario resaltar que las proteínas de bajo peso molecular que han sido estudiadas, juegan un papel importante como neurotoxinas ya que son capaces de activar o inhibir canales iónicos dependientes de voltaje, provocando parálisis que ayuda a mejorar la captura de la presa por parte de estos ciempiés (Yang *et al.*, 2012). Las neurotoxinas de la especie *Scolopendra subspinipes mutilans* están siendo tratadas como potenciales agentes insecticidas y/o moléculas análogas a analgésicos como la morfina, lo que hace del coctel tóxico de estos invertebrados una fuente importante de nuevos hallazgos a nivel médico, agroindustrial y farmacológico (Yang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Es necesario entonces realizar estudios del veneno de *S. gigantea*, que permitan determinar la presencia y el peso de las proteínas menores a 19 KDa y de péptidos, debido a su potencial uso en el campo de la salud.

Como se evidenció en los perfiles proteicos de *S. gigantea* (**Figura 1, 2 y 3**), las bandas de proteínas presentes en el veneno en condiciones nativas, al ser expuestas a la acción del β -mercaptoetanol (un poderoso agente reductor), produjo la

desaparición de algunas bandas de alto peso molecular que generaron nuevas bandas de proteínas. Este resultado puede implicar que algunas de las bandas de proteínas en condiciones nativas pueden tener una configuración proteica dimérica, ya sea de naturaleza homodimérica o heterodimérica, dependientes de puentes disulfuros para mantener su estabilidad estructural y/o funcional.

La dimerización de algunas proteínas de venenos son casos conocidos, principalmente los relacionados a toxinas heterodiméricas aisladas de los cocteles tóxicos de hormigas, arañas y escorpiones (Osipov *et al.*, 2008). En investigaciones recientes, se han reportado neurotoxinas unidas por puentes disulfuro en caracoles cono marinos, así como también de fosfolipasas A2 diméricas en veneno de serpientes, con conformaciones homodiméricas y heterodiméricas mantenidas por dichos puentes disulfuros (Bilgrami *et al.*, 2004; Osipov *et al.*, 2008). La existencia de proteínas diméricas en venenos de animales ponzoñosos puede inducir nuevas formas de actividades enzimáticas, realizar cambios temporales de estas proteínas, así como también bloquear otros procesos celulares (Osipov *et al.*, 2008). Zhu & Gao (2006), trabajando con en el escorpión *Buthus occitanus* confirmaron que la pérdida de las regiones ricas en cisteínas, provocaban cambios conformacionales a nivel inter e intramolecular, estableciendo nuevos puentes disulfuros entre los heterodímeros, activando o inhibiendo la actividad lipolítica de la enzima BotLVP1.

Considerando que las proteínas involucradas podrían constituir homodímeros o heterodímeros, y haciendo uso de las nuevas bandas aparecidas en C3 (**Figura 1**), se puede inferir cuales bandas sumadas, podrían constituir las bandas proteicas ausentes

en la zona de corrida nativa (C2). Sumando las bandas de 24 y 46 KDa de C3, se podría obtener la banda de aproximadamente 70 KDa presente en el carril 2. Lo mismo podría considerarse con la sumatoria de 33 y 46 KDa de C3, lo que arroja una banda proteica de aproximadamente 79 KDa, que podría ser la de 78 KDa presentada en C2. La suma de 40 y 22 KDa del carril C3, podría constituir la banda de 68 KDa parecida a la presentada en el carril de proteínas nativas. El resto de las proteínas desaparecidas en C3 podrían estar contenidas en los cúmulos proteicos claramente observables en las bandas de proteínas de 40, 46, 22, 19 y 74 KDa, siendo esta última las que posiblemente contenga monómeros de proteínas de las bandas por encima de 75 KDa. Es necesario aclarar entonces que para probar lo anteriormente expuesto, se necesitan otros experimentos más específicos que permitan corroborar esa dimerización en las proteínas del veneno de *S. gigantea*.

5.2. Enzimas proteolíticas en el veneno *S. gigantea*

En los ensayos zimográficos (**Figura 4**) se identificaron 8 proteasas, de las cuales 5 presentaron actividad serinproteasa (51 KDa, 100 KDa, 116 KDa y dos bandas ≥ 250 KDa) (**Figura 5**), 2 mostraron actividad metaloproteasa (22 KDa y 26 KDa) y una banda que probablemente sea aspartilproteasa o cisteinproteasa (34 KDa) (**Figura 6**). En el trabajo realizado por Malta *et al.* (2008), se identificaron para *S. viridicornis*, dos bandas con actividad caseinolítica de 22 KDa y 44 KDa, de las cuales sólo concuerda con este trabajo la banda de 22 KDa como una metaloproteasa, lo que podría sugerir una proteína con actividad enzimática común entre los ejemplares de *S. gigantea* y *S. viridicornis*, de Venezuela y Brasil, respectivamente. Considerando a

otro grupo animal, los ofidios, también presentan enzimas con actividades metaloproteasas; es así como Girón *et al.* (2011), indican una metaloproteasa denominada Porthidin-1 del extracto de veneno de *Porthidium lansbergii hutmanni*, que posee un bajo peso molecular (23 KDa), y donde también identifican bandas con un alto peso molecular con la misma actividad enzimática.

Las proteínas con actividad metaloproteasa están implicadas en la degradación de la matriz extracelular y previenen la formación de coágulos de sangre, lo que se traduce en una alta actividad hemorrágica (Undheim & King, 2011). En la matriz celular puede alterar específicamente a proteínas como la laminina, nidógeno, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos de la membrana basal endotelial, logrando que el veneno se difunda a través de estas membranas (Giron *et al.*, 2011). Estos hallazgos han sido evidenciados en veneno de serpientes y arañas, observándose que en la zona de la mordedura se producen edema, ampollas, mionecrosis e inflamación producto de la acción de metaloproteasas (Gutiérrez & Rucavado, 2000). Además, se ha reportado rabdomiolisis en el tejido muscular cardíaco de ratones, después de la inoculación de extracto de veneno de *S. gigantea* (Gonzalez *et al.*, 2000), lo que sugiere que este alto efecto hemorrágico, hiperalgésico y miotóxico, puede estar relacionado con la actividad metaloproteasa en el extracto de veneno de los ciempiés (Malta *et al.*, 2008; Undheim & King, 2011). En base a esto, los hallazgos de este trabajo respecto las proteínas que presentaron actividad metaloproteasa en el veneno de *S. gigantea*, podrían constituir un blanco de estudios farmacológicos destinados a

contrarrestar de forma específica las afecciones clínicas producidas por este tipo de proteasas.

Aún cuando la mayoría de las enzimas proteolíticas en los extractos de veneno de animales ponzoñosos tienden a ser metaloproteasas, también se pueden presentar otras proteasas con actividad serinproteasa (Undheim & King, 2011). Tal es el caso de las 5 bandas obtenidas en los zimogramas (**Figura 5**) del veneno de *S. gigantea*. En otros invertebrados, como los escorpiones del género *Androctonus*, se han reportado serinproteasas de pesos moleculares entre 20 y 24 KDa (Caliscan *et al.*, 2009); mientras que para *Loxosceles intermedia* (araña marrón del sur de Brasil), se determinaron dos bandas de 85 y 95 KDa como serinproteasas (Veiga *et al.*, 2001). Cabe destacar, que las serinproteasas tienen un efecto combinado con las metaloproteasas, ayudando a la digestión de las presas por la degradación de enlaces peptídicos de las proteínas de membrana, así como también de afectar la agregación plaquetaria, coagulación y presión sanguínea. Este tipo de efecto se ha encontrado en veneno de varias especies de serpientes, funcionando como activadores de la cascada de coagulación, específicamente en precursores del factor VII, factor X y protrombina (Manjunatha, 2005).

En las especies de ciempiés *Otostigmus pradoi* y *Cryptops iheringi*, utilizadas por Malta *et al.* (2008), se presentaron actividades leves de enzimas serinproteasas. La presencia de estas enzimas, sugiere su participación en la activación de toxinas del veneno mediante clivaje de péptidos precursores (zimógenos), para hacerlas funcionales (Undheim & King, 2011). Sin embargo, esta actividad serinproteasa no se

observó en la especie *S. viridicornis*, lo que implica que las bandas con actividad serinproteasa obtenidas en este trabajo representan un posible nuevo hallazgo para el género *Scolopendra*. Además de ello, es necesario evaluar los efectos sistémicos de estas proteínas, para que en base a ello se puedan establecer protocolos de tratamiento inmediato que contrarresten las afecciones producidas de manera eficaz y específica.

Además de las bandas que evidenciaron actividad metaloproteasa o serinproteasa, es necesario analizar aquellas que no presentaron inhibición por parte de los inhibidores enzimáticos EDTA y PMSF. Tal es el caso de la banda de 51 KDa, de la cual se sugiere que puede tener actividad aspartilproteasa, cisteinproteasa o de otra naturaleza enzimática (**Figura 6**). Generalmente, en la bibliografía se reporta la presencia de enzimas hialuronidasas en el extracto de veneno de los ciempiés. Malta *et al.* (2008), por ejemplo, identificaron una banda con actividad hialuronidasa entre 40-66 KDa en *O. pradoi* y *S. viridicornis*, y Muñoz *et al.* (2005) también identificaron una banda con esta misma actividad, con un peso molecular de 50 KDa para *S. viridis* Say. Considerando esos estudios, podría ser posible que la banda de 51 KDa presente actividad hialuronidasa. Este tipo de enzimas funcionan como dispersores de los componentes tóxicos del veneno a través del torrente sanguíneo, aumentando el impacto sistémico debido a la hemorragia y a la acción de neurotoxinas (Udheim & King, 2011). Por tal motivo, es necesario realizar estudios que permitan esclarecer si el tipo de actividad enzimática que presenta la banda de 51 KDa, lo que permitirá buscar tratamiento específicos para contrarrestar sus efectos en el organismo.

5.3. Hemólisis directa y efecto coagulante del veneno *S. gigantea*

Según los resultados obtenidos en la **Figura 7**, la acción hemolítica en el tiempo 0 fue elevada y de forma inmediata, completándose el proceso hemolítico a las 2 horas de incubación con sangre humana ORh⁺, lo que sugiere que posiblemente después de una mordedura por *S. gigantea*, se presentó un cuadro clínico hemorrágico debido a la gran cantidad de eritrocitos lisados por la acción de los componentes tóxicos de su veneno.

El efecto hemolítico del veneno de los ciempiés ha sido reportado por Malta *et al.* (2008), donde muestra que los ejemplares que fueron sometidos a este tipo de actividad, presentaron porcentajes de hemólisis cercanos a 100% en eritrocitos humanos. *S. viridicornis* mostró una hemólisis de 80% mientras que *O. pradoi* fue de casi 100%. Cabe destacar que ese ensayo fue realizado en un solo periodo de tiempo (2 h), mientras que en este trabajo se plantearon dos tiempos para observar el efecto inmediato y a través del tiempo, del veneno en muestras de sangre.

Debido a la rapidez con que se produce el efecto hemolítico, Malta *et al.* (2008) reportan que este tipo de actividad enzimática puede estar mediada por fosfolipasas de tipo A2 que actúan sobre lecitina exógena, liberando los ácidos grasos de la membrana plasmática de los eritrocitos, y provocando su lisis. La única molécula de fosfolipasa A2 caracterizada para el género *Scolopendra*, es la denominada Scol/Pla, proveniente del veneno de *S. viridicornis* de México, que posee cinco puentes disulfuros y un peso molecular de 13,75 KDa. Además, mediante análisis

filogenéticos, se comprobó que esta enzima es homóloga con las fosfolipasas del veneno de himenópteros y escorpiones (Gonzales-Morales *et al.*, 2009).

En otros invertebrados como la araña brasileña *Loxosceles intermedia* demostraron que el proceso hemolítico esta mediado por dos enzimas denominadas P1 y P2, que luego de la acidificación del plasma por parte de otros componentes tóxicos del veneno, estas enzimas realizan cortes en glicoforinas C de la superficie de los eritrocitos, comprometiendo el mantenimiento de la estructura globular de esas células, y la regulación de la entrada y salida de sustancias a través de su membrana, lo cual produce como fin último, la lisis celular (Tambourgi *et al.*, 2000).

Con relación al efecto coagulante de *S. gigantea* (**Tabla IV**), el mismo no se observó en la realización de los ensayos, por lo cual se infiere que los componentes que conforman el veneno de *S. gigantea* no tienen efecto coagulante, al menos a esa concentración. Además, considerando que la formación de coágulos se evidenció sólo después de haber agregado trombina a dichas muestras, incluso en las que se había añadido veneno, pareciera que su presencia en la mezcla no modificó la acción de la trombina sobre las moléculas de fibrinógeno presentes en el suero. Esto se corresponde con lo reportado por Malta *et al.* (2008), quienes no obtuvieron actividad coagulante con ninguno de los venenos de las especies con las cuales trabajaron (*Otostigmus pradoi*, *Cryptops iheringi* y *Scolopendra viridicornis*), lo que sugiere que el veneno de estos invertebrados no interfiere con los procesos de coagulación. El efecto coagulante si ocurre con el veneno de serpientes, principalmente del género *Bothrops*, y para otros invertebrados como los escorpiones, su veneno posee un efecto

pro y anticoagulante, tal es el caso de *Tityus discrepans*. En el veneno de esta especie de escorpión se describieron tres fracciones proteicas denominadas S1, S4 y S5; la primera tuvo un efecto procoagulante parecido al factor X, mientras que las otras mostraron un efecto inhibidor sobre este mismo factor de la coagulación (Brazon *et al.*, 2013).

5.4. Presencia de carbohidratos en el veneno de *S. gigantea*

El resultado positivo en esta prueba podría estar asociado a proteínas con conformación de glicoproteínas, específicamente con un residuo de cetosa (**Tabla V**). Esto a su vez, podría indicar que se puede encontrar en forma de una enzima de tipo hialuronidasa. Como se indicó anteriormente, Malta *et al.*, (2008), reportan una enzima hialuronidasa para *S. viridicornis*, lo cual indican que puede contribuir a amplificar el daño inducido por otras proteasas, facilitando la dispersión del veneno dentro del organismo del animal afectado, ya que causa alteraciones en la matriz extracelular (principalmente sobre el ácido hialurónico y condroitin sulfato), favoreciendo la formación de una lesión local en el sitio de la mordedura (Malta *et al.*, 2008; Delgadillo *et al.*, 2013). Es importante resaltar, que aunque se han evidenciado actividades hialuronidasas en venenos de otras especies de *Scolopendra*, ningún trabajo ha dilucidado que residuos de carbohidratos están asociados al complejo glicoproteico de estas enzimas; por lo cual este trabajo dio indicios de que dicho residuo de carbohidrato se encuentra en forma de cetosa, por lo que se debe hacer experimentos más específicos para determinar los sacáridos presentes en esta enzima.

5.5. Consideraciones finales

Los resultados obtenidos en este Trabajo Especial de Grado, representan una herramienta útil y primordial no solo para generar bibliografía especializada en la composición del veneno de *S. gigantea*, sino también para generar tratamientos eficaces contra la mordedura de este invertebrado venenoso, ya que teniendo el conocimiento de las moléculas involucradas en los procesos sintomatológicos provocados por las toxinas, en un futuro cercano se pueden elaborar fármacos para contrarrestar dichos efectos. Además, se deben aprovechar las posibles potencialidades biotecnológicas que puede poseer el veneno de *S. gigantea* para áreas como la agricultura, medicina y demás actividades antropogénicas.

CAPÍTULO VI.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

- La concentración de proteínas totales (2,4356 mg/ μ L) en el veneno de *S. gigantea* fue 6.5 veces mayor a lo reportado en la bibliografía para esta especie, y se corresponde con la cantidad de bandas que se muestran en los perfiles proteicos.
- En el perfil proteico en gradiente discontinuo de 8-14% acrilamida-bisacrilamida, se obtuvo 28 bandas en condiciones no reductoras y 22 bandas en condiciones reductoras, con pesos moleculares que van desde 22 KDa, hasta bandas por encima de 250 KDa. Con este perfil se obtuvo un patrón de bandas proteicas completo del veneno de *S. gigantea*.
- Se detectaron ocho bandas con actividades enzimáticas en el extracto de veneno de *S. gigantea*, con pesos moleculares aproximados de 116, 100, 51, 34, 26 y 22 KDa, más dos bandas por encima de los 250 KDa.
- Con el inhibidor PMSF, se identificaron cuatro bandas con actividad serinproteasa de 116 y 100 KDa, mas dos bandas $\geq$ 250 KDa. Mientras que con el inhibidor EDTA, se identificaron tres bandas de 51, 26 y 22 KDa que presentaron actividad metaloproteasa.
- La banda de 34 KDa disminuyó levemente su actividad enzimática bajo la acción del inhibidor EDTA. Su inhibición parcial indica que posee una naturaleza enzimática distinta a serinproteasa y metaloproteasa.

- Se presentó una rápida y elevada actividad hemolítica en el extracto de veneno de *S. gigantea*, cercana a 100% a 0 horas de incubación con sangre humana tipo ORh⁺ en los cuatro volúmenes de veneno empleados. En cuanto a la actividad coagulasa, esta no se evidenció en el veneno de *S. gigantea*.
- Mediante pruebas bioquímicas para carbohidratos se confirmó la presencia de los mismos en el veneno de *S. gigantea*, específicamente de cetosas.

6.2. RECOMENDACIONES

- Estudiar las proteínas menores a 19 KDa, e incluso los péptidos y pequeños polipéptidos, que están presentes en el veneno de *S. gigantea*.
- Separar y purificar parcial o totalmente las proteínas presentes en el veneno de *S. gigantea*.
- Evaluar otros tipos de actividades enzimáticas, como la hialuronidasa, para aquellas enzimas en las que no se pudo dilucidar el tipo específico de actividad proteasa.
- Estudiar la citotoxicidad del veneno de *S. gigantea* en modelos variados de cultivo *in vitro*.
- Probar en animales de experimentación los efectos sistémicos de cada una de las proteasas presentes en el veneno de *S. gigantea*.
- Realizar estudios enfocados en el desarrollo de fármacos para contrarrestar las afecciones producidas por el emponzoñamiento con *S. gigantea*.

BIBLIOGRAFÍA

Abarca C., M. Gutiérrez & M. Rueda (2005). Liberación endógena de GABA y ácido glutámico en el cordón ganglionar del acocil por efecto del componente tóxico de *Scolopendra viridis* Say. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, México.

Acosta M. & D. Cazorla (2004). Envenenamiento por ciempiés (*Scolopendra* sp.) en una población rural de la zona semiárida del estado Falcón, Venezuela. *Rev. Invest. Clin.* 56: 712-717.

Attems C. (1930). *Myriopoda. 2. Scolopendromorpha*. Das Tierreich. De Gruyter. Berlin, Alemania. 18 p.

Balit C., M. Harvey, J. Waldock & G. Isbister (2004). Prospective study of centipede bites in Australia. *J. Toxicol. Clinic. Toxicol.* 42: 41-48.

Bashir M. (2010). Histology and histochemistry of the venom apparatus of the centipede *Scolopendra valida* Lucas 1840 (Chilopoda Scolopendromorpha Scolopendridae). *Trop. Zool.* 23: 107-115.

Bilgrami S., S. Tomar, S. Yadav, P. Kaur, J. Kumar, T. Jabeen, S. Sharma & T. Singh (2004). Crystal structure of schistatin, a disintegrin homodimer from saw-scaled viper (*Echis carinatus*) at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 341: 829-837.

Bhagirath B., B. Chingtham & Y. Mohen (2006). Venom of a hill centipede *Scolopendra viridicornis* inhibits growth of human breast tumor in mice. *Indian J. Pharmacol.* 38: 291-292.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.

Brazon J., B. Guerrero, G. D' Suze, C. Sevcik, C & Arocha-Piñango (2013). Anticoagulant and factor Xa-like activities of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Acta Toxicol. Argent.* 21: 25-31.

Borges A. & L. De Souza (2006). Escopionimos en Venezuela: una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. *Rev. Fac. Farm.* 69: 15-27.

Caliskan F., H. Sivas & Y. Sahim (2009). A preliminary study for the detection of gelatinolytic proteases from the scorpion *Androctonus crassicauda* (Turkish black scorpion) venom. *Turk. J. Biochem.* 34: 148-153.

Calvete J., L. Sanz, Y. Angulo, B. Lomonte & J. Gutierrez (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters.* 583: 1736-1743.

Carpenter C., & J. Gillingham (1984). Giant centipede (*Scolopendra alternatus*) attacks marine toad (*Bufo marinus*). *Carib. J. Sci.* 20: 1-2.

Cazorla D., J. Loyo, L. Lugo, Acosta M. & P. Morales (2012). Aspectos clínicos, epidemiológicos y de tratamiento de 11 casos por envenenamiento por ciempiés en Adícora, Península de Paraguaná, Estado Falcón, Venezuela. *Acta Toxicol. Argent.* 20: 25-33.

Cupul-Magaña F. (2007). *Scolopendra viridis* Say, 1821. Chilopoda: scolopendromorpha: scolopendridae. *Dugesiana*. 14: 53-57.

Cupul-Magaña F. (2010). Primer registro de *Scolopendra morsitans* y *Rhysida immarginata* (Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopendridae) para Jalisco, México. *Rev. Zool.* 21: 1-4.

Delgadillo J., M. Palomino, F. Lazo, E. Rodriguez, E. Ramirez, R. Severino & A. Yarlequé (2013). Purificación y algunas propiedades de una hialuronidasa del veneno de *Bothrops brazili* “jergón shushupe”. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 79: 348-358.

D'Suze G., G. Corzo & J. Paniagua (2011). *Emergencias por animales ponzoñosos de las Américas*. Dicresa S. A. México. 11-12 p.

DISE (Dirección de Información Social y Estadística) (2003). *Anuario de Mortalidad 2002*. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. 190 pp. Disponible en línea: http://www.mpps.gob.ve/mscambios/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=13:anuarios-de-mortalidad. Consulta: 02-02-2014.

DISE (Dirección de Información Social y Estadística) (2004). *Anuario de Mortalidad 2003*. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. 198pp.
Disponible en línea:
http://www.mpps.gob.ve/mscambios/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=13:anuarios-de-mortalidad. Consulta: 02-02-2014.

DISE (Dirección de Información Social y Estadística) (2010). *Anuario de Mortalidad 2008*. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. 190 pp.
Disponible en línea:
http://www.mpps.gob.ve/mscambios/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=13:anuarios-de-mortalidad. Consulta: 02-02-2014.

DISE (Dirección de Información Social y Estadística) (2011). *Anuario de Mortalidad 2009*. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. 192 pp.
Disponible en línea:
http://www.mpps.gob.ve/mscambios/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=13:anuarios-de-mortalidad. Consulta: 02-02-2014.

Dutra R., R. Lourenço & G. Cardozo (2008). A novel method for measuring fructose ingestion by mosquitoes. *J. Vect. Ecol.* 33: 225-231.

Edgecombe, G. & G. Giribet (2007). Evolutionary biology of centipedes (Myriapoda: Chilopoda). *Ann. Rev. Entomol.* 52:151–170.

Gawade S. (2007). Therapeutic alternatives from venoms and toxins. *Indian J. Pharmacol.* 39: 260-264

Girón M., A. Estrella, E. Sánchez, J. Galán, A. Tao, B. Guerrero, A. Salazar & A. Rodríguez Acosta (2011). Purification and characterization of a metalloproteinase, Porthidim-1, from the venom of Lansberg's hog-nosed pitvipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*). *Toxicon.* 57: 608-618.

González A., A. Rodríguez-Acosta, J. Gassette, M. Ghisoli, E. Sanabria & M. Reyes-Lugo (2000). Aspectos bioecológicos de la escolopendra (*Scolopendra gigantea* Linnaeus 1758) y la actividad histopatológica de su veneno. *Rev. Cien. FCV-LUZ.* 10: 303-309.

González-Morales L., E. Diego-García., L. Segovia, M. Gutierrez & L. Possani (2009). Venom from the centipede *Scolopendra viridis* say: purification, gene cloning and analysis phylogenetic of a phospholipase A2. *Toxicon.* 54: 8-15.

Gutiérrez, J. & A. Rucavado (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochem.* 82: 841–850

Gutiérrez M., C. Abarca & L. Possani (2003). A toxic fraction from *Scolopendra* venom increases the basal release of neurotransmitters in the ventral ganglia of crustaceans. *Comp. Biochem. Phys. Part C.* 135: 205-214.

Hernández R. (2011). Caracterización molecular de proteasas termoestables producidas por *Aspergillus fumigatus*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Ciudad de México, México.

Hickman C., L. Roberts, S. Keen, A. Larson, H. I'Anson & D. Eisenhour (2008). *Principios integrales de zoología*. McGraw-Hill- Interamericana de España S.A.U. Madrid, España. 414-148 p.

Khanna V., & B. Yadav (2005). A taxonomic re-assessment of the centipede *Scolopendra gigantea* Linnaeus (Chilopoda: Scolopendridae) and confirmation of its occurrence in India. *Zoos' Print J.* 20: 1988.

Kong Y., S. Huang, Y. Shao, S. Li & J. Wei (2013). Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J. Ethnopharm.* 145: 182-186.

Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685

Machado-Allison A., & A. Rodríguez-Acosta A. (1998). *Los Animales venenosos y ponzoñosos de Venezuela*. CDCH-UCV. Venezuela. 1-15 p.

Malta M., M. Lira, S. Soares, G. Rocha, I. Knysak, R. Martins, S. Guizze, M. Santoro, K. Barbaro (2008). Toxic activities of brazilian centipede venoms. *Toxicon*. 52: 255-263.

Manjunatha R. (2005). Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb*. 34: 200-204.

Menez, A. (2002). *Perspectives in molecular toxinology*. John Wiley & Sons, Ltda. Inglaterra. 485 p.

Mohamed A., G. Abu-Sinna, H. El-Shabaka & A. El-All (1983). Proteins, lipids, lipoproteins and some enzyme characterizations of the venom extract from the centipede *Scolopendra morsitans*. *Toxicon*. 21: 371-377.

Molinari J., E. Gutierrez, A. De Ascençap, J. Nasar, A. Arends & R. Márquez (2005). Predation by giant centipedes *Scolopendra gigantea*, on three species of bats in venezuelan caves. *Carib. J. Scie*. 41: 340-346.

Monzón F. & R. Blasco (1997). Patología causada por artrópodos de interés toxinológico y alerológico. *Bol. S.E.A*. 20: 193-215.

Moreno C. (2010). Perfiles proteicos de las proteínas del endospermo de distintas variedades de arroz (*Oryza sativa L*) venezolanos. Trabajo de ascenso presentado ante la Universidad de Carabobo para ascender a la categoría de profesor asistente. Valencia, Venezuela. 70 p.

Muñoz B., M. Valladares & M. Gutiérrez (2005). Aislamiento y caracterización del péptido responsable de la actividad hialuronidasa presente en el veneno del ciempiés (*Scolopendra viridis* Say, 1821). XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, México.

Navarrete L., J. López-Johnston & A. Blanco-Dávila (2006). *Guía de las serpientes de Venezuela: biología, venenos, conservación y checklist*. Zoocriadero Ecopets. Caracas, Venezuela.

Núñez J. (2011). Efecto del veneno entero del veneno de *Centruroides gracilis* (Scorpionida: Buthidae) sobre la proliferación celular *in vitro*. Trabajo de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Programa Académico de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle. Santiago de Cali, Colombia.

Ode J., O. Nwaehujor & M. Onakpa (2010). Evaluation of antihemorrhagic and antioxidant potentials of *Crinum jagus* Bulb. *I. J. App. B. Pharmacol. Technol.* 3: 1330-1336.

Osipov A., I. Kasheverov, Y. Makarova, V. Starkov, O. Vorontsova, R. Ziganshin, T. Andreeva, M. Serebryakova, A. Benoit, R. Hogg, D. Bertrand, V. Tsetlin & Y. Utkin (2008). Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins. *J. Biol. Chem.* 283: 14571-14580.

Parrilla-Álvarez P., L. Navarrete, M. Girón, I. Aguilar & A. Rodríguez-Acosta (2008). Use of henn egg derivaded immunoglobulin against scolopendra (*Scolopendra gigantea*) venom. *Rev. Cien. FCV-LUZ*. 18: 385- 392.

Peng K., Y. Kong, L. Zhai, X. Wu, J. Peng, J. Liu & H. Yu (2010). Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. *Toxicon*. 55: 274-279.

Rates B., M. Bemquerer, M. Richardson, M. Borges, R. Morales, M. De Lima & A. Pimenta (2007). Venomic analyces of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon*. 49: 810-826.

Rodríguez-Acosta A., J. Gassette, A. González & M. Ghisoli (2000). Envenomation in a newborn. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 42: 341- 342.

Rowland M., G. Edwards & A. Chagas (2005). Introduction of the centipede *Scolopendra morsitans* L., 1758, into northeastern Florida, the first authentic north American record, and a review of its global occurrences (Scolopendromorpha: Scolopendridae: Scolopendrinae). *Entomol. News*. 116: 39-58.

Ruiz C. & C. Ruiz (2009). Variabilidad geográfica intraespecífica de la toxicidad del veneno de *Bothrops colombiensis* (Serpentes, Viperidae) en Venezuela. Trabajo de Grado presentado como requisito obligatorio parcial para optar al título de Médico-Cirujano. Departamento de Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente. Barcelona, Venezuela.

Sanz B. (1967). *Bioquímica experimental: un manual de laboratorio*. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España.

Shelley R. & S. Kiser (2000). Neotype designation and a diagnostic account for the centipedes, *Scolopendra gigantea* L. 1758, with an account of *Scolopendra galapogoensis* Bollman 1889 (Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopendridae). *Trop. Zool.* 13: 159-170.

Tambourgi D., B. Morgan, R. de Andrade, F. Magnoli & C. van den Berg (2000). *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood*. 95: 983-691.

Undheim E. & G. King (2011). On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon*. 57: 512-524.

Veiga S., V. Zanetti, A. Brazz, C. Mangili & Gramski W. (2001). Extracellular matrix molecules as targets for Brown spider venom toxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 7: 853-850.

Wallace, A. (2007). *Principles and methods of toxicology*. CRC Press. E.E.U.U. 2270 p.

Wenhua R., Z. Shuangquan, S. Daxiang, Z. Kaiya & Y. Guang (2006). Induction, purification and characterization of a antibacterial peptide scolopendrin I from the

venom of centipe *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 43: 88-93.

Yildiz A., S. Biçeroglu, N. Yakut, C. Blir, R. Akdemir & A. Akili (2006). Acute myocardial infarction in a young man caused by centipede sting. *Emerg. Med. J.* 23: e30.

Yang S., Z. Liu, Y. Xiao, Y. Li, M. Rong, S. Liang, Z. Zhang, H. Yu, G. King & R. Lai (2012). Chemical punch packed in venoms makes centipedes excellent predators. *Mol. Cell. Prot.* 11: 640-650.

Yapp M., N. Tan & S. Fung (2011). Biochemical and toxinological characterization of *Naja sumatrana* (Equatorial spitting cobra) venom. *J. Ven. Anim. Tox. Trop. Dis.* 17: 451-459.

Yang S., Y. Xiao, D. Khang, J. Liu, Y. Li, E. Undheim, J. Klint, M. Rong, M. Lai & G. King (2013). Discovery a selective Na_v1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models. *PNAS.* 10: 1073-1079.

Yoon M., T. Jeong, D. Park, M. Xu, H. Oh, K. Song, W. Lee & H. Park (2006). Antioxidant effects of quinoline alkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 735-739.

Yoshida-Kanashiro E., L. Navarrete & A. Rodríguez-Acosta (2003). On the unusual hemorrhagic and necrotic activities caused by the rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) in a Venezuela patient. *Rev.Cubana Med. Trop.* 55: 38-40.

Zhu S. & B. Gao (2006). Molecular characterization of a new scorpion venom lipolysis activating peptide: evidence for disulfide bridge-mediated functional switch of peptides. *FEBS letter.* 580: 6825-6836.

APÉNDICE

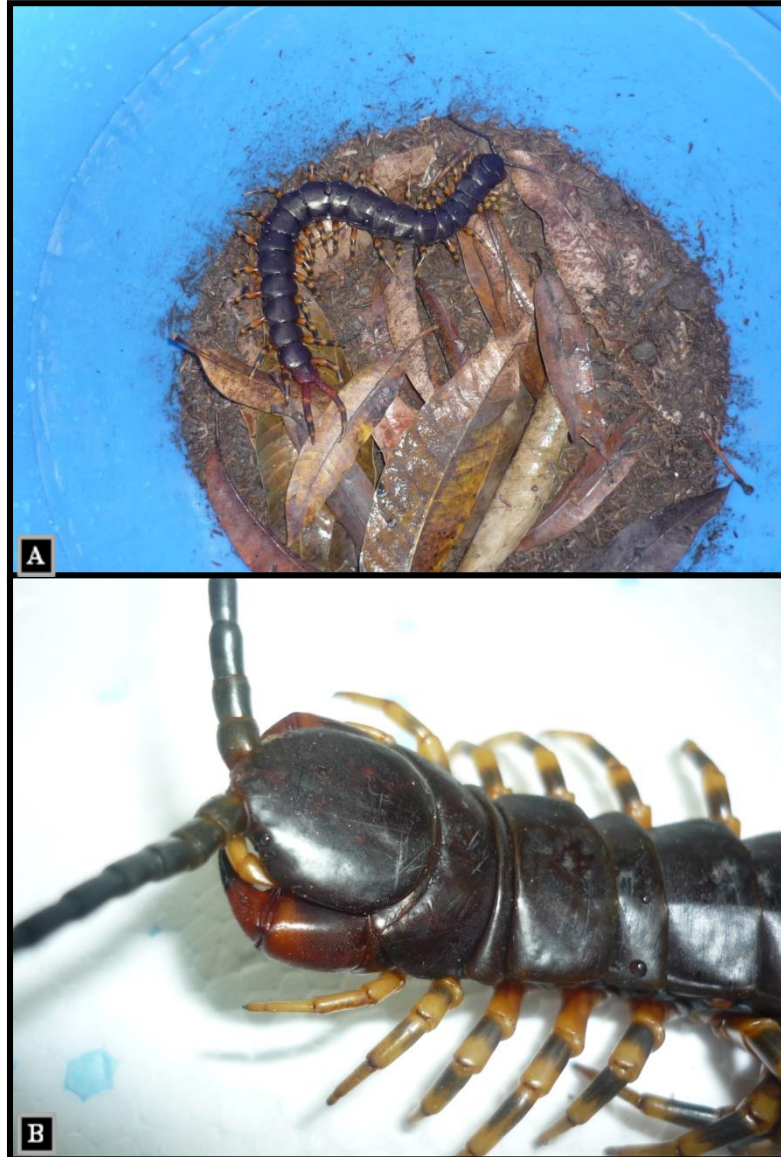


Figura A-1. Primer ejemplar de *S. gigantea* colectado en el Sector el Ereigüe, San Joaquín, Estado Carabobo, Venezuela. A) El ciempiés en un recipiente de plástico durante el primer ensayo preliminar del protocolo de cría en cautiverio. B) Fotografía de la placa cefálica, donde se detalla la uña venenosa llamada forcípula.



Figura A-2. Realización de los terrarios para los individuos de *S. gigantea*. A) Con el uso de un taladro se procedió a hacer los agujeros en la caja plástica contenedora. B) Los agujeros se realizaron 2.00 cm por debajo del borde superior del recipiente. C) Estos agujeros permitieron la entrada de aire para los ciempiés.



Figura A-3. Adición del sustrato al terrario y traspaso de ejemplares de *S. gigantea* a cada uno de sus contenedores. A) El terrario está conformado por abono y algunas cortezas de árboles. B) Traspaso de ciempiés de los recipientes de colecta al terrario. Cada terrario contiene a un solo ciempiés para evitar canibalismo.



Figura A-4. Ejemplar de *S. gigantea* dentro de su respectivo terrario antes de la colocación de la tapa. Se puede observar la coloración naranja parduzca característica de estos ejemplares el Estado Falcón.



Figura A-5. Proceso de alimentación de los ejemplares de *S. gigantea* con ratones NMRI no consanguíneos. A): Se estimula al ciempiés con un pitillo para colocarlo en estado de alerta. B) Se ubica al ciempiés en el terrario mientras se tiene a la mano el ratón que servirá como presa. C) Se abre el terrario y se procede a meter al ratón procurando colocarlo cerca del ciempiés.

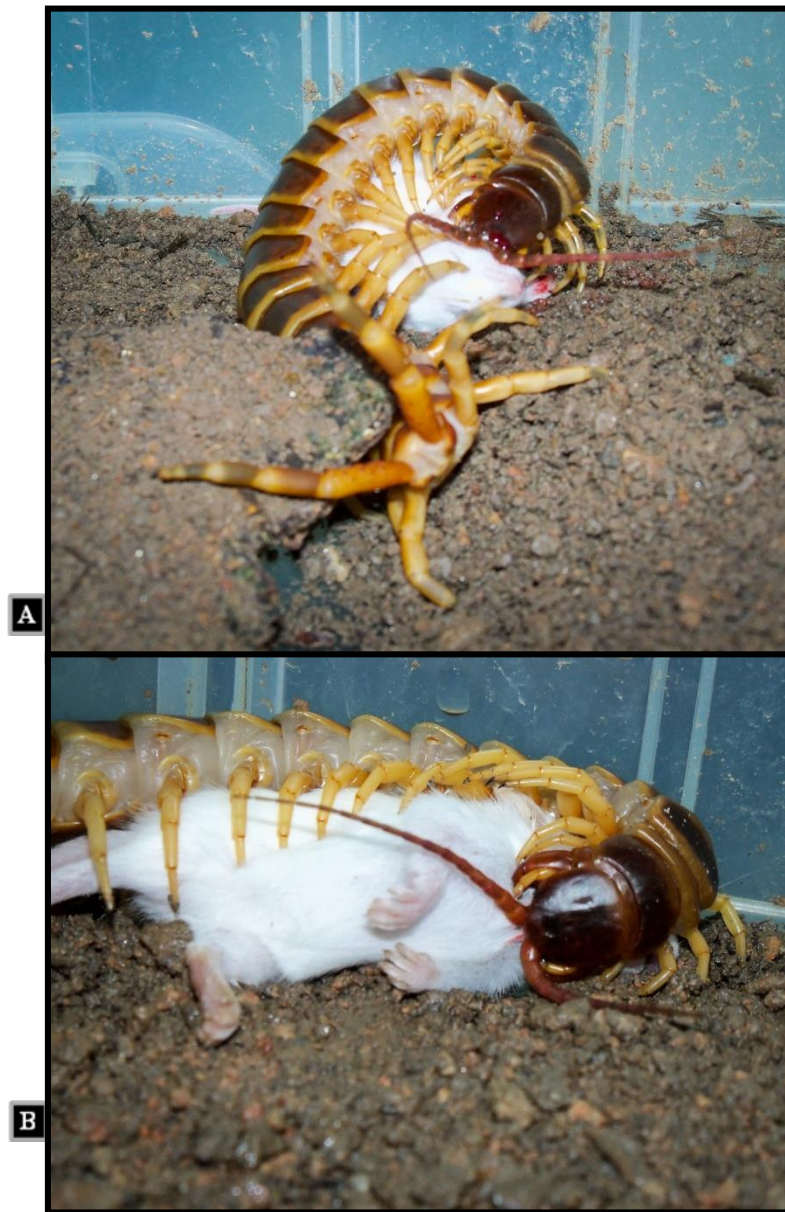


Figura A-6. Captura del ratón por parte de un ejemplar de *S. gigantea*. En ambas imágenes (A y B), se observa como el ciempiés se enrolla alrededor del cuerpo del ratón, mientras le inyecta el veneno con sus forcípulas, mientras procede a alimentarse de dicho roedor.



Figura A-7. Estimulación física de ejemplares de *S. gigantea* mediante pitillos para aumentar el volumen de veneno durante la extracción por electroestimulación.

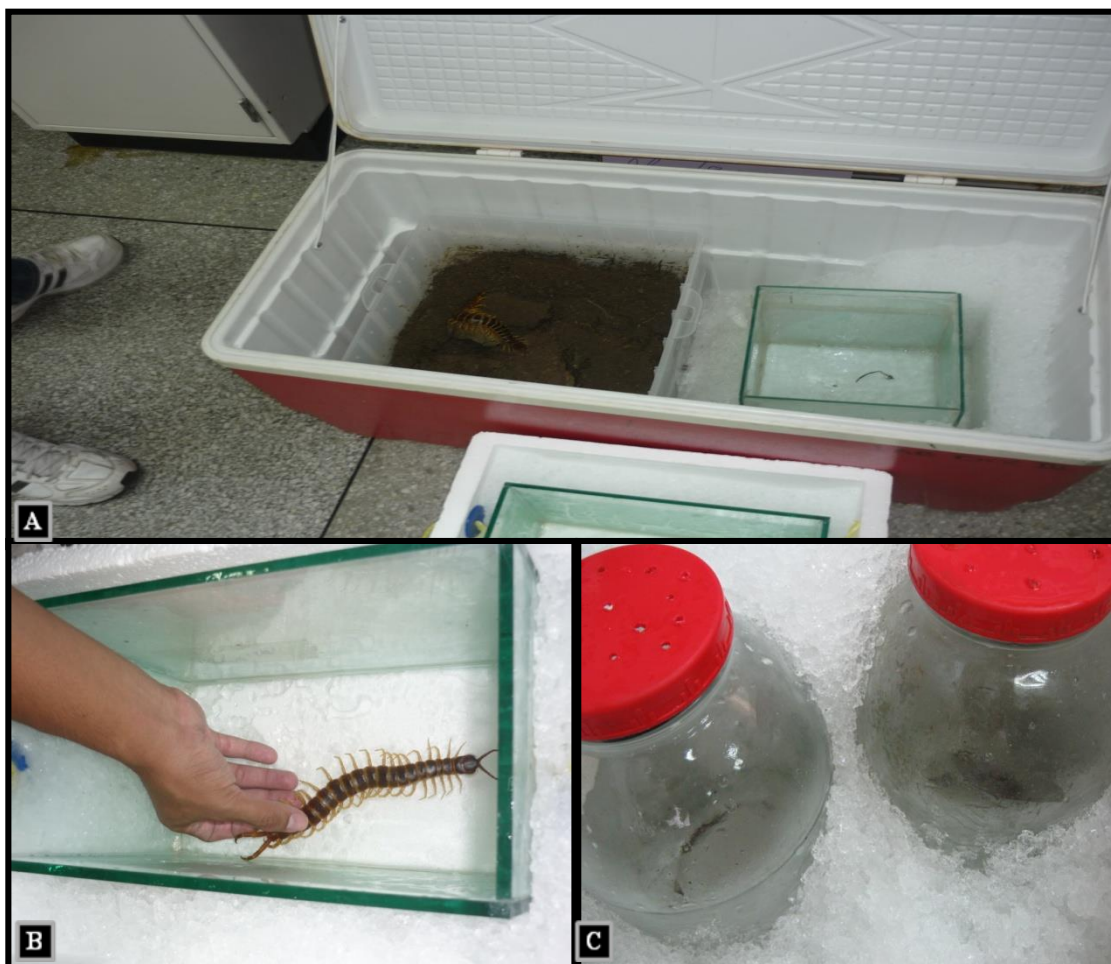


Figura A-8. Procedimiento de adormecimiento de ciempiés mediante frío. A) Con el uso de una cava, se procedió a llenarla con hielo, sumergiendo en ella los recipientes donde se dormirán los ejemplares de *S. gigantea* con el uso de hielo. Para ello se utilizaron dos recipientes, una pecera (B) y unos envases de vidrio con tapa (C), siendo estos últimos los más eficientes para dormir de forma rápida y segura a los ciempiés.



Figura A-9. Electroestimulación de la zona forcípular para la extracción de veneno de un ejemplar de *S. gigantea*. Se aplicó entre 80-100 mV a la forcípula, ya que allí se encuentran las glándulas productoras de veneno (zona donde se ubican os electrodos). La recolección del veneno se realizó con una micropipeta de 20-200 μ L.



Figura A-10. Determinación de la talla y el peso de ejemplares de *S. gigantea*. Durante todo el proceso de investigación, se tomaron tales datos para evidenciar el crecimiento de los ciempiés durante el tiempo en cautiverio. A) Medición de la talla de un ciempiés usando una regla como medida. B) Pesaje de un ejemplar de *S. gigantea* en una balanza analítica.

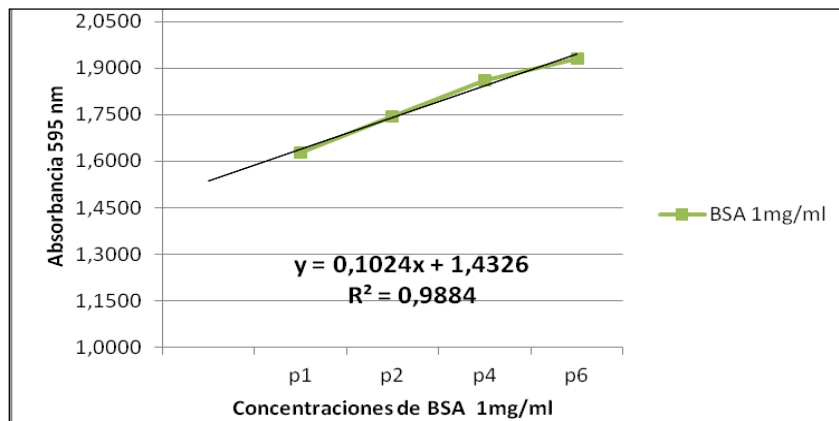


Figura A-11. Curva de calibración de Suero Albúmina Bovino (BSA) 1mg/ml para la reacción de Bradford, utilizada para determinar la concentración de proteínas en las soluciones de veneno.

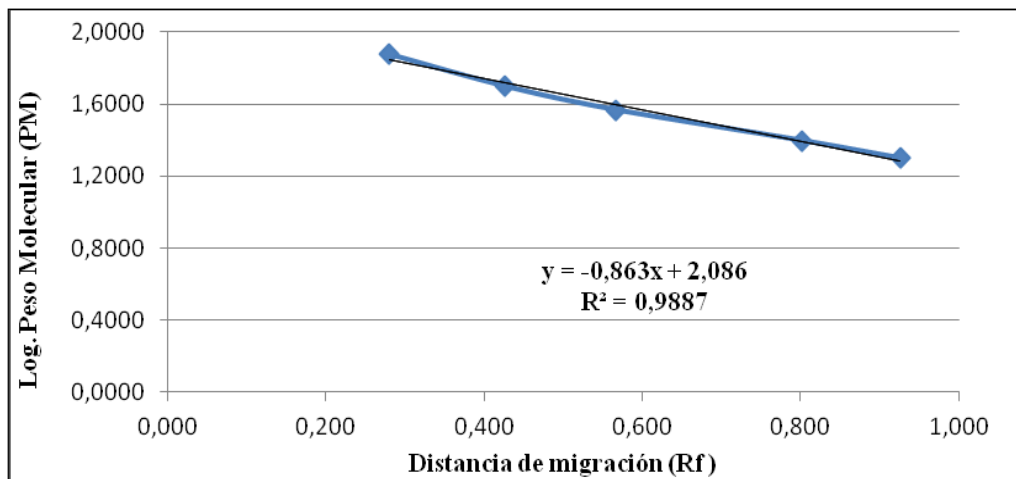


Figura A-12. Curva de calibración del Marcador de Peso Molecular utilizada para estimar los pesos moleculares del perfil proteico al 12% de acrilamida-bisacrilamida.

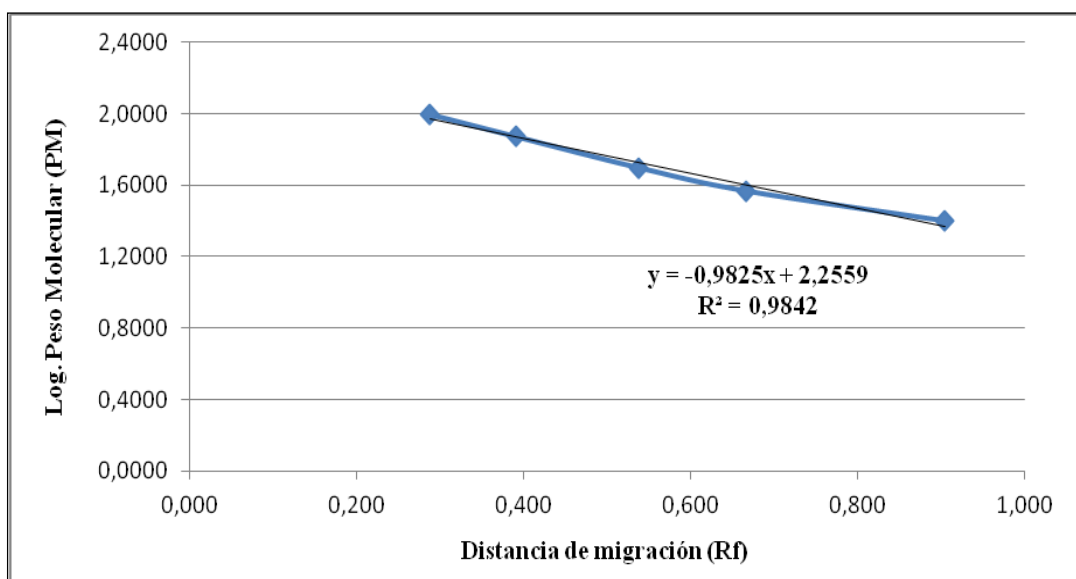


Figura A-13. Curva de calibración del marcador de peso molecular utilizada estimar los pesos moleculares del perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-16.5% de acrilamida-bisacrilamida para el veneno de *S. gigantea*.

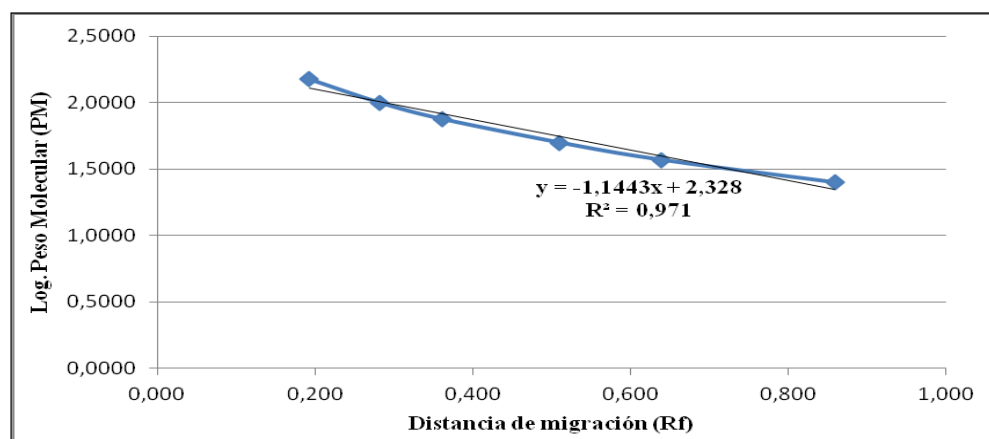


Figura A-14. Curva de calibración del Marcador de Peso Molecular utilizada para el perfil proteico en gradiente discontinuo al 8-14% de acrilamida-bisacrilamida.

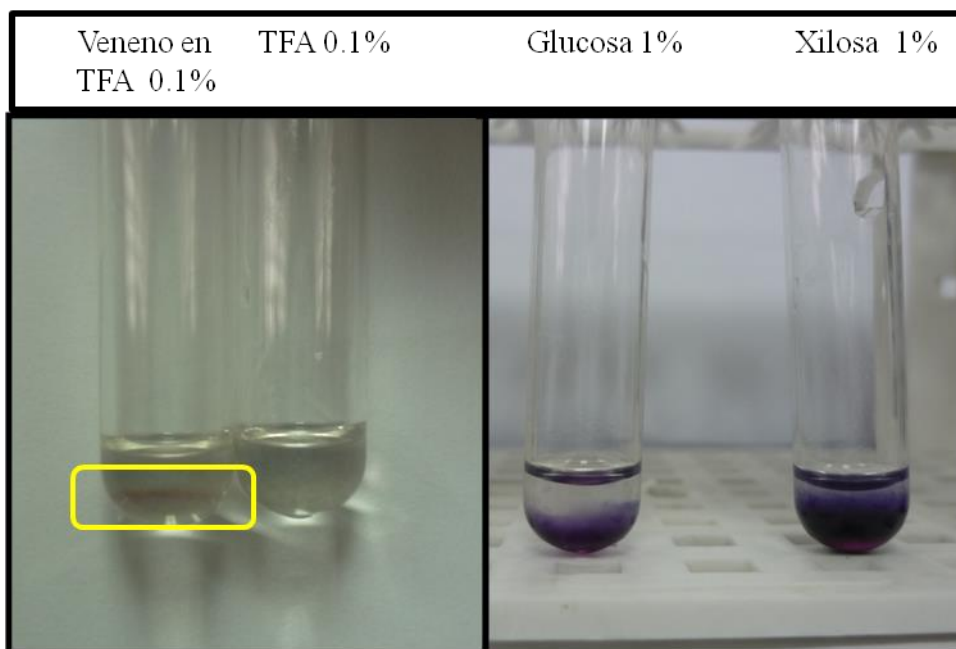


Figura A-15. Test de Molish para la presencia de carbohidratos en el veneno de *S. gigantea*. Se observa una delgada banda púrpura formando una interfase en la solución de veneno, indicando la presencia de azúcares. Se utilizó TFA 0.1% v/v como control negativo y glucosa 1% p/v y xilosa 1% p/v como controles positivos.

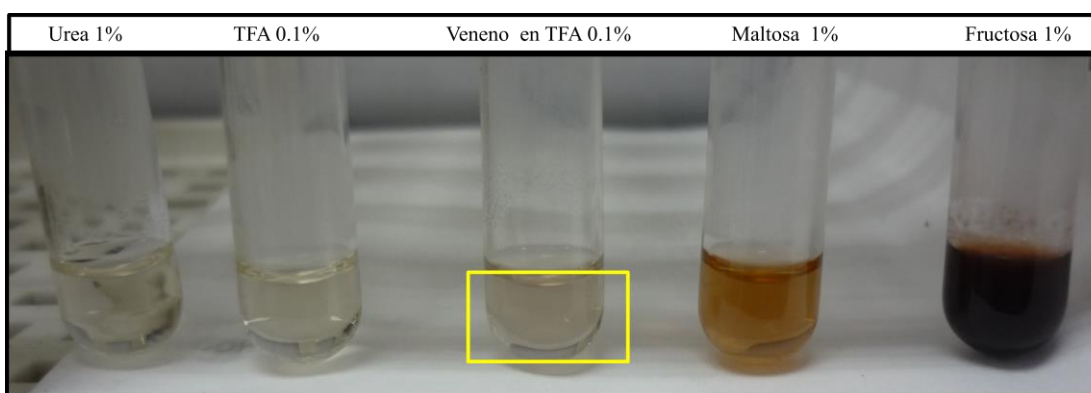


Figura A-16. Test de Selliwanof para evaluar la presencia de cetosas y aldosas. El veneno presentó una tenue coloración rojiza que define la presencia de cetosas. TFA 0.1% v/v y úrea 1% p/v se utilizaron como control negativo y maltosa 1% p/v y fructosa 1% p/v como controles positivos para cetosas.