

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN PÉPTIDO DEL VENENO DE *Tityus gonzalespongai* (SCORPIONES, BUTHIDAE) CON ACTIVIDAD SOBRE PROMASTIGOTES DE *Leishmania (Leishmania) mexicana*

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PEPTIDE FROM THE VENOM OF *Tityus gonzalespongai* (SCORPIONES, BUTHIDAE) WITH ACTIVITY AGAINST *Leishmania (Leishmania) mexicana* PROMASTIGOTES

ADOLFO BORGES¹, OLINDA DELGADO², SYLVIA SILVA², JOSÉ BRAVO³, ELENA VELASCO⁴, LUISA ROJAS DE ASTUDILLO^{3,5}, LEONARDO DE SOUSA⁶

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, ¹Instituto de Medicina Experimental, Laboratorio de Biología Molecular de Toxinas y Receptores, ²Instituto de Medicina Tropical, Sección de Inmunoparasitología, ⁴Escuela de Medicina José María Vargas, Caracas, Venezuela. Universidad de Oriente, ³Escuela de Ciencias, Departamento de Química, ⁵Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas Dra. Susan Tai, Cumaná, Venezuela, ⁶Núcleo de Anzoátegui, Escuela de Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos, Laboratorio de Toxinología, Puerto La Cruz, Venezuela
E-mail: borges.adolfo@gmail.com / leonardodesousa@yahoo.com

RESUMEN

Evidencias previas han demostrado que el veneno del escorpión venezolano, *Tityus discrepans* (Karsch), contiene péptidos con potente efecto leishmanicida, produciendo intensa vacuolización, aumento del volumen del bolsillo flagelar y muerte de promastigotes de *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Este trabajo evalúa la actividad leishmanicida de los venenos de diez especies de *Tityus*, representativas de áreas endémicas de escorpionismo en Venezuela: *T. breweri* (González-Sponga), *T. clathratus* (Koch), *T. discrepans* (Karsch), *T. falconensis* (González-Sponga), *T. gonzalespongai* (Quiroga *et al.*), *T. imei* (Borges *et al.*), *T. nororientalis* (González-Sponga), *T. perijanensis* (González-Sponga), *T. zulianus* (González-Sponga), *T. sanarensis* (González-Sponga) y del Brasil, *T. serrulatus* (Lutz & Mello). Se presenta además el aislamiento y la caracterización bioquímica del péptido HPLC-13, con actividad sobre promastigotes de *Leishmania (Leishmania) mexicana*, obtenido a partir del veneno de *T. gonzalespongai*, una de las especies ensayadas con mayor acción leishmanicida. Los componentes antiparasitarios presentes en estos venenos, una vez caracterizados, podrían servir como línea base para el diseño de estrategias especie-específicas de utilidad en el tratamiento de las diversas formas de leishmaniasis.

PALABRAS CLAVE: Leishmaniasis, actividad anti-*Leishmania*, escorpiones, farmacología de venenos, Venezuela.

ABSTRACT

Previous evidence has shown the presence in the venom of the Venezuelan scorpion, *Tityus discrepans* (Karsch), of potent antileishmanicidal peptides able to increase the intracellular vacuolar content and the flagellar pocket volume, and kill *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes. This work shows the differential leishmanicidal potency of ten scorpion venoms in the genus *Tityus* from representative endemic areas of scorpionism in Venezuela: *T. breweri* (González-Sponga), *T. clathratus* (Koch), *T. discrepans* (Karsch), *T. falconensis* (González-Sponga), *T. gonzalespongai* (Quiroga *et al.*), *T. imei* (Borges *et al.*), *T. nororientalis* (González-Sponga), *T. perijanensis* (González-Sponga), *T. zulianus* (González-Sponga), *T. sanarensis* (González-Sponga) and also the Brazilian species, *T. serrulatus* (Lutz & Mello). The study also shows the isolation and biochemical characterization of peptide HPLC-13, toxic on *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes from the highly leishmanicidal *T. gonzalespongai* venom. The presence of leishmanicidal components in Venezuelan scorpion venoms could provide a framework for the design of species-specific strategies for the treatment of various forms of leishmaniasis.

KEY WORDS: Leishmaniasis, anti-*Leishmania* activity, scorpions, pharmacology of venoms, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

A pesar de la importancia epidemiológica de las leishmaniasis, de las diferencias en susceptibilidad *in vivo* e *in vitro* de las especies parasitarias al tratamiento con fármacos convencionales que producen, por otra parte, graves efectos secundarios, y del fenómeno de la resistencia parasitaria señalada para los antimoniales pentavalentes (Faraut-Gambarelli *et al.* 1997), hasta el presente no existen estrategias efectivas diseñadas para una terapia especie-específica o para el abordaje

integral de estas enfermedades. Sin embargo, pese a la existencia de drogas alternativas, como el isetionato de pentamidina, la anfotericina B y la miltefosina (Sundar *et al.* 1998, Herwaldt 1999), existe una necesidad real para el desarrollo de nuevas y mejores drogas con novedosos mecanismos de acción en donde se minimicen los efectos sobre el ser humano.

En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos menos tóxicos y más específicos para el tratamiento de las leishmaniasis, los denominados compuestos

leishmanicidas naturales, derivados de venenos de algunas especies animales, surgen como una opción importante que merece ser investigada. Así por ejemplo, el veneno crudo de la serpiente *Bothrops moojeni* ha demostrado un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Leishmania* spp. en asociación con el peróxido de hidrógeno generado a partir de la actividad de la enzima L-amino ácido oxidasa (Tempone *et al.* 2001) o de fracciones proteicas de su veneno, sobre promastigotes de *L. amazonensis*, obtenidas por cromatografía de intercambio iónico (Castilhos *et al.* 2011). Igualmente, se ha comprobado el efecto inhibitorio del veneno de serpientes de los géneros *Cerastes* y *Vipera* sobre *L. infantum* (Fernández-Gómez *et al.* 1994), del veneno de tres especies de *Crotalus durissus* (*C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* y *C. d. collilineatus*) sobre *L. (L.) amazonensis* (Passero *et al.* 2007) y actividad leishmanicida *in vitro* e *in vivo* del veneno de *Bungarus caeruleus* sobre *L. donovani* (Bhattacharya *et al.* 2013). Se ha descrito el efecto letal sobre *L. major* por una proteína producida por *Bacillus thuringiensis* (El-Sadaway *et al.* 2008). Los venenos de varios vipéridos de Costa Rica (*Bothrops asper*, *Botriechis schlegelii*, *C. d. durissus*, *Atropoides numnifer* y *A. picadoi*) poseen acción tripanocida sobre formas epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, otro parásito del orden Kinetoplastida (Trypanosomatidae) (Castillo-Vigil *et al.* 2008).

Existen evidencias que documentan la toxicidad ejercida por proteínas y péptidos derivados del veneno de artrópodos sobre diversos grupos animales, con una elevada especificidad filética (Kuhn-Nentwig 2003). En vista que diversas especies de *Leishmania* han resultado sensibles al efecto de compuestos bloqueadores de canales iónicos presentes en tejidos de mamífero, tales como la glibenclamida (antagonista del canal de potasio dependiente de ATP), la amilorida (activa sobre la subunidad beta del canal de sodio epitelial) y la aminopiridina (antagonista de amplio espectro de los canales de potasio voltaje-dependientes) (Ponte Sucre *et al.* 1998), así como también ante algunos péptidos antimicrobianos procedentes de mamíferos e invertebrados (Hernández *et al.* 1992, Chicharro *et al.* 2001, Bera *et al.* 2003), es posible que existan proteínas/péptidos derivados de estos venenos que posean especificidad hacia este grupo de parásitos. En este sentido, resulta de interés la evaluación de la actividad antiparasitaria de péptidos con masas moleculares entre 3 y 8 kDa presentes en los venenos de escorpión, ya que éstos han demostrado ser agonistas y antagonistas específicos de varios canales iónicos de vertebrados, insectos y crustáceos (Possani *et al.* 1999, Tytgat *et al.* 1999), entre los cuales podrían hallarse componentes con

tropismo hacia los tripanosomatídeos.

Evidencias funcionales (Ogbunude *et al.* 1993, Bera *et al.* 2003) y genómicas (Real *et al.* 2013) sugieren la existencia de estas vías de paso iónico en *Leishmania*, e igualmente en *Trypanosoma* (Ruben *et al.* 1996). Al mismo tiempo, el estudio de la actividad leishmanicida de estos venenos también debe incluir a aquellos componentes peptídicos con masas moleculares menores a 3 kDa, los cuales exhiben actividad microbicida y antifúngica (Corzo *et al.* 2001). Dada la similitud, en términos de la composición lipídica, entre las membranas de parásitos tripanosomatídeos y hongos (Lorente *et al.* 2004), es posible que existan componentes del veneno que interactúen de manera selectiva con la bicapa fosfolipídica de las diferentes especies de *Leishmania* y/o *Trypanosoma*. La cooperatividad entre estos dos grupos de componentes (los activos sobre canales iónicos y los componentes microbicidas/fungicidas) debe ser igualmente explorada, en vista de la existencia de sinergismo en el caso de su efecto sobre insectos (Corzo *et al.* 2002). Borges *et al.* (2006a) han caracterizado la actividad leishmanicida del veneno del escorpión venezolano *T. discrepans*, especie endémica del centro-norte del país. Ese estudio indicó la presencia de componentes proteicos que reducen significativamente la viabilidad de *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* y, en menor grado, de *L. (L.) infantum*, en concentraciones que no afectan de manera evidente cultivos celulares de mamíferos, tales como las células PC12 (feocromocitoma de rata) o de cordón umbilical humano (Borges *et al.* 2006a). El propósito de este trabajo fue evaluar la actividad leishmanicida mediante la viabilidad de promastigotes de *L. (L.) mexicana* incubados con el veneno de otros escorpiones del género *Tityus* distintos a *T. discrepans*, y aislar los componentes activos presentes en el veneno con mayor actividad leishmanicida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidades de captura y obtención del veneno

Los escorpiones adultos del género *Tityus* fueron capturados en las siguientes localidades (Fig. 1): 1. *T. zulianus* (Santa Cruz de Mora, estado Mérida; 8°22'N, 71°43'W), 2. *T. perijanensis* (Río Cachiri, Zulia; 10°50'N, 72°18'W), 3. *T. imei* (Biscucuy, Portuguesa; 9°21'N, 69°55'W), 4. *T. falconensis*, población A (San Luis, Falcón; 11°06'N, 69°42'W), 5. *T. falconensis*, población B (Jacura, Falcón; 11°40'N, 68°50'W), 6. *T. sanarensis* (Sanare, Lara; 09°45'N, 69°20'W), 7. *T. discrepans* (San Antonio de Los Altos, Miranda; 10°20'N, 67°45'W), 8.

T. clathratus (El Hatillo, Miranda; 10°25'N, 66°49'W), 9. *T. gonzalespongai* (La Piedra de Mundo Nuevo, Anzoátegui; 10°00'N, 64°22'W), 10. *T. nororientalis*, población AL (Alto Llano, Anzoátegui; 10°07'N, 64°29'W), 11 *T. nororientalis*, población CA (Caripe, Monagas; 10°14'N, 63°32'W), 12. *T. breweri* (Isla de Anacoco, Bolívar; 6°45'N, 61°10'W).

La captura de los escorpiones, excepto para *T. discrepans* y *T. serrulatus* (especie de Brasil), se realizó por senderos que conducen a plantaciones de café (*Coffea arabica* L., Rubiaceae), cacao (*Theobroma cacao* L., Malvaceae) o tubérculos (*Colocasia esculenta* (L.) Schott, Araceae), en horario nocturno (entre las 19,00 y 02,00 horas), utilizando lámparas portátiles de luz ultravioleta. Su clasificación se realizó de acuerdo con González-Sponga (1996a,b, 1997), Quiroga *et al.* (2004) o Borges *et al.* (2006b).

Los especímenes fueron trasladados vivos al Instituto de Medicina Experimental (UCV) o al Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos (UDO), con el fin de extraer su veneno por el método manual siguiendo la metodología establecida en Shulov y Zlotkin (1969). El veneno de la especie *T. serrulatus* (Brasil) fue donado por el Dr. Marcelo R. Diniz, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Los venenos crudos fueron resuspendidos en 1 mL de agua bidestilada y agitado en Vortex (Super-MixerR), consecutivamente, se centrifugaron a 14.000 rpm (Labnet, modelo Z180M) por 20 minutos. Luego, la fracción soluble de cada veneno fue transferida a tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad y preservada en refrigeración a -20°C, hasta el momento de su utilización. Se descartó el sedimento de cada veneno conteniendo detritos celulares y moco (De Sousa *et al.* 2009, 2010).



Figura 1. Distribución geográfica de las diez especies del género *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) empleadas en este estudio. Las poblaciones de *Tityus falconensis* (A y B) corresponden a zonas geográficamente aisladas del centro y noreste del Macizo Coriano; las poblaciones de *Tityus nororientalis* AL y CA corresponden respectivamente a Alto Llano (Anzoátegui) y Caripe (Monagas). La distribución correspondiente a la especie brasileña *Tityus serrulatus* es indicada en Borges *et al.* (2008).

Cuantificación de la cantidad de proteínas en los venenos de *Tityus*

Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble de cada veneno (obtenida por centrifugación). Cuando fue necesario se efectuó dilución 1/20 del veneno crudo en agua desionizada, y se determinó su concentración de proteínas mediante el

método de Lowry *et al.* (1951).

La concentración de proteínas en las muestras de veneno se determinó mediante comparación con una curva de calibración, simultáneamente elaborada mediante diluciones seriadas de un patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemicals) de 0,5 mg/mL. Las muestras del veneno y sus diluciones se liofilizaron

(Liofilizador Labconco) y almacenaron a -20°C , hasta su uso en las pruebas de actividad biológica.

Evaluación de la toxicidad de los péptidos de los venenos de *Tityus* sobre promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*

Se ensayaron los venenos crudos de *Tityus* en el crecimiento de promastigotes de *L. (L.) mexicana* (cepa MHOM/BZ/82/BEL21). Los parásitos se mantuvieron a 26°C , cultivados en medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) (Laboratorios Difco, Detroit MI) por 4 días. Se utilizaron los promastigotes para la determinación de la actividad sobre el parásito. La actividad del veneno sobre promastigotes se evaluó empleando cultivos en fase logarítmica de crecimiento exponencial (500.000 parásitos). Las células se resuspendieron en 200 μL de NaCl 0,85% (m/V) en presencia de 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada veneno por triplicado, colocados en placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Becton Dickinson, New Jersey, USA) durante 1 h a 26°C . La viabilidad del parásito se evaluó mediante tinción con azul de tripano (0,4% (m/V) en solución salina). Este colorante tiñe exclusivamente células muertas o en proceso de necrosis.

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

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

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

Las fracciones proteicas se agruparon según el perfil del cromatograma. Cada fracción fue liofilizada y posteriormente rehidratada para evaluar su actividad leishmanicida, de acuerdo con el método de Borges *et al.* (2006a). La concentración de proteínas de cada fracción a ensayar se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951).

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

Una vez identificadas las fracciones derivadas de la exclusión molecular con actividad leishmanicida, se procedió a purificar las proteínas bioactivas mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC) en fase reversa, empleando para ello un cromatógrafo Waters con un detector 996 de arreglo de diodos y utilizando una columna analítica C18 Vydac® de fase reversa.

La cromatografía se efectuó aplicando un gradiente lineal, con el uso de las siguientes soluciones: solvente A = ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en agua; B = 100% acetonitrilo preparado en 0,1% TFA. El gradiente fue el siguiente: 0-10% B (5 min), 10-90% B (110 min), 90-100% B (5 min), 100-0% B (5 min). La corrida se realizó a temperatura ambiente con flujo de 0,4 mL/min y presión aproximada de 528 psi.

La detección de los componentes proteicos aislados se realizó mediante lectura espectrofotométrica con sistema de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 232 nm. Las fracciones obtenidas fueron liofilizadas y almacenadas a -20°C hasta el momento de evaluar su actividad leishmanicida, en cuya oportunidad se empleó por fracción 1 mg de proteína en cada ensayo.

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

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes fue realizada según el método de Laemmli (1970). Las muestras se desnaturizaron mediante la aplicación de calor en presencia de beta-mercaptoetanol a alícuotas de cada fracción o del veneno crudo; a continuación fueron colocadas en los pozos del gel de apilamiento de poliacrilamida, para luego realizar la corrida a corriente constante en gel de resolución de poliacrilamida al 15,0% usando solución amortiguadora de corrida compuesta de solución de tris-glicina-dodecil sulfato de sodio.

Al finalizar la corrida, los geles fueron inmediatamente revelados por el método de tinción con plata, el cual consistió en lavar por 20 min el gel para luego sumergirlo en una solución de AgNO_3 12 mmol/L por 30 min, siendo lavado posteriormente con agua bidestilada; finalmente la reducción se efectuó por 6 min con solución de

NaOH 0,75 mol/L en formaldehído al 0,76% deteniendo el revelado con solución de ácido acético al 5%. Finalmente, se registraron digitalmente los geles para su interpretación.

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

A fin de mejorar la resolución de los componentes proteicos catiónicos de similar masa molecular pero que difieren en carga, presentes en las fracciones bioactivas derivadas de HPLC, se realizaron corridas electroforéticas en presencia de urea y ácido acético de acuerdo al método de Wang *et al.* (1997). Con este propósito se elaboraron geles al 12,5% de acrilamida en presencia de 5 mol/L urea y ácido acético al 5% (V/V). La solución de corrida electroforética fue 5% ácido acético (V/V). Las muestras fueron disueltas en una solución compuesta de 5% (V/V) ácido acético, 3 mol/L urea y el colorante pironina "Y" como indicador de la migración electroforética. Luego de efectuada la separación los geles fueron teñidos con tinción de plata indicado en la sección precedente para las electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

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

La fracción HPLC-13 fue analizada mediante la técnica de desorción/ionización en matriz inducida por láser con detección por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) ("Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry") en un espectrofotómetro de masa marca Biflex III (Bruker, FRG), operado por el Dr. Huub Op den Camp, Departamento de Microbiología, Radboud University Nijmegen, Holanda. Para este fin se utilizó 1 µg de la fracción HPLC-13, que luego fue resuspendida en 100 µL de agua MilliQ y diluidas en un volumen de 1/10 con 0,1% (V/V) de ácido trifluoroacético (TFA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fauna de escorpiones pertenecientes al género *Tityus* que habita el territorio venezolano es la más diversa de América del Sur (De Sousa *et al.* 2000, Borges y De Sousa 2006, Rojas-Runjaic y De Sousa 2007, Rojas-Runjaic y Becerra, 2008) desde el punto de vista taxonómico (Borges *et al.* 2010a). Desde una perspectiva toxinológica, los venenos locales también muestran amplia variabilidad interespecífica (Borges y De Sousa 2006, Borges *et al.* 2008, De Sousa *et al.*

2010). En vista que los venenos de escorpión contienen entre 100 y 200 componentes farmacológicamente distinguibles (Posanni *et al.* 1999), se decidió realizar un sondeo de la actividad leishmanicida de los venenos de escorpiones más representativos de las áreas montañosas de Venezuela, para luego proceder al aislamiento y caracterización de los componentes responsables de la actividad a partir de extractos crudos.

Actividad leishmanicida de los venenos de diez especies de escorpiones venezolanos de *Tityus* sobre la viabilidad celular de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*

La Figura 1 muestra la procedencia geográfica de las especies recolectadas para este estudio: *T. perijanensis* (Sierra de Perijá), *T. zulianus* (Cordillera de Mérida), *T. sanarensis* y *T. imei* (Serranía de Portuguesa), *T. falconensis* (dos poblaciones en el centro y noreste del Macizo Coriano, respectivamente), *T. clathratus* y *T. discrepans* (Cordillera de La Costa central), *T. gonzalespongai* y *T. nororientalis* (Macizo del Turimiquire, región nororiental) y *T. breweri* (Macizo Guayanés). Todas estas especies contienen componentes de baja masa molecular en el proteoma de sus glándulas de veneno (Borges y De Sousa 2006), los cuales podrían contener moléculas con actividad leishmanicida (Borges *et al.* 2006a).

Se enfrentaron promastigotes de *L. (L.) mexicana* (la especie más sensible al veneno de *T. discrepans*) (Borges *et al.* 2006a) a doce venenos obtenidos de diez especies de *Tityus* venezolanos (Fig. 1), ensayados a una dosis de 35 µg/mL, concentración que fue capaz de inducir cambios estructurales en promastigotes de varias especies de *Leishmania* expuestas al veneno de *T. discrepans*, incluyendo vacuolización y aumento del volumen celular, acompañados de movilidad flagelar alterada (Borges *et al.* (2006a). Adicionalmente, se incluyó el veneno de la especie brasileña *T. serrulatus*, considerado como el escorpión de mayor importancia médica en América del Sur (Borges y De Sousa 2006).

La Figura 2 muestra los resultados de la evaluación de la potencia leishmanicida de los venenos ensayados, lo que permitió reunirlos de acuerdo al porcentaje de mortalidad observado en *L. (L.) mexicana*: actividad elevada (> 80% de mortalidad), actividad intermedia (40-80% de mortalidad) y actividad baja (< 40%). Tres de los venenos evaluados exhibieron la mayor actividad antiparasitaria: *T. discrepans* (confirmando los resultados previamente obtenidos por Borges *et*

al. (2006a), *T. gonzalespongai* (especie endémica del nororiente venezolano cuya área de distribución está restringida al Macizo de Bergantín, Serranía del Turimiquere en el estado Anzoátegui [Quiroga *et al.* 2004]) y *T. perijanensis* (especie endémica de la Sierra de Perijá, estado Zulia [González-Sponga 1994]). Para estos tres venenos la prolongación de la incubación a 2 h incrementó la mortalidad de promastigotes. De todos los venenos ensayados, el de *T. breweri* (sureste del estado Bolívar [González-Sponga 1997, Borges *et al.* 2010b]) fue el único cuya incubación por 2 h produjo una mortalidad significativamente superior a la de 1 h. Esta observación está siendo objeto de investigaciones a fin de determinar si las propiedades de los componentes

leishmanicidas en este veneno difieren con respecto al resto de los *Tityus* venezolanos. Con base en estos resultados se concluye que el efecto leishmanicida de los venenos de escorpiones es, al parecer, especie-específico. Por otra parte, los venenos venezolanos exhiben una mayor potencia que el veneno de la especie brasileña *T. serrulatus*, de gran importancia médica y amplia distribución en el sureste del Brasil. No existe correspondencia entre la actividad sobre vertebrados de estos venenos y su actividad leishmanicida ya que algunos de los venenos más letales sobre humanos (por ejemplo, *T. zulianus* y *T. serrulatus*) presentaron actividad antiparasitaria intermedia o baja.

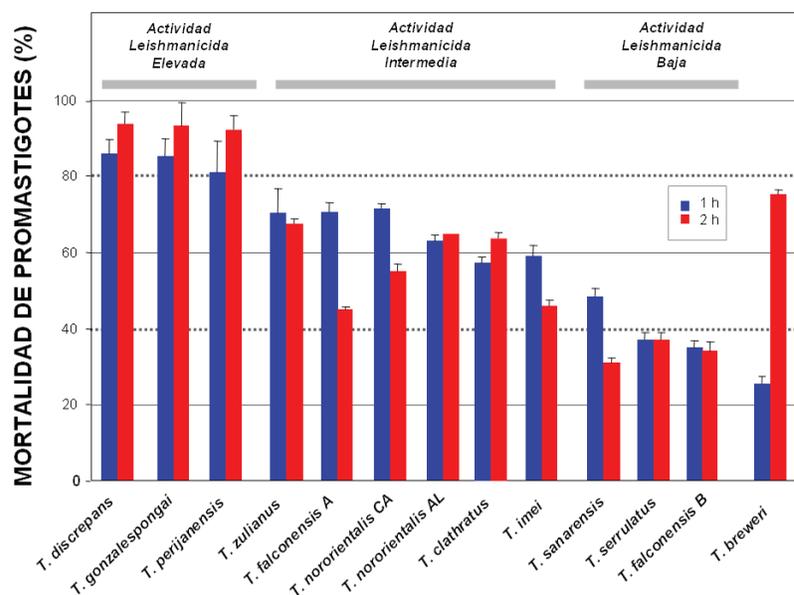


Figura 2. Actividad leishmanicida (anti-*Leishmania* (*L.*) *mexicana*) diferencial de doce venenos provenientes de especies y de poblaciones de especies del género *Tityus* en Venezuela, incluyendo la especie brasileña *Tityus serrulatus*. Promastigotes de *L. (L.) mexicana* fueron incubados (500.000 células/200 μ L) durante 1 h y 2 h con 35 μ g/mL de proteínas de veneno de las especies listadas y la mortalidad determinada por exclusión con azul de tripano. La actividad leishmanicida se expresa como el porcentaje de mortalidad de los promastigotes incubados calculado con respecto al total de células incubadas. La potencia anti-*Leishmania* de los venenos se clasificó en tres categorías: Actividad elevada (> 80% mortalidad), actividad intermedia (40-80% mortalidad) y actividad baja (< 40%). Las barras del histograma corresponden al valor promedio obtenido a partir de tres experimentos independientes \pm error estándar de la media.

Efectos estructurales y ultraestructurales sobre promastigotes de *Leishmania* (*L.*) *mexicana* de los venenos y fracciones con actividad leishmanicida

En vista de la disponibilidad de veneno y de la potencia antiparasitaria del veneno de *T. gonzalespongai* se decidió aislar y caracterizar los componentes con actividad leishmanicida presentes en este veneno. Debe añadirse que su efecto leishmanicida fue significativamente superior para *L. (L.) mexicana* (mortalidad $84,0 \pm 4,36\%$), seguido por *L. braziliensis* ($69,0 \pm 7,0\%$) y *L. infantum* ($12,0 \pm 1,0\%$). El efecto antiparasitario de este veneno sobre *T. cruzi* fue apenas detectable ($6,33$

$\pm 1,53\%$). En primer lugar, se evaluaron los efectos del veneno de *T. gonzalespongai*, en comparación con *T. discrepans* ensayado a la misma dosis, a nivel estructural y ultraestructural. Promastigotes de *L. (L.) mexicana* fueron expuestos a 35 μ g/mL de veneno por 1 h. En la Figura 3 se observan fotografías representativas del daño estructural producido por el veneno de *T. gonzalespongai* y de *T. discrepans*. Ambos venenos produjeron colapso de la morfología del parásito, con vacuolización y pérdida de la estructura del flagelo. La Figura 4 ilustra los efectos del veneno de *T. gonzalespongai* a nivel ultraestructural, obtenidos mediante microscopía electrónica de transmisión.

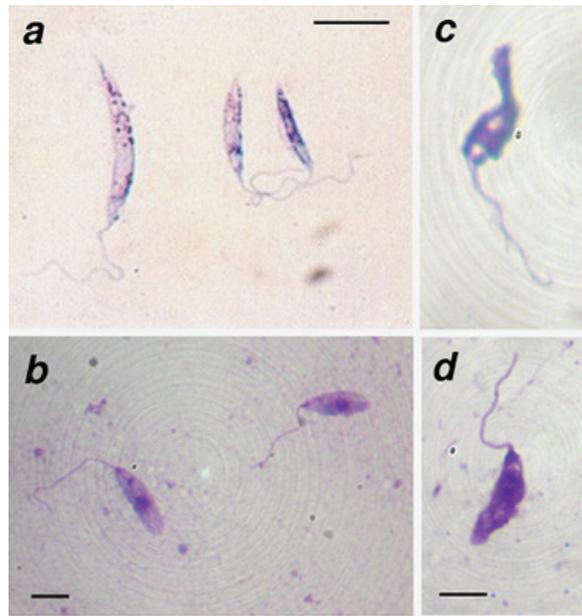


Figura 3. Efectos estructurales en promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana* incubados con los venenos de *Tityus discrepans* y *Tityus gonzalespongai* (1 h, 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (a,b) Promastigotes incubados en solución salina isotónica. (c) Promastigotes incubados con veneno de *Tityus gonzalespongai* (d) Promastigotes incubados con veneno de *Tityus discrepans*. Las barras corresponden en todos los casos a 1 μm (c = d). Tinción con azul de tripano.

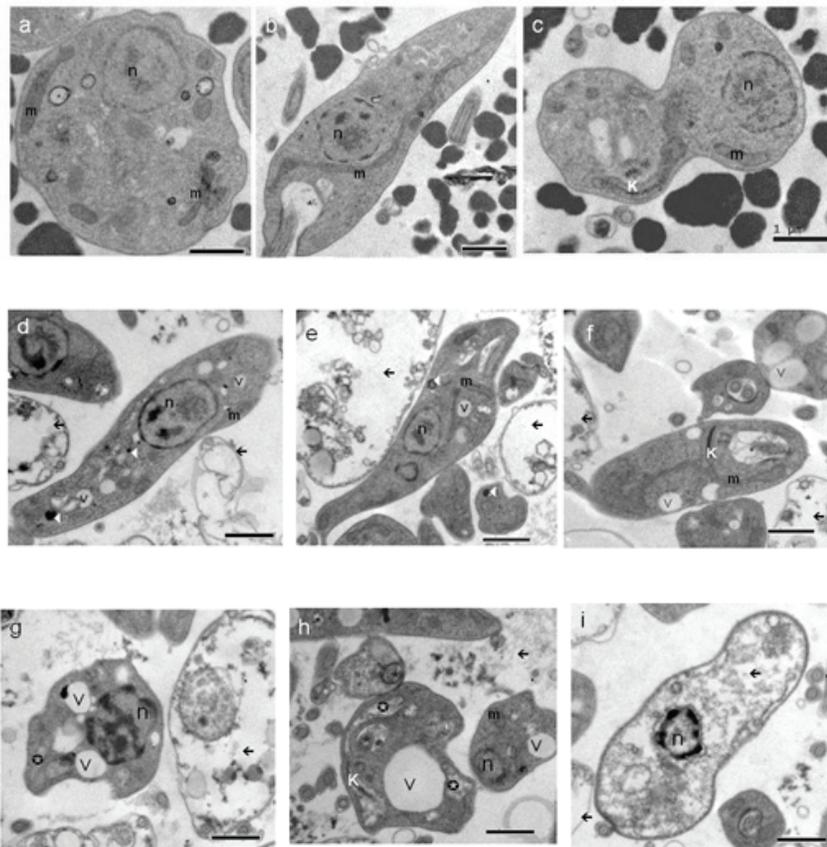


Figura 4. Daño ultraestructural producido por el veneno de *Tityus gonzalespongai* sobre promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*. (a-c) Micrografías de promastigotes expuestos a solución salina isotónica. Núcleo (n), mitocondria (m), bolsillo flagelar (*), kinetoplasto (k). (d-i) Promastigotes expuestos al veneno (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 h). Vacuolas fagosómicas (v), cuerpos electron-densos (v, cabeza de flecha), bolsillo flagelar con volumen aumentado (*), mitocondria (m). Se observan abundantes restos de parásitos (\leftarrow). Barra, 1 μm .

La galería de microfotografías mostradas en los paneles a-c (Fig. 4) muestra promastigotes de *L. (L.) mexicana* incubados con solución salina isotónica mientras que la galería de imágenes d-i ilustra parásitos expuestos al veneno (1 h, 35 µg/mL). El efecto más evidente en los parásitos aún intactos fue la aparición de vacuolas, similar al efecto del veneno de *T. discrepans* (Borges *et al.* 2006a), junto con la pérdida de organización interna de la mitocondria y picnosis (condensación) del núcleo (alteraciones características de células sujetas a proceso de necrosis) y aumento en el volumen del bolsillo flagelar. La presencia de vacuolas autofágicas en *Leishmania* sp. es una característica común hallada en el efecto de péptidos antimicrobianos e igualmente observada en el caso de la incubación con el veneno de *T. discrepans* (Borges *et al.* 2006a). A diferencia de éste último, en las microfotografías correspondientes a *T. gonzalespongai* hay numerosos restos de parásitos, lo que indica lisis celular a la concentración ensayada, efecto no observado con el veneno de *T. discrepans*. Comprobados los efectos estructurales y ultraestructurales sobre promastigotes, se procedió con el aislamiento del o los componentes activos presentes en el veneno de *T. gonzalespongai*.

Acción leishmanicida de fracciones cromatográficas derivadas del veneno de *Tityus gonzalespongai* sobre promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*.

La caracterización de los componentes leishmanicidas de *T. gonzalespongai* consistió en el fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión molecular del veneno total, el cual produjo, mediante elución en columnas de Sephadex G-50, tres fracciones que fueron liofilizadas y luego resuspendidas para el ensayo de su potencia leishmanicida, según se ilustra en la Figura 5. La fracción TgIII, la cual contiene los componentes de más baja masa molecular del veneno, fue la más activa de las tres fracciones ensayadas sobre promastigotes de *L. (L.) mexicana*.

Componentes activos con actividad leishmanicida obtenidos por HPLC

La fracción más activa (TgIII), obtenida a través de exclusión molecular, fue sometida a fraccionamiento ulterior mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC) en fase reversa. La Figura 6 presenta el perfil de elución obtenido en una columna C18 (Vydac) sometida a las condiciones cromatográficas descritas en la metodología. De las diez y seis fracciones obtenidas y ensayadas, las más activas sobre la viabilidad de promastigotes fueron aquellas que eluyeron hacia el final

del perfil de elución y que por lo tanto corresponden a los péptidos más hidrofóbicos presentes en la fracción TgIII. El panel B de la Figura 6 muestra la actividad leishmanicida (por µg de proteína) luego de la incubación de promastigotes de *L. (L.) mexicana* con las diferentes fracciones eluidas. Los componentes más activos fueron las fracciones 13 y 14 con 100% y 80% de mortalidad luego de una hora de incubación. Si se toma en consideración que estos valores se obtuvieron tras la incubación con 1 µg de proteína respectivamente, ello es indicativo de una potenciación de siete veces con respecto al veneno crudo de *T. gonzalespongai*.

Teniendo en cuenta que las fracciones 13 y 14 obtenidas por HPLC corresponden a componentes minoritarios del veneno de *T. gonzalespongai*, se decidió postergar la determinación de su toxicidad hacia células de mamíferos hasta cuando se disponga de suficiente material y una vez caracterizada su DE₅₀ (dosis efectiva 50% sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes de *L. (L.) mexicana*) y su secuencia N-terminal.

Caracterización química de componentes leishmanicidas del veneno de *Tityus gonzalespongai* mediante espectrometría de masas

La Figura 7 contiene los resultados de la caracterización electroforética y por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF del componente denominado HPLC-13, el cual eluye con un tiempo de retención de 75 min en columnas de fase reversa tipo C18 sometidas al gradiente de acetonitrilo-TFA indicado en la leyenda de la Figura 6.

En vista que los péptidos que componen los venenos de *Tityus* son fundamentalmente de naturaleza catiónica, se sometió el componente HPLC-13 a electroforesis en presencia de ácido acético y urea en geles de poliácridamida al 15% para evaluar su composición, resultando en una banda única. El espectro de masas por MALDI-TOF rindió un componente predominante con una masa molecular de 6.880,97 Da. Para el componente leishmanicida HPLC-14 la masa resultó 7.068,29 Da. Ambos constituyentes representaron, respectivamente, el 2,8% y 4,9% del total del material eluido en las columnas de fase reversa a partir de la fracción TgIII. Con esta información se tiene la confianza que el método de HPLC en fase reversa permitió la obtención de componentes leishmanicidas de alta pureza. La siguiente fase consistiría en la determinación de su secuencia aminoacídica N-terminal con el fin de proceder a su clonamiento y caracterización funcional, mediante métodos moleculares y fisiológicos, respectivamente.

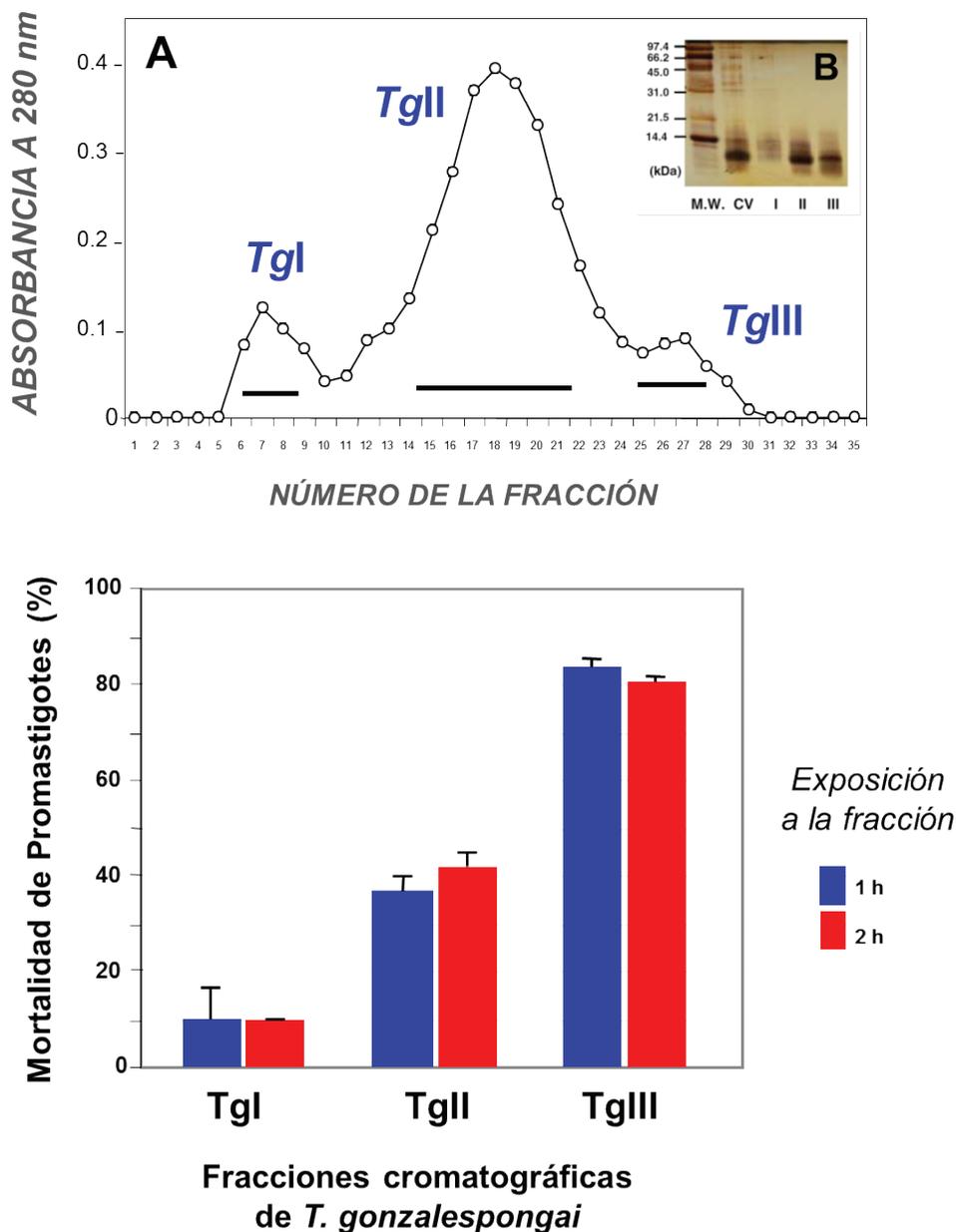


Figura 5. Fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión molecular del veneno de *Tityus gonzalespongai* y ensayo de la actividad leishmanicida de las fracciones obtenidas. (A) Filtración molecular. Las fracciones fueron reunidas en tres "pools" según indican las barras horizontales. TgI (presentó un rendimiento de 9,76%), TgII (78,8%) y TgIII (6,30%). Las proteínas de TgIII poseen masa molecular inferior a $14,4 \times 10^3$ g/mol. (B) Electroforesis en presencia de SDS (gel de poliacrilamida al 15%) para muestras conteniendo 30 μ g de proteínas de cada "pool". (C) Actividad leishmanicida de las fracciones cromatográficas. Promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana* fueron incubados durante 1 h con 35 μ g/mL de proteínas de los "pools" cromatográficos indicados. La actividad leishmanicida se expresa como el porcentaje de mortalidad de los promastigotes incubados calculado con respecto al total de células incubadas. Las barras del histograma corresponden al valor promedio obtenido a partir de tres experimentos independientes \pm error estándar de la media.

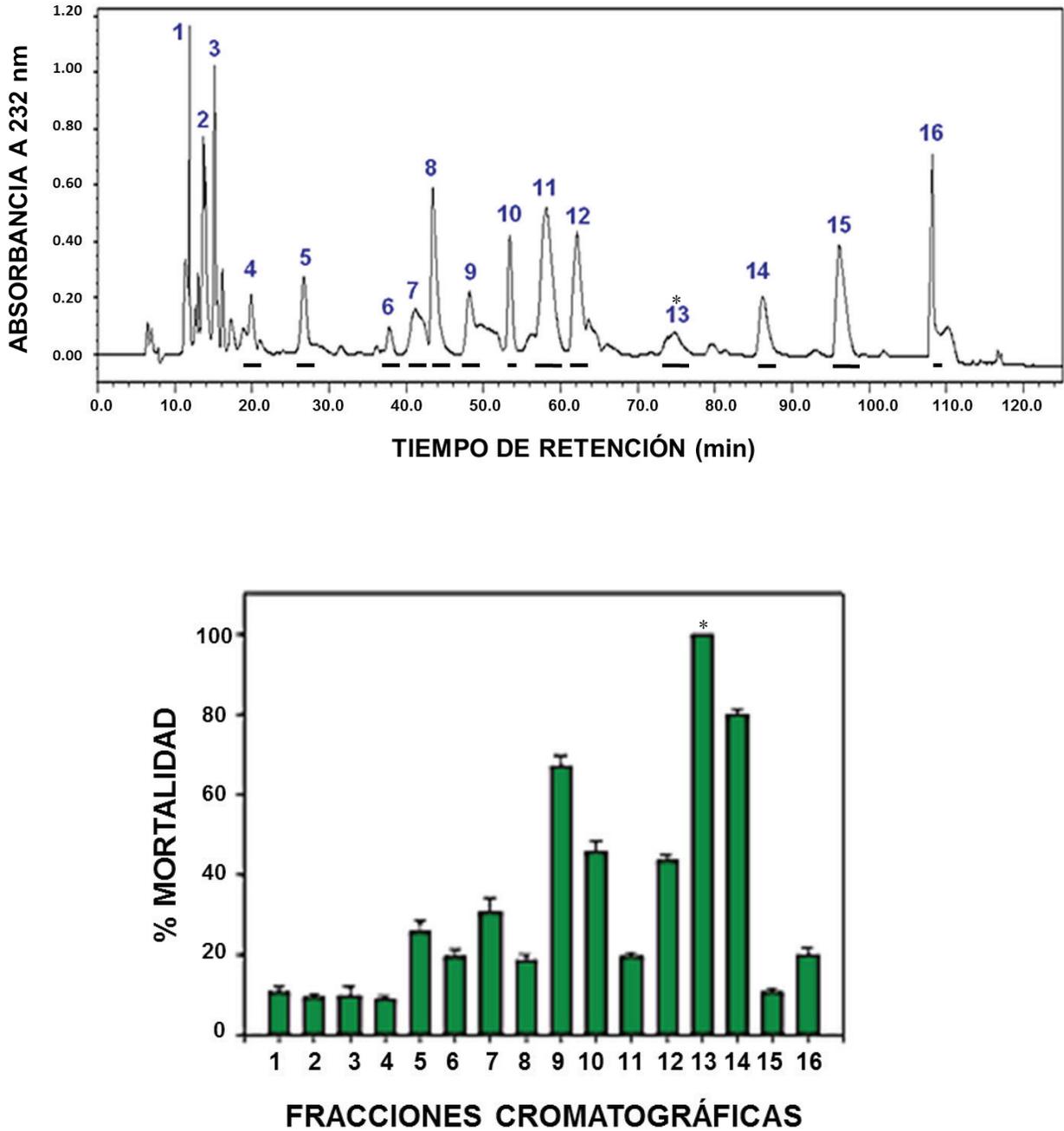


Figura 6. Aislamiento y caracterización de los componentes leishmanicidas presentes en la fracción TgIII. (A) Fraccionamiento mediante HPLC en fase reversa de 300 µg de proteína provenientes de un “pool” efectuado a partir de la fracción TgIII. (B) Actividad leishmanicida sobre promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana* empleando 1 µg de proteína correspondiente a cada una de las fracciones eluidas en la sección (A), reunidas en “pools” según se indica en el perfil de elución. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada fracción. (*) Indica la fracción HPLC-13 más activa sobre promastigotes. Las barras del histograma corresponden al valor promedio obtenido a partir de tres experimentos independientes. ± error estándar de la media.

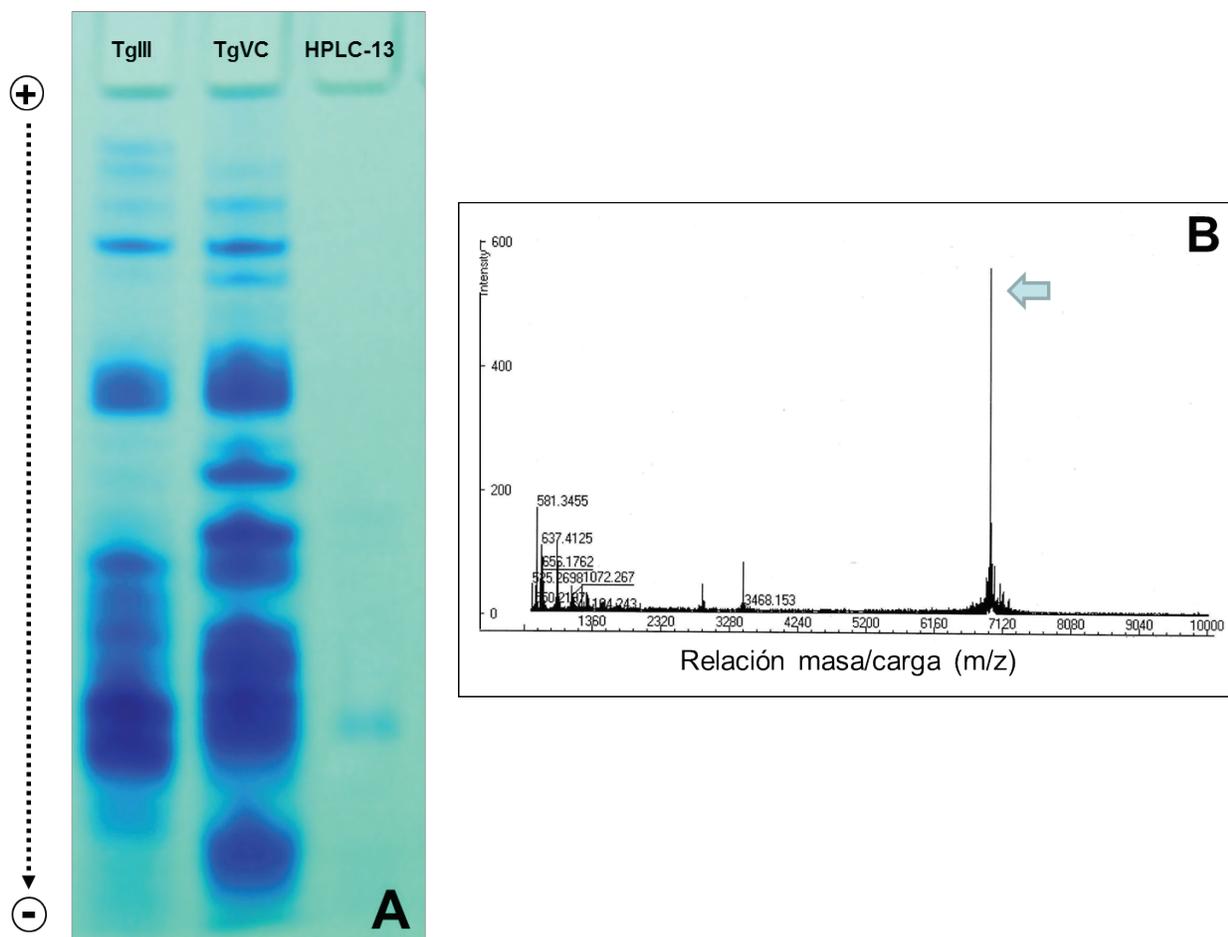


Figura 7. Caracterización electroforética y mediante espectrometría de masas del componente leishmanicida HPLC-13. (A) Electroforesis en ácido acético-urea en geles de poliacrilamida al 15% del componente derivado de HPLC del veneno de *Tityus gonzalespongai*. Se compara la composición del veneno crudo (TgVC: veneno completo de *Tityus gonzalespongai*) con aquella de la fracción TgIII y la franja del componente HPLC-13. (B) Análisis por MALDI-TOF del componente HPLC-13 correspondiendo a un péptido de 6.880,97 Da de masa molecular (flecha).

La actividad leishmanicida de *T. gonzalespongai* esta asociada a los componentes del veneno con menores masas moleculares, los cuales eluyen en la fracción cromatográfica TgIII obtenida mediante exclusión molecular. Este hallazgo tiene un paralelo con los resultados previamente logrados por Borges *et al.* (2006a) con el veneno de *T. discrepans*, que indican que el efecto leishmanicida del mismo está asociado con componentes termolábiles con masas molares menores a $14,4 \times 10^3$ g/mol. En dicho trabajo, se muestran resultados relativos a la separación del veneno crudo de *T. discrepans* mediante cromatografía en Sephadex G-50, dando tres fracciones (TdI, TdII y TdIII), indicando a la fracción TdII, con mayor actividad, produciendo 76% de mortalidad de los parásitos incubados. La fracción TgIII de *T. gonzalespongai* mostró la mayor actividad leishmanicida en comparación con TgII, sugiriendo la existencia de

posibles diferencias en términos estructurales y/o de actividad entre los componentes antiparasitarios de *T. discrepans* y los producidos por la especie oriental, las cuales deberán ser objeto de futuras investigaciones.

Adicionalmente, evidencias expuestas por Borges *et al.* (2006a) mediante microscopía electrónica indican que los componentes del veneno de *T. discrepans* con actividad leishmanicida producen intensa vacuolización, aumento del volumen del bolsillo flagelar y muerte de promastigotes de *L. (L.) mexicana* 30 minutos luego de su incubación con extractos del veneno y con sus fracciones cromatográficas activas. En el caso de *T. gonzalespongai*, la evidencia estructural obtenida indicó lisis celular a la concentración ensayada, efecto no observado con el veneno de *T. discrepans* a esa misma dosis, sugiriendo diferencias en los mecanismos de citotoxicidad entre

ambos venenos.

El mecanismo de acción de los componentes del veneno responsables de este efecto está aún por ser dilucidado. Sin embargo, el hecho que Borges *et al.* (2006a) hayan reportado que a las concentraciones a las cuales se observa el efecto antiparasitario (35 µg/mL) no fue observada citotoxicidad en células de mamífero, indicaría que el efecto de los venenos de escorpión sobre *Leishmania* está probablemente asociado a componentes de alta especificidad. El hecho que los componentes leishmanicidas de los venenos de *T. discrepans* y *T. gonzalespongai* sean capaces de distinguir entre *L. (V) braziliensis*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) mexicana*, especies responsables de las leishmaniasis muco-cutánea, visceral y cutánea, respectivamente, indica que es posible aislar y caracterizar proteínas o péptidos leishmanicidas con diferente tropismo hacia estas especies, las cuales responden con distinta susceptibilidad frente a estos venenos (Borges *et al.* 2006a).

La presente investigación también ha avanzado en la caracterización química de los componentes responsables del efecto leishmanicida al aislar mediante HPLC en fase reversa dos péptidos, HPLC-13 Y HPLC-14, capaces de producir en ensayos de 1 h de duración, 100% y 84% de mortalidad de promastigotes de *L. (L.) mexicana* respectivamente. Debido a lo escaso del material obtenido, sólo se procedió a la caracterización del componente HPLC-13, el cual rindió una masa molar de 6.880,97 g/mol mediante espectrometría de masas. Esta masa es típica de las toxinas de escorpión de cadena larga, entre 60 y 70 aminoácidos en su estructura primaria, las cuales típicamente son agonistas de canales iónicos en células de mamíferos. HPLC-13 es muy probablemente un componente catiónico, en vista de su migración en geles de urea/ácido acético. Así, dada su migración al cátodo durante las corridas electroforéticas en poliacrilamida efectuadas a pH ácido, su carga neta positiva debe indicar el predominio en su superficie de cadenas laterales típicas de los aminoácidos hidrofílicos. Por otra parte, HPLC-13 debe ser un componente con áreas de hidrofobicidad en su superficie, en vista de su considerable tiempo de retención retardada en la columna C-18 de fase reversa, siendo éste uno de los últimos componentes de TgIII en eluir en la cromatografía líquida a alta presión.

Independientemente de su naturaleza química y del mecanismo que mejor explique su actividad biológica, este trabajo ha sido el primero en aislar un componente leishmanicida a partir de un veneno de escorpión con

una pureza relativamente elevada, como lo evidencian los experimentos de MALDI-TOF y de electroforesis en geles de poliacrilamida. Dada la especificidad de su actividad biológica, estos componentes podrían servir de base para la preparación de drogas antiparasitarias más específicas y más económicas para el tratamiento de la leishmaniasis.

CONCLUSIONES

El efecto leishmanicida (sobre *L. (L.) mexicana*) observado en doce venenos de diez especies de escorpiones endémicos de Venezuela y una especie brasileña (*T. serrulatus*) permitieron determinar que tal efecto es especie-específico, con las siguientes especies clasificadas dependiendo de su actividad antiparasitaria: actividad elevada (> 80% de mortalidad; *T. discrepans*, *T. gonzalespongai* y *T. perijanensis*), actividad intermedia (40-80% mortalidad; *T. clathratus*, *T. falconensis* A, *T. nororientalis* AL, *T. nororientalis* CA, *T. imei* y *T. zulianus*), y actividad baja (< 40%; *T. falconensis* B, *T. breweri*, *T. sanarensis* y *T. serrulatus*).

El veneno de *T. gonzalespongai*, endémico del nororiente venezolano, produce daño agudo (1 hora de incubación) a nivel estructural y ultraestructural en promastigotes de *L. (L.) mexicana*, mostrándose evidencia de muerte celular: vacuolas autofágicas, aumento del volumen del bolsillo flagelar, picnosis del núcleo y desorganización del interior mitocondrial.

De los tres venenos más activos, el producido por *T. gonzalespongai*, fue sujeto a fraccionamiento cromatográfico mediante filtración molecular en Sephadex G-50 y luego mediante cromatografía a alta presión en fase reversa. Fue aislado un componente de 6.880,97 Da nombrado HPLC-13, el cual probó ser un potente leishmanicida en ensayos *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcelo R. Diniz, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil y al Dr. Huub Op den Camp, Departamento de Microbiología, Radboud University Nijmegen, Holanda. Trabajo financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV), a través de los proyectos 09-00-6586-2006 (OD), proyecto PG-09-7767-2009/2 (AB) y por el Consejo de Investigación, Universidad de Oriente, proyectos CI-1-0403-0799/97 (LDS) y CI-3-040602-1342/07 (LDS).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERA A, SINGH S, NAGARAJ R, VAIDYA T. 2003. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. Mol. Biochem. Parasitol. 127(1):23-35.
- BHATTACHARYA S, GHOSH P, DE T, GOMES A, GOMES A, DUNG DUNG SR. 2013. *In vivo* and *in vitro* antileishmanial activity of *Bungarus caeruleus* snake venom through alteration of immunomodulatory activity. Exp. Parasitol. 135(1):126-133.
- BORGES A, DE SOUSA L. 2006. Escorpionismo en Venezuela: una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. Rev. Fac. Farmacia (Caracas). 69(1-2):15-27.
- BORGES A, SILVA S, OP DEN CAMP H, VELASCO E, ALVAREZ M, ALFONZO M, JORQUERA A, DE SOUSA L, DELGADO O. 2006a. *In vitro* leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. Parasitol. Res. 99(2):167-173.
- BORGES A, DE SOUSA L, MANZANILLA J. 2006b. Description of a new *Tityus* species (Scorpiones: Buthidae) from Sierra de Portuguesa, western Venezuela, based on morphological and mitochondrial DNA evidence. Zootaxa. 1107:49-68.
- BORGES A, DE SOUSA L, ESPINOZA J, MELO M, SANTOS R, KALAPOTHAKIS E, VALADARES D, CHÁVEZ-OLORTEGUI C. 2008. Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian antivenoms. Toxicon. 51(1):66-79.
- BORGES A, BERMINGHAM E, HERRERA N, ALFONZO M, SANJUR O. 2010a. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. Toxicon. 55(2-3):436-454.
- BORGES A, ROJAS-RUNJAIC F, DIEZ N, FAKS JG, OP DEN CAMP H, DE SOUSA L. 2010b. Envenomation by scorpion *T. breweri* in the Guayana Shield, Venezuela. Report of a case, efficacy and reactivity of antivenom and proposal for a toxinological partitioning of the Venezuelan scorpion fauna. Wilderness Environ. Med. 21(4):282-290.
- CASTILHOS P, PEREIRA CG, SILVA AL, NAPOLITANO DR, OLIVEIRA F, SOUZA MA. 2011. Effects of *Bothrops moojeni* venom on *Leishmania amazonensis* promastigote forms. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 17(2):150-158.
- CASTILLO-VIGIL A, LOAIZA R, ZELEDÓN R, LOMONTE B, URBINA A, VALVERDE B. 2008. Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica. Bol. Mal. Salud Amb. 48(2):135-144.
- CHICHARRO C, GRANATA C, LOZANO R, ANDREU D, RIVAS L. 2001. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. Antimicrob. Agents Chemother. 45(9):2441-2449.
- CORZO G, ESCOUBAS P, VILLEGAS E, BARHAM KJ, HE W, NORTON RS, NAKAJIMA T. 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. Biochem. J. 359(Pt 1):35-45.
- CORZO G, VILLEGAS E, GÓMEZ-LAGUNAS F, POSSANI LD, BELOKONEVA OS, NAKAJIMA T. 2002. Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. J. Biol. Chem. 277(26):23627-23637.
- DE SOUSA L, PARRILLA-ÁLVAREZ P, QUIROGA M. 2000. An epidemiological review of scorpion stings in Venezuela. The northeastern region. J. Venom. Anim. Toxins. 6(2):127-165.
- DE SOUSA L, PARRILLA-ÁLVAREZ P, PÉREZ DI GAETA P, ROMERO L, QUIROGA M. 2009. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) en ratones C57BL/6. Saber. 21(1):50-62.
- DE SOUSA L, BORGES A, VÁSQUEZ-SUÁREZ A, OP DEN CAMP H, CHADEE-BURGOS R, ROMERO-BELLORÍN M, DE SOUSA-INSANA L, PINO-GARCÍA O. 2010. Differences in venom toxicity and antigenicity between females and males of the scorpion *Tityus nororientalis* (Buthidae). J. Venom Res. 1:61-70.
- EL-SADAWAY HA, ABOU EL-HAG HA, GEORGU J, EL HOSSARY SS, KASSEM H. 2008. *In vitro* activity

- of *Bacillus thuringiensis* (H14) 43 kDa crystal protein against *Leishmania major*. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 3(4):583-589.
- FARAUT-GAMBARELLI F, PIARROUX R, DENIAU M, GIUSIANO B, MARTY P, MICHEL G, FAUGÈRE B, DUMON H. 1997. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(4):827-830.
- FERNANDEZ-GOMEZ R, HALIM Z, SEBTI F, LOYENS M, BENSLIMANE A, OUAISSI MA. 1994. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. *Toxicon.* 32(8):875-882
- GONZÁLEZ-SPONGA MA. 1994. Arácnidos de Venezuela. Dos nuevas especies de la Serranía de Perijá (Scorpionida: Chactidae: Butidae). *Bol. Soc. Venez. Cien. Nat.* 44(148):343-360.
- GONZÁLEZ-SPONGA MA. 1996a. Guía para identificar escorpiones de Venezuela. Caracas: Cuadernos Lagoven, 204 p.
- GONZÁLEZ-SPONGA MA. 1996b. Arácnidos de Venezuela: Seis nuevas especies del género *Tityus* y redescipción de *Tityus pococki* Hirst, 1907, *Tityus rugosus* (Schenkel, 1932) n. comb. y *Tityus nematochirus* Mello-Leitão, 1940 (Scorpionida: Buthidae). *Acta Biol. Venez.* 6(3):1-38.
- GONZÁLEZ-SPONGA MA. 1997. Arácnidos de Venezuela. Tres nuevas especies de escorpiones de la Región Amazónica-Guayanesa (Buthidae: Chactidae). *Mem. Soc. Cien. Nat. La Salle.* 57(148):55-69.
- HERWALDT BL. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* 354(9185):1191-1199.
- KUHN-NENTWIG L. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol. Life Sci.* 60(12):2651-2668.
- HERNANDEZ C, MOR A, DAGGER F, NICOLAS P, HERNANDEZ A, BENEDETTI EL, DUNIA I. 1992. Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin. *Eur. J. Cell. Biol.* 59(2):414-424.
- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
- LORENTE SO, RODRIGUES JC, JIMENEZ JIMENEZ C, JOYCE-MENEKSE M, RODRIGUES C, CROFT SL, YARDLEY V, DE LUCA-FRADLEY K, RUIZ-PEREZ LM, URBINA J, DE SOUZA W, GONZALEZ PACANOWSKA D, GILBERT IH. 2004. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(8):2937-2950.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NH, FARR AL, RANDALL RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):257-265.
- OGBUNUDE PO, DZIMIRI MM. 1993. Expression of a channel-like pathway for adenosine transport in *Leishmania donovani* promastigotes. *Int. J. Parasitol.* 23(6):803-807.
- PASSERO LF, TOMOKANE TY, CORBETT CE, LAURENTI MD, TOYANA MH. 2007. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol. Res.* 101(5):1365-1731.
- PONTE-SUCRE A, CAMPOS Y, FERNANDEZ M, MOLL H, MENDOZA-LEÓN A. 1998. *Leishmania* sp.: growth and survival are impaired by ion channel blockers. *Exp. Parasitol.* 88(1):11-19.
- POSSANI LD, BECERRIL B, DELEPIERRE M, TYTGAT J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 264(2):287-300.
- QUIROGA M, DE SOUSA L, PARRILLA-ÁLVAREZ P, MANZANILLA J. 2004. The first report of *Tityus* (Scorpiones: Buthidae) in Anzoátegui State, Venezuela. A new species. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 10(1):10-33.
- REAL F, VIDAL RO, CARAZZOLLE MF, MONDEGO JM, COSTA GG, HERAI RH, WÜRTELE M, DE CARVALHO LM, FERREIRA RC, MORTARA RA, BARBIÉRI CL, MIECZKOWSKI P, DA SILVEIRA JF, BRIONES MR, PEREIRA GA, BAHIA D. 2013. The Genome Sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional Annotation and Extended Analysis of Gene Models. *DNA Res.* 20(6):567-581.

- ROJAS-RUNJAIC FJM, DE SOUSA L. 2007. Catálogo de los escorpiones de Venezuela (Arachnida: Scorpiones). Bol. SEA. 40:281-307.
- ROJAS-RUNJAIC FJM, BECERRA A. 2008. Diversidad y distribución geográfica de la escorpiofauna del estado Zulia, Venezuela. Bol. Centro Invest. Biol. 42(4):461-477.
- RUBEN L, AKINS CD, HAGHIGHAT NG, XUE L. 1996. Calcium influx in *Trypanosoma brucei* can be induced by amphiphilic peptides and amines. Mol. Biochem. Parasitol. 81(2):191-200.
- SHULOV A, ZLOTKIN E. 1969. A simple device for collecting scorpion venom. Toxicon. 7(4):331-332.
- SUNDAR S, ROSENKAIMER F, MAKHARIA M, GOYAL K, MANDAL A, VOSS A, HILGARD H, MURRAY H. 1998. Trial of oral miltefosine for visceral Leishmaniasis. Lancet. 352(9143):1821-1823.
- TEMPONE AG, ANDRADE HF JR, SPENCER PJ, LOURENCO CO, ROGERJR, NASCIMENTO N. 2001. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 280(3):620-624.
- TYTGAT J, CHANDY KG, GARCIA ML, GUTMAN GA, MARTIN-EAUCLAIRE MF, VAN DER WALT JJ, POSSANI LD. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. Trends Pharmacol. Sci. 20(11):444-447.
- WANG M, PANG JS, SELSTED ME. 1997. Semidry electroblotting of peptides and proteins from acid-urea gels. Anal. Biochem. 253(2):225-230.