

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DEL VENENO
DE *Centruroides edwardsii* (Gervais 1943).**

NELSON IVAN CUPITRA VERGARA

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Director

WALTER MURILLO ARANGO

PhD. Química

Codirectores

JONH JAIRO MENDEZ ARTEAGA

PhD. Ciencias Químicas

SEBASTIAN ESTRADA GOMÉZ

Ms. Investigación y Desarrollo de Medicamentos

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

BIOLOGÍA

IBAGUÉ-TOLIMA

2014



FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: Caracterización y evaluación del potencial biológico del veneno de *Centruroides edwardsii* (Gervais 1943).

AUTORES: Nelson Ivan Cupitra Vergara

DIRECTOR: Walter Murillo Arango

JURADOS: Iang Schroniltgen Rondón; Manuel Hernando Bernal Bautista

CALIFICACIÓN: 4.9 Cuatro Nueve

APROBADO

REPROBADO

OBSERVACIONES:

FIRMAS

+ Iang Rondón
JURADO 1.

[Firma]
JURADO 2.

WMA
Director del trabajo

[Firma]
Director del programa

Ciudad y fecha: Ibagué, 25 de Julio de 2014

A mis padres, abuela

Hermanos y amigos por su apoyo Incondicional

AGRADECIMIENTOS

A mi familia en general, y a mis padres en particular por su sacrificio y confianza durante toda mi carrera.

A mi tutor Walter Murillo, por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este proyecto.

A Ángel Jiménez y Carlos Guerra por sus enseñanzas y por su ayuda en todo momento, al igual que a mis compañeros del Grupo de Investigación en Productos Naturales, quienes siempre están dispuestos a colaborarme.

A los investigadores del programa de Ofidismo/ Escorpionismo y del Serpentario en la universidad de Antioquia, por permitirme realizar una estancia en sus instalaciones y por todas sus enseñanzas.

A María Rivera, Francisco Santamaría, Felipe Vanegas, Cindy Albañil, H. Daniel Hernández, Junior Clavijo, Ana Jaramillo, Lina Dávila y Paula segura por su apoyo incondicional.

A la Oficina de investigaciones de la universidad del Tolima por la financiación del proyecto de Investigación.

En síntesis, mi más sincero agradecimiento a las personas que de una u otra forma estuvieron vinculadas con el desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	133
1. JUSTIFICACIÓN	155
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	177
3. OBJETIVOS	188
3.1. OBJETIVOS GENERALES	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. METODOLOGIA	199
4.1. ÁREA DE TRABAJO	199
4.2. COLECTA	199
4.3. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA	20
4.4. <i>EXTRACCIÓN DE VENENO</i>	21
4.5. <i>CARACTERIZACIÓN DEL VENENO</i>	21
4.5.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	21
4.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	22
4.6. <i>EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOLÓGICO</i>	23
4.6.1. Actividad fosfolipasa.	23
4.6.2. Actividad proteolítica	23
4.6.3. Actividad hemolítica directa e indirecta.	23

4.6.4.	Actividad antimicrobiana.	23
4.6.5.	Análisis Estadístico	24
5.	MARCO TEÓRICO	255
5.1.	Los escorpiones (alacranes)	255
5.2.	Veneno	266
5.3.	CARACTERIZACIÓN PROTEICA	288
5.3.1.	Cromatografía	288
5.3.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	299
5.4.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	299
5.4.1.	Actividad fosfolipasa A2	299
5.4.2.	Actividad proteasa	30
5.4.3.	Actividad antibacteriana	31
5.4.4.	Péptidos antibacterianos	32
5.5.	PÉPTIDOS NEUROTÓXICOS	33
5.6.	ANTECEDENTES	34
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1.	COLECTA Y DETERMINACIÓN TAXONÓMICA	37
6.2.	CARACTERIZACIÓN DEL VENENO	41
6.3.	ACTIVIDAD DEL POTENCIAL BIOLÓGICO	42
7.	CONCLUSIONES	51
	RECOMENDACIONES	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de algunas bacterias según la tinción de Gram	32
Tabla 2 Distribución de algunos antibióticos según su acción sobre las bacterias	32
Tabla 3 Actividad antimicrobiana de péptidos aislados del veneno de 4 escorpiones.	38
Tabla 4 Mediciones (mm) de <i>Centruroides edwardsii</i> de dos departamentos (Antioquia y Tolima) Colombia.	39
Tabla 5 Variación de la cantidad de dientes pectíneos en <i>Centruroides edwardsii</i> en los departamentos de Antioquia y Tolima Colombia. D.E., desviación estándar; N, cantidad de peines examinados; X, media aritmética.	40
Tabla 6 Actividad antibacteriana del veneno de <i>Centruroides edwardsii</i> en bacterias Gram + y Gram a diferentes dosis.	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ubicación de los puntos de muestreo (puntos rojos) en la Vereda Rincón de chípalo en el municipio de Alvarado. 20
- Figura 2** Extracción de veneno del escorpión *Centruroides edwardsii*. A, hembra de *Centruroides edwardsii*; B, macho asegurado para la extracción; C, estimulación eléctrica. 22
- Figura 3** Morfología externa de un escorpión; A, vista dorsal; B, vista ventral. 27
- Figura 4** *Centruroides edwardsii* A-B macho; C-D hembra. 41
- Figura 5** Perfil cromatográfico del veneno de *Centruroides edwardsii* (0,5 mg) por RP-HPLC. En la cromatografía se monitorizó a 215 nm. 44
- Figura 6** Perfil del veneno crudo de *Centruroides edwardsii* en gel a 12 % SDS-PAGE, observado por tinción de azul de comassie. El veneno se cargó a una concentración de 3 g / mL (1), 1,5 g / mL (2). 46
- Figura 7** actividad fosfolipasa A2 del veneno de *Centruroides edwardsii*. C- (PBS); C+: fosfolipasa del veneno de *Bothrops asper*; VCed a: Veneno de *Centruroides edwardsii* (6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); VCed b: Veneno de *Centruroides edwardsii* (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). 47

Figura 8 Actividad hemolítica de diferentes dosis del veneno de *Centruroides edwardsii*. Control positivo: fosfolipasa dependiente de calcio del veneno de *Bothrops asper*.

48

Figura 9 A) Alineamiento y B) comparación estructural de α toxinas de los canales de potasio del veneno de 4 escorpiones depositados en el Proteín Data Bank (PDB). En el alineamiento la coloración azul corresponde a residuos de cisteína, el color fucsia muestra la ubicación de las hélices- α , y la coloración gris son los residuos que presentan homología en los 4 escorpiones.

49

RESUMEN

El veneno de escorpión ha despertado la curiosidad del mundo científico principalmente sobre los géneros *Centruroides*, *Isometrus*, *Ananteris* y *Tityus* de la familia *Buthidae*, los cuales albergan algunas especies consideradas como un factor de riesgo para la salud humana en países tropicales (escorpionismo). En Colombia uno de los causantes de este tipo de accidentes por su picadura es *Centruroides edwardsii*, un escorpión disperso a lo largo del valle del río Magdalena, y de cuyo veneno se ha reportado actividad sobre el sistema nervioso y circulatorio, además de ser reportado como el responsable del 24 % de estos accidentes, solo en los departamentos de Antioquia y Tolima; igualmente se debe resaltar la falta de información sobre la composición y los mecanismos de acción de las toxinas que contiene su ponzoña, limitando así la comprensión de su bioactividad en la búsqueda de compuestos bioactivos de importancia farmacéutica. En esta investigación se evaluó el potencial biológico del veneno de 35 escorpiones identificados como *Centruroides edwardsii*, los cuales fueron capturados en la vereda rincón de chipalo del municipio de Alvarado y mantenidos en cautiverio, al tiempo que se les llevó a cabo la extracción de su veneno por estimulación eléctrica. Se realizó la caracterización peptídica del veneno a través de R-HPLC y PAGE-SDS, encontrando en su mayoría péptidos de bajo peso molecular (+/- 10 kDa); Se evaluó el efecto antibacteriano, proteolítico, y fosfolítico del veneno crudo, de los cuales no se hallaron resultados estadísticamente significativos, a excepción de la prueba de hemólisis indirecta, la cual posiblemente se dio por la acción de fosfolipasas A2 dependientes de Ca^{+} . El resultado global indica que son las fosfolipasas A2 uno de los componentes encargados de actividad biológica en el veneno, posiblemente relacionadas con el daño neurotóxico tanto en la caza de su alimento, como el accidente escorpiónico.

Palabras Clave: veneno, escorpiones, *Centruroides*, fosfolipasas, péptidos, escorpionismo.

ABSTRACT

The scorpion venom has aroused the curiosity of the scientific world mainly on gender *Centruroides*, *Isometrus*, and *Tityus Ananteris* the Buthidae family, which house some species considered as a risk factor for human health in tropical countries (scorpionism). In Colombia one of the causes of such accidents by their sting is *Centruroides edwardsii*, a scattered along the valley of the Magdalena River scorpion, whose venom and has been reported on the nervous and circulatory system, as well as being reported as responsible for 24% of these accidents, only in the departments of Antioquia and Tolima; also highlighted a lack of information on the composition and the mechanisms of action of toxins contained their venom, thus limiting the understanding of their bioactivity in the search for bioactive compounds of pharmaceutical importance. in this research the biological potential of venom 35 scorpions identified as *Centruroides edwardsii*, which were captured in the corner sidewalk Chipalo the municipality of Alvarado and kept in captivity, was assessed while I were conducted extracting venom by electrical stimulation. venom peptide characterization was performed using R-HPLC and SDS-PAGE, the peptides found in most low molecular weight (10 kDa +/-); Antibacterial, proteolytic, and crude venom fosfolítico effect, which was evaluated no statistically significant results were found, except for the indirect hemolysis, which may be given by the action of phospholipase A2 dependent Ca +. The overall result indicates that phospholipase A2 is one of the components responsible for biological activity in the venom, possibly related to nerve damage in both hunting their food, as the scorpion accident.

Keywords: poison, scorpions, *Centruroides*, phospholipases, peptides, scorpionism.

INTRODUCCIÓN

El veneno de escorpión en los últimos años ha despertado la curiosidad del mundo científico, principalmente sobre los géneros *Centruroides*, *Isometrus*, *Ananteris* y *Tityus* de la familia *Buthidae*, los cuales albergan algunas especies que por su veneno son consideradas potencialmente peligrosas para la salud humana (Barona, Otero, de Ofidismo, & Escorpionismo, 2004; Gómez et al., 2010). Estos escorpiones se distribuyen en zonas tropicales, de ahí que la accidentalidad por emponzoñamiento sea considerada como un problema en salud pública en países centroamericanos, Colombia, Venezuela y Ecuador (Gómez & Otero, 2007).

De manera general se establece que el veneno de los escorpiones es una secreción apocrina, compuesta de proteínas y péptidos de bajo peso molecular, los cuales actúan sobre canales iónicos de Na^+ , K^+ , Ca^{++} , y Cl^- en el sistema nervioso, modificando la excitabilidad celular (García Núñez, 2012; Pereañez & Vargas, 2009; Sollod et al., 2005). En el caso particular de la familia *Buthidae* la ponzoña genera una liberación masiva de neurotransmisores que conduce a una hiper-estimulación del sistema nervioso autónomo; los efectos neurotóxicos y cardiotoxicos, se deben a la acción directa de las catecolaminas y la acetilcolina, lo que explica las manifestaciones clínicas del envenenamiento (Charry, 2006). Igualmente gracias a la diversidad de mecanismos de acción de las toxinas del veneno de los escorpiones y a la especificidad que demuestran frente a diferentes modelos biológicos (Ma et al., 2012) han despertado el interés como alternativa en diversos campos de interés, incluyendo el desarrollo de antibióticos como agente antimicrobiano/anti fúngico/antiviral (Cao et al., 2012; Chen et al., 2012; Perumal Samy et al., 2007);o como bio-insecticidas para aplicación agrícola (Gurevitz et al., 2007; Herrmann, Moskowitz, Zlotkin, & Hammock, 1995) o desde el punto de vista médico en el tratamiento de desórdenes neurológicos (Wulff & Zhorov, 2008), cáncer (Heinen & Gorini da Veiga, 2011; Gómez et al., 2010), entre otras. De ahí el interés por conocer los mecanismos de acción bajo diferentes

modelos biológicos, puesto que con ello se forjan las bases para el tratamiento, al tiempo que es posible proponer alternativas en el uso de las toxinas en beneficio del desarrollo científico.

Colombia cuenta con un aproximado de 70 especies de escorpiones, distribuidas en 4 familias (*Buthidae*, *Chactidae*, *Diplocentridae* e *Ischnuridae*), teniendo como principal representante a la familia *Buthidae*, la cual cuenta con un poco más de la mitad de las especies (Gómez & Otero, 2007; Flórez, 2012). Uno de los géneros más importantes de la familia *Buthidae* es el género *Centruroides*, el cual ha empezado a generar cierto interés científico, médico y epidemiológico por las complicaciones generadas por su veneno; sin embargo, la información de sus aspectos biológicos es insuficiente, con lo que se ha limitado la investigación en aspectos clínicos, epidemiológicos, toxicológicos o en la bioprospección de metabolitos. De los pocos registros que se tienen sobre su distribución lo presentan de Armas, Sarmiento, & Flórez, (2012), en donde establecen la distribución de *Centruroides edwardsii*, *Centruroides margaritatus* y *Centruroides gracilis* en territorio Colombiano; de este mismo trabajo de destaca el reporte de *Centruroides edwardsii* a lo largo del valle del río Magdalena, siendo esta especie la que mayor territorio ocupa en el país. Igualmente, *Centruroides edwardsii* ha sido reportada como una de las especies cuya ponzoña es de importancia médica en los departamentos de Tolima y Antioquia presentándose como el responsable de un 24 % de los casos de accidentes reportados por picadura de escorpión en ambas regiones (Cárdenas et al., 2004; Otero et al., 2004). Es por ello que con la determinación de los componentes peptídicos del veneno y la caracterización de algunos aspectos de la actividad biológica del mismo se espera apoyar en la formulación de políticas de educación y prevención del accidente escorpiónico, igual que generar las bases para empezar a perfilar el veneno de *Centruroides edwardsii* desde la bioprospección animal.

1. JUSTIFICACIÓN

La producción de veneno ha hecho de los escorpiones uno de los predadores más eficientes en la naturaleza, dotados de ventajas en la adaptación a diversos ecosistemas, soportando cambios en la disponibilidad de alimento y ataque de predadores (Vargas, 2008; Ma et al., 2012); estas toxinas a su vez han sido el origen de temores y fobias por la seriedad de los accidentes en las poblaciones humanas (Hoffmann & del Carmen Farias, 1993; Flórez, 2001). El escorpionismo afecta principalmente a países tropicales; un ejemplo de ello es Colombia, en donde diversos factores, tales como la época del año, la cubierta del suelo, el régimen de lluvias, las características de las viviendas y la modificación del entorno, así como las especies de escorpión, generan núcleos en donde es frecuente el escorpionismo (Gómez et al., 2010). Hasta ahora sólo dos géneros y cuatro especies revisten importancia epidemiológica en el país (*Tityus pachyurus*, *T. asthenes*, *T. fuehrmanni* y *Centruroides gracilis/C. margaritatus/C. edwardsii*) (Gómez et al., 2010; Gómez & Otero, 2007; Barona et al., 2004), los cuales han ocasionado casos con sintomatología leve y otros que pueden llegar a ser mortales. En Colombia aún no se producen antiveneno contra las picaduras de ninguno de estos alacranes, factor que es preocupante teniendo en cuenta su diversidad y distribución (Barona et al., 2004).

El veneno de escorpión al ser una mezcla heterogénea de proteínas con acción tóxica (Escobar, Velásquez, & Rivera, 2003), se ha convertido en una herramienta para la creación de tratamientos no solo para los accidentes escorpiónicos, sino también es la base de investigaciones que abordan aspectos biológicos (Possani, Rodríguez de la Vega, & Kastin, 2006; Postay), en la terapia de enfermedades respiratorias, cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes, neoplásicas, y otros aspectos farmacológicos (García Núñez, 2012). Los trabajos que se han abordado los aspectos biológicos, clínicos, inmunológicos y farmacológicos del veneno de escorpiones que representan un riesgo para la salud pública son escasos y dado que *Centruroides*

edwardsii presenta cerca de un 35 % de los casos de envenenamiento por picadura de escorpión en el país, según lo han reportan Barona et al., (2004) y del cual son pocas las evaluaciones, en este estudio se pretende generar conocimiento de base como punto de partida en investigaciones médicas y biológicas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia no hay registros que permitan definir con certeza la magnitud del escorpionismo (Gómez & Otero, 2007), sin embargo, los accidentes por picadura de escorpión en algunas regiones del país presentan altos niveles de incidencia; departamentos como Caldas, Antioquia, Tolima, Huila, Cundinamarca, Valle del Cauca, Santanderes y San Andrés son los de mayor número de casos (Charry, 2006; Rodríguez-Vargas, 2012). Cárdenas et al. (2004), mencionan que en el Tolima se han presentado el 24 % de los casos del país, y de estos el 34.3 % han sido ocasionado por *Centruroides edwardsii*, el cual es un escorpión ampliamente distribuido en el continente americano. De igual manera el carácter sinantrópico de esta especie facilita encontrarla en ciudades y poblados (Teruel, 2004). Esta especie es considerada como una de las más peligrosas de Colombia, no solo por la frecuencia con la se haya en los hogares, sino también sus por las potentes toxinas que contiene su veneno y del cual no se tienen registros en el departamento sobre su toxicidad, tratamiento o uso alternativo.

El veneno de escorpión ha sido descrito de manera general como una mezcla de toxinas heterogénea, con una potente actividad neurotóxica usada por estos organismos para capturar sus presas. Está compuesto de proteínas y péptidos de bajo peso molecular, los cuales actúan sobre canales iónicos Na^+ , K^+ , Ca^+ , y Cl^- , en el sistema nervioso. En el caso particular de los seres humanos, el envenenamiento por picadura de alacrán genera dos sintomatologías, una local, manifestada en el lugar de la picadura, y otra sistémica la cual puede llevar al paciente desde una taquicardia sinusal e hipertensión arterial, hasta insuficiencia o fallo cardiaco (Riverón, López, Mesa, Tena & Álvarez, 2012). Ahora bien, la complejidad y composición de esta mezcla es una de las razones por la cual es considerada como nueva fuente de investigación, que proporciona no solo la oportunidad de desarrollar un antiveneno, que dé solución a la problemática generada por estos accidentes, sino también proponer alternativas al uso de sus metabolitos en farmacología e industria agrícola, entre otras.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GENERALES

Caracterizar el veneno extraído de especímenes *Centruroides edwardsii* recolectados en el departamento del Tolima y evaluar su potencial biológico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar taxonómicamente de los escorpiones recolectados y confirmar su inclusión dentro de *Centruroides edwardsii*
- Generar un perfil proteico del veneno de *Centruroides edwardsii*
- Evaluar la actividad fosfolipasa, proteasa y hemolítica del veneno crudo extraído de especímenes de *Centruroides edwardsii*
- Determinar la actividad antimicrobiana del veneno de *C. edwardsii* frente a distintas cepas bacterianas.

4. METODOLOGÍA

4.1. ÁREA DE TRABAJO

El trabajo se realizó en las instalaciones del grupo de investigación en productos naturales (GIPRONUT) de la Universidad del Tolima, ubicado en el bloque 14 del campus Santa Helena; y en el grupo de ofidismo/escorpionismo de la Universidad de Antioquia.

Los escorpiones fueron colectados en la vereda Rincón de chípalo en el municipio de Alvarado (Fig. 1), ubicada al nororiente del Departamento de Tolima a los 4°25'49.1'' N y 75° 13' y 1.7'' W.. La zona de muestreo fue un potrero destinado para ganadería a 250 m del caserío, el cual se caracterizó por presentar abundantes pasturas, rocas de naturaleza ígnea y pequeños galerías de arbustos.

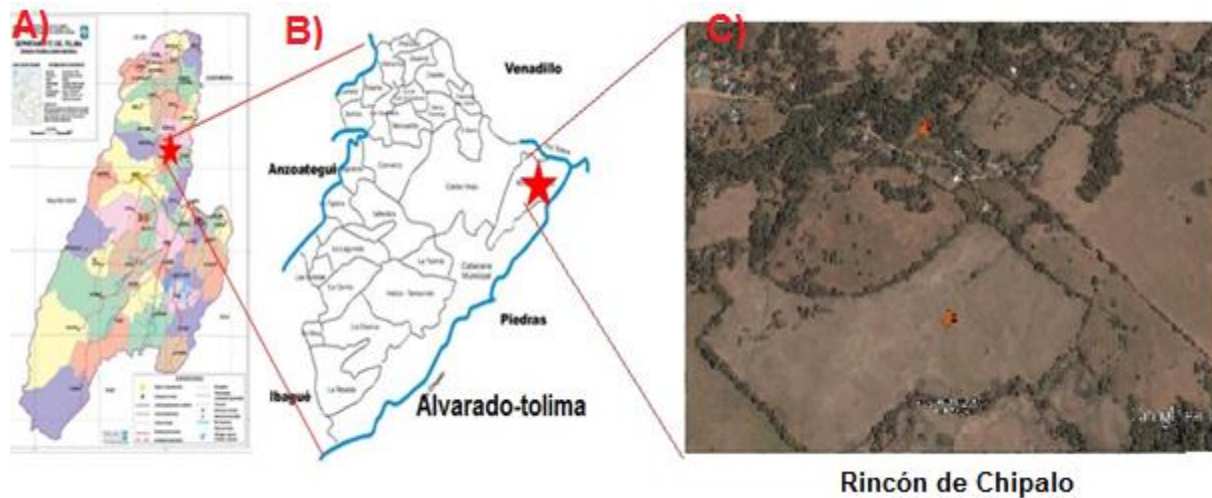
4.2. COLECTA

Para la búsqueda y colecta de escorpiones se llevaron a cabo dos muestreos durante un periodo de tiempo de tres días, el primero del 22 al 24 de mayo de 2013, y el segundo del 7 al 9 de junio de 2013. El muestreo se llevó a cabo hasta que fueron colectados 35 ejemplares con una talla mínima de 6 cm de longitud.

La búsqueda se estableció revisando hojarasca, grietas, troncos y rocas que pudieran servir de refugio durante el día (Charry, 2006; García Núñez, 2012); en la noche se usaron lámparas de luz UV teniendo en cuenta que los escorpiones presenta fluorescencia al ser expuestos a este tipo de luz (Kloock, Kubli, & Reynolds, 2010). Los especímenes colectados fueron mantenidos en cajas plásticas de 10 x 7 x 5 cm; hasta

su llegada al laboratorio; una vez en el laboratorio estos fueron mantenidos teniendo en cuenta la metodología propuesta por Rivera, Flores, Pantigoso, & Escobar, (2010), con algunas modificaciones; conservados en cajas plásticas de 15 x 8 x 10, alimentados cada 15 días con saltamontes, con agua dispuesta *ad libitum* (Fig. 2).

Figura 1 Ubicación de los puntos de muestreo (puntos rojos) en la Vereda Rincón de chípalo en el municipio de Alvarado.



Fuente: A) Cortolima (2014). B) Alcaldía de Alvarado (2014). C) Google Earth (2104).

4.3. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA

El material examinado para la comparación taxonómica de los individuos colectados, se encuentra depositado en las colecciones SUA-149 y SUA-073 del Serpentario del Programa de Ofidismo/Escorpionismo, de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. El lugar de procedencia de los especímenes analizados se ubica en los departamentos de Antioquia y Tolima.

La nomenclatura y mediciones se realizaron según lo propuesto por Stahnke (1970), a excepción de la tricobotriotaxia (Vachon, 1974) y la carenación de los segmentos metasomales (Francke, 1977). Para el caso de las carenas en la pinza pedipalpal se siguió a Stahnke (Stahnke, 1970) modificado por Prendini (2000), pero reconociendo

nueve en lugar de ocho (Vachon, 1952; Armas, Teruel, & Kovarick, 2011; de Armas, Sarmiento, & Flórez, 2012). Anexo a ello se establecerán rangos y las modas en el caso de los dientes pectíneos, y los valores correspondientes a las dimensiones del cuerpo de los organismos usando como modelo 50 escorpiones de la colección.

Para la determinación taxonómica se tomaron como base las claves dicotómicas presentadas recientemente para el género *Centruroides* en Colombia por de Armas et al., (2012) (Anexo 1).

4.4. EXTRACCIÓN DE VENENO

Se realizó por estimulación eléctrica utilizando una fuente de poder para generar un voltaje de 40 voltios. Los escorpiones fueron manipulados, sujetando el último segmento del metasoma y el telson, colocando los electrodos sobre la base del telson y aplicando la descarga (Fig. 2). El veneno liberado se recogió en capilares y se depositó en vial de 1,5 mL (Rivera, Flores, Pantigoso, & Escobar, 2010; Cooper, 2011; Arboleda, Meneses, & Aguilar, 1973). Este se secó por liofilización (Escobar, Flores, & Rivera, 2008) y se conservó a -80°C hasta su uso (Rodríguez Vega, 2011).

4.5. CARACTERIZACIÓN DEL VENENO

4.5.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Se realizó una separación del veneno por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa FR-HPLC con una columna RESTEK C18 (250 × 4,6 mm), en un cromatografo liquido Shimadzu Prominence. Como fase móvil se utilizó ácido trifluoroacético al 0,1% en agua y acetonitrilo en un gradiente de elusión de 0-70% del acetonitrilo durante 92 minutos. En el trascurso de la cromatografía se colectaron los picos más representativos que

tuvieron absorción a una longitud de onda de 215 nm la cual evidencia la presencia de enlaces peptídicos (Vargas Muñoz, 2013).

4.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida. El peso molecular y la pureza de las proteínas aisladas se evaluaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) en geles al 12 %. El voltaje fue constante (100V) durante 1,5 horas y los geles se tiñeron con azul de comassie R-250 (Souto & María, 2009; González-Olivares et al., 2011; Rivera et al., 2010). El peso molecular se estimó con marcadores estándar de 14 a 97,4 kDa marca (Bio-Rad, USA).

Figura 2 Extracción de veneno del escorpión *Centruroides edwardsii*. A, hembra de *Centruroides edwardsii*; B, macho asegurado para la extracción; C, estimulación eléctrica.



Fuente: Autor.

4.6. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOLÓGICO

4.6.1. Actividad fosfolipasa. La actividad fosfolipasa del veneno se evaluó a diferentes concentraciones (6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre una solución lipo-proteica (yema de huevo) y en presencia de CaCl_2 , detectando la hidrólisis de fosfolípidos luego de ser incubado por 15 minutos con el veneno, titulando con NaOH 0,01 N, y expresando los resultados en μeq de ácido graso/mg de veneno/minuto (Remuzgo, Alvarez, Lazo, & Yarlequé, 2000). Los análisis se realizaron por triplicado.

4.6.2. Actividad proteolítica. La actividad proteolítica fue probada, añadiendo 125 μg de veneno a 2 mL de azocaseína (1 mg/mL) en Tris/HCl 0,2 M pH 8.0, CaCl_2 4 mM, incubando a 37°C durante 30 min. Para detener la reacción se adicionaron 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% (m/v). Después de 20 min, se filtró la solución y se midió la absorbancia del filtrado a 366 nm. Una unidad de actividad se definió como un aumento de 0,01 unidades de absorbancia a 366 nm (Bernardes et al., 2008). Los análisis se realizaron por triplicado.

4.6.3. Actividad hemolítica directa e indirecta. Se evaluó utilizando geles de agarosa que contenían glóbulos rojos con y sin cloruro de calcio y solución de yema de huevo, asumiendo la dosis hemolítica mínima (DHM), como la dosis de veneno que produce un halo hemolítico de 20 mm de diámetro en un tiempo de 20 horas. El veneno fue disuelto en PBS pH 7,2 y adicionado en pozos dentro del gel. Como control negativo se utilizó PBS pH 7,2 (Gutiérrez, Avila, Rojas, & Cerdas, 1988; Habermann & Hardt, 1972). Los ensayos se realizaron por duplicado.

4.6.4. Actividad antimicrobiana. Se utilizaron para los ensayos bacterias Gram positivas (*Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*.), y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp.). La evaluación se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos, en los que se colocó 130 μL del cultivo bacteriano 0,5 en la escala

de McFarland en caldo Infusión Cerebro Corazón y 70 μ L de veneno diluido en solución salina fisiológica. Luego de 24 horas a 37 °C se determinó el crecimiento bacteriano midiendo la absorbancia de cada pozo a 595 nm en un lector de micro placas (Spectrophotometer Type 1510: Multiskan Go) (Pritchard, Phillips, & Kailasapathy, 2010; Rivera et al., 2010).

4.6.5. Análisis Estadístico. Las comparaciones estadísticas de la actividad antibacteriana, proteasa, fosfolipasa y hemolítica se realizaron utilizando análisis de varianza simple ANOVA, asumiendo una significancia estadística de $p < 0,05$. Todos los análisis de datos se realizaron utilizando el paquete estadístico Past 3.x (versión 2.17).

5. MARCO TEORICO

5.1. LOS ESCORPIONES (ALACRANES)

Son considerados como unos de los animales terrestres más antiguos, de los cuales se tiene evidencia fósil desde la era silúrica, aproximadamente 450 millones de años, en los cuales se pueden evidenciar que con el paso del tiempo no han sufrido cambios anatómicos notables para conservar su eficacia biológica en los diferentes ecosistemas (Williams, 1987; Charry, 2006).

En su anatomía los escorpiones se encuentran divididos en dos partes fácilmente observables, un prosoma (cefalotórax) y un opistosoma (abdomen). El cefalotórax es ancho y aplanado, no articulado, en la cara dorsal presenta de tres a seis pares de ojos simples u ocelos, un par de los cuales, más voluminoso, está situado cerca de la línea media. En la cara ventral, el cefalotórax presenta seis pares de apéndices: cuatro pares de patas locomotoras (divididas en siete segmentos); un par de pedipalpos (modificados en forma de “pinzas”) que le sirven al animal para aferrar sus presas, y un par de quelíceros u órganos masticadores. El abdomen subdivide en un pre-abdomen (formado por 7 segmentos) y un post-abdomen (“cola”) formado por seis segmentos, de los cuales el último, llamado telson, presenta un aguijón (acúleo) en el que desembocan las glándulas productoras de veneno (Polis, 1990) (figura 3).

Los escorpiones son invertebrados terrestres que pertenecen al Phylum Arthropoda; Subphylum Chelicerata; clase Arachnida; orden Scorpionida, con 18 familias y aproximadamente 1.500 especies distribuidas a lo largo del planeta, exceptuando las regiones polares (Gómez & Otero, 2007). Aun cuando estos invertebrados, es posible encontrarlos en todas las zonas cálidas y templadas del planeta, la capacidad como especie para colonizar nuevos ambientes es limitada, debido a la poca locomoción y a los requerimientos ambientales que presentan en general, de ahí que se presente un

índice de endemismo tan alto para este grupo (Polis, 1990; Williams, 1987; Sissom & Hendrixson, 2005). No obstante, existen especies también llamadas generalistas, que han tenido éxito colonizando nuevos ecosistemas, principalmente zonas que han tenido algún tipo de intervención antrópica; sus principales representantes se encuentran en los géneros *Centruroides*, *Isometrus* y *Tityus* de la familia Buthidae, que a su vez es considerada en algunas regiones tropicales como riesgo para la salud pública (Gómez & Otero, 2007; Otero et al., 2004).

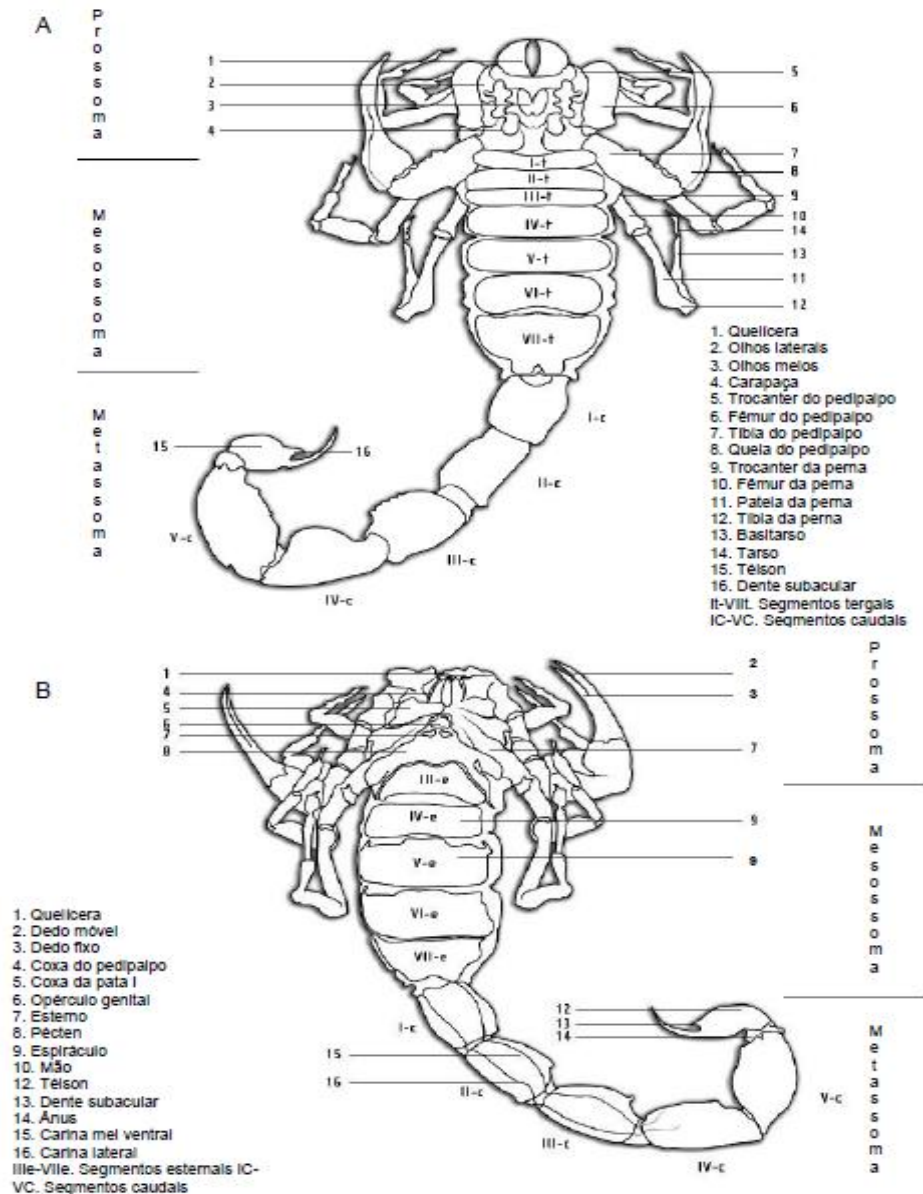
5.2. VENENO.

Los venenos de escorpión tienen muchos péptidos diferentes, con estructuras y funciones ampliamente estudiadas; sin embargo, son menos de 350 los péptidos que se han aislado y caracterizado parcialmente. Los péptidos más conocidos del veneno reconocen canales iónicos (principalmente K^+ y Na^+) y se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la farmacología y la caracterización estructural de sus receptores (Possani et al., 2006). Los venenos son una mezcla compleja de componentes con diversos mecanismos de acción sobre sus presas (Chippaux, Williams, & White, 1991). El veneno de los escorpiones es una secreción apocrina, compuesta de proteínas y péptidos de bajo peso molecular, los cuales actúan sobre canales iónicos Na^+ , K^+ , Ca^{++} , y Cl^- , en el sistema nervioso, que modifican la excitabilidad celular (Sollod et al., 2005; García Núñez, 2012; Gómez et al., 2010; Pereañez & VARGAS, 2009). Los componentes tóxicos del veneno son denominados escorpaminas, varían en naturaleza y cantidad de un escorpión a otro; el veneno contiene además hialorunidasa, que aumenta la permeabilidad capilar para facilitar su absorción, y 5-hidroxitriptamina de la que depende la producción de dolor y edema en el lugar de la picadura, sin embargo no hay liberación local de bradiquinina, histamina, prostaglandinas u otros factores de inflamación. Las escorpaminas llegan rápidamente a la circulación general y si son provenientes de especies muy venenosas, en minutos pueden matar a mamíferos pequeños (Charry, 2006). Finalmente, hay que recordar que el veneno de escorpión genera una liberación masiva de neurotransmisores que

conduce a una hiper-estimulación del sistema nervioso autónomo. Los efectos netos son neurotoxicidad y cardiotoxicidad, y son debidos a la acción directa de las catecolaminas y acetilcolina, lo que explica las manifestaciones clínicas del envenenamiento y da las bases para su tratamiento racional (Coronado, Alvarado, & Dutari, 2008; Pereañez & Vargas, 2009).

Gran parte de los esfuerzos por conocer los mecanismos de acción del veneno de escorpión han estado motivados por el riesgo que este representa para la salud humana, y la necesidad de tener un antídoto eficaz para mitigar los daños producidos

Figura 3 Morfología externa de un escorpión: A. vista dorsal; B. vista ventral.



Fuente: Vargas, 2008

por las toxinas (de Roodt et al., 2010; Pereañez & Vargas, 2009). En los últimos años se ha dado importancia a otros aspectos de la actividad biológica; tanto así que se han logrado identificar péptidos con acción sobre agentes bacterianos, virus, protozoarios, levaduras, hongos e insectos (Escobar et al., 2008; Ramos & Escobar, 2007; Rivera et al., 2010; Escobar et al., 2003); con lo que se deja al descubierto el potencial biotecnológico presente en el veneno de escorpión.

5.3. CARACTERIZACIÓN PROTEICA

5.3.1. Cromatografía. La *cromatografía* es un potente método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Esta facilita la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve con una *fase móvil* (gas, líquido o fluido supercrítico) la cual se hace pasar a través de una *fase estacionaria* (fija en una columna o en una superficie sólida), en donde aquellos elementos afines con la fase estacionaria se desplazarán más lento que aquellos afines a la fase móvil (Douglas, Skoog, Holler, & Nieman, 2008).

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más utilizada. Dentro de las razones de su popularidad se encuentra su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles entre otras. Algunos ejemplos de estos materiales son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides (Douglas et al., 2008). La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se ha establecido como la técnica principal para el análisis y purificación de una amplia gama de moléculas. En particular, la HPLC en sus diversas formas se ha convertido en el centro de la técnica en la caracterización de péptidos y proteínas, esta desempeña un papel fundamental en los avances de las ciencias biológicas y biomédicas (Aguilar, 2004).

5.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida. La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida es una herramienta útil para el análisis de mezclas complejas de proteínas. Esta técnica, descrita originalmente por O'Farrell, separa las proteínas en base a su punto isoeléctrico (pI) en la primera dimensión y según su masa molecular aparente en la segunda. En la primera dimensión las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, lo que define su punto isoeléctrico (Souto & María, 2009).

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; al igual que se emplea en la determinación del peso molecular de subunidades de proteínas. El SDS desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (Pérez, 2000).

5.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.4.1. Actividad fosfolipasa A2. Los lípidos son un conjunto de moléculas con una gran diversidad estructural y funcional. Se les agrupa en la misma categoría porque a pesar de ser en grupo tan diverso todos contienen estructuras ricas en Carbono e Hidrógeno, lo que les confiere una muy baja solubilidad en ambientes acuosos. En especial un tipo de lípidos, los fosfolípidos, tienen un carácter anfipático lo que significa que tienen regiones hidrofílicas (solubles en agua) e hidrofóbicas (insolubles en agua), que les permite cumplir con una de sus principales funciones en las células, ser un componente fundamental de las membranas biológicas. Las funciones que llevan a cabo los lípidos son muy diversas lo cual es un reflejo de su diversidad estructural, algunas de las funciones más importantes de estas biomoléculas son: ser constituyentes fundamentales de las membranas biológicas y componente de las lipoproteínas. Son fuentes muy importantes de energía, están involucrados en el reconocimiento celular, y

actúan como hormonas, o mensajeros intercelulares, entre otras (Flores Herrera et al., 2005; Valdés Rodríguez, Bilbao Díaz, León Álvarez, & Merchán González, 2002; García Morín et al., 2010).

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan enlaces éster específicos que conectan los ácidos grasos con el glicerol en las moléculas de fosfolípidos (García Morín et al., 2010; Flores Herrera et al., 2005). Las fosfolipasas A2 (FLA2) forman una familia de enzimas claves en el recambio de los fosfolípidos de membranas y en la generación de diversas sustancias bioactivas: liso-fosfolípidos, ácidos grasos libres y mediadores lipídicos de la inflamación. Existen 2 grandes clases, las FLA2 intracelulares o citosólicas (FLA2c), las cuales presentan una masa molecular elevada (40-85 kDa), se encuentran en la fracción citosólica de prácticamente cualquier tipo celular, poseen un dominio de unión a la membrana dependiente de Ca_2^+ y parecen tener preferencia por fosfolípidos que contienen ácido araquidónico en la posición 2; su participación parece ser crucial en la formación de vesículas provenientes del complejo de Golgi (Flores Herrera et al., 2005; Valdés Rodríguez et al., 2002); y las FLA2 de secreción (FLA2s), de masa molecular pequeña (14 - 18 kDa). Las formas extracelulares de las FLA2 son extremadamente abundantes en las secreciones de las glándulas exocrinas como páncreas y glándulas venenosas de serpientes, abejas, escorpiones, en los cuales cumplen función neurotóxica, miotóxica, anticoagulante, entre otras (Valdés Rodríguez et al., 2002; García Morín et al., 2010).

5.4.2. Actividad proteasa. Las proteasas constituyen un grupo de proteínas que tienen la capacidad de hidrolizar otras proteínas e incluso a ellas mismas (Carrasco, 1996); estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de otras proteínas. Cada proteasa es específica de grupos particulares de péptidos, puesto que en su estructura cuentan con una oquedad diseñada para cadenas de péptidos concretas (McGilvery, 1977). Las proteasas al ser enzimas degradativas logran controlar a nivel celular procesos biológicos esenciales (Möller, Vanderweit, Bubis, & Marí, 2013). Las formas extracelulares de las proteasas se presentan generalmente en glándulas exocrinas como páncreas y glándulas venenosas de serpientes, arañas y escorpiones, ejercen efectos fisiológicos sobre la presa necesarios para la captura y digestión, al tiempo que

son responsables del daño local en los accidentes por emponzoñamiento (Chulluncuy & Enrique, 2014; Möller et al., 2013).

Las serín proteasas son una clase de enzimas proteolíticas que se caracteriza por la presencia de una cadena lateral de serina única y reactiva. Son comunes en diferentes organismos y con funciones diversas (Kraut, 1977). Los efectos tóxicos promovidos por las serín proteasas en venenos están relacionados principalmente a sus acciones en la hemostasia, actuando en varios componentes de la cascada de coagulación, la fibrinolítica y el sistema de calicreína-quinina, lo que lleva a un desequilibrio hemostático en presas. La gran mayoría son capaces de promover la coagulación de la sangre y se asemejan al menos parcialmente a la trombina, una proteasa multifuncional con papel esencial en la coagulación (Menaldo et al., 2013). Por su parte las metaloproteinasas son los principales responsables de la actividad hemorrágica y el desequilibrio del sistema hemostático, característico de los venenos serpientes y arañas. Estas enzimas dependientes de zinc actúan mediante la degradación de componentes de la membrana basal en la micro-vasculatura, causando la ruptura de las paredes de los vasos capilares y en consecuencia promover la derramamiento de sangre en el organismo (Bernardes et al., 2013).

Las serín y metaloproteasas se describen bien en varios los venenos de animales, sobre todo en especies de serpientes, también se encuentran en el veneno de las rayas, medusas y serpientes de mar (Möller et al., 2013).

5.4.3. Actividad antibacteriana. Las bacterias son microorganismos unicelulares que pueden diferenciarse por su capacidad para retener un colorante básico (violeta cristal) después de su fijación con yodo y decoloración con alcohol (reacción de Gram), y se dividen en grampositivas y gramnegativas (tabla 1). Las grampositivas conservan el colorante, a causa de los ácidos teicoicos que contienen en sus paredes celulares, en tanto que las gramnegativas se decoloran con el alcohol y después se colorean de rojo con safranina, debido a que tienen una membrana externa adicional que contiene lipopolisacáridos (endotoxina) (Cué Brugueras & Morejón García, 1998).

Tabla 1 Clasificación de algunas bacterias según la tinción de Gram

Grampositivos	Gramnegativos
<i>Cocos</i>	<i>Cocos</i>
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Neisseria sp.</i>
<i>Streptococcus beta</i>	<i>Bacilos</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Viridans</i>	<i>Francisella tularensis</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Pneumococcus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bacilos</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacillus anthracis jejuni</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella sp.</i>

5.4.4. Péptidos antibacterianos. Son sustancias capaces de actuar sobre microorganismos (bacterias, hongos, paracitos entre otros) suprimiendo su crecimiento o causándoles la muerte; estas sustancias a su vez actúan de manera selectiva y a bajas concentraciones (Vargas Muñoz, 2013). Los agentes antibacterianos se clasifican según su efecto sobre las bacterias en bacteriostáticos y bactericidas (Tabla 2), esto depende de si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lisar la bacteria, respectivamente. Esta clasificación es bastante inexacta, debido a que se genera una variación del modelo dependiendo del tipo de germen y de la concentración del antibiótico (Cué Brugueras & Morejón García, 1998).

Tabla 2 Distribución de algunos antibióticos según su acción sobre las bacterias

Bactericidas	Bacteriostáticos
Betalactámicos	Amfenicoles

Bactericidas	Bacteriostáticos
Aminoglucósidos	Lincosamidas
Glicopéptidos	Macrólidos
Quinolonas	Sulfamidas
Rifampicinas	Tetraciclinas

Los péptidos antimicrobianos son considerados como un componente importante del sistema de defensa innata de una gran variedad de organismos eucariotas, incluyendo a los seres humanos, las plantas e insectos. Este grupo de péptidos son considerados como primitivos en su naturaleza y mecanismo de acción, ya que son unos de los primeros mecanismos en evolucionar en la naturaleza, puesto que carecen de objetivos específicos, y se dan a través de la síntesis y secreción, luego del ingreso de los agentes invasores al organismo como resultado de las presiones del medio ambiente (Almaaytah & Albalas, 2014).

Se ha encontrado en venenos de serpientes, escorpiones, arañas y abejas, péptidos con actividad antimicrobiana sobre bacterias gram positivas y gram negativas (Perumal Samy et al., 2007); un ejemplo son las péptidos aislados del veneno de *Hadrurus gertschi* (hadrurina), *Vejovis mexicanus* (vejovina) (Sánchez-Vásquez et al., 2013), *Heterometrus spinifer* (HsAp) (Nie et al., 2012) y *Pandinus imperator* (Pantinina 1-3) (Zeng et al., 2013), las cuales muestran tener actividad sobre una amplia gama de microorganismos (tabla 3).

5.5. PÉPTIDOS NEUROTÓXICOS

Las neurotoxinas presentes en venenos de escorpión han desarrollado una bioactividad específica, dirigida a atacar e inmovilizar presas y defenderse contra depredadores. Además el efecto sinérgico de algunas toxinas en el veneno ha permitido que este sea

eficaz en una amplia gama de organismos, tanto así que el veneno de una sola especie de escorpión puede contener toxinas dirigidas preferentemente a invertebrados y otras únicamente vertebrados (Bosmans & Tytgat, 2007; Garcia, Tanowitz, & Del Brutto, 2013).

Las toxinas del veneno de escorpión actúan sobre los canales iónicos (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}) presentes en las membranas neuronales, un ejemplo de ellos son las α -toxinas KTx encontradas en un gran grupo de escorpiones, que actúan sobre los canales de potasio y que a su vez se encuentran relacionadas con la boactividad, puesto que aumentan o disminuyen la permeabilidad de iones en la membrana, alterando el impulso nervioso y generando las manifestaciones clínicas. De igual manera se debe mencionar que estas toxinas están siendo utilizadas como modelos experimentales en la investigación de tratamientos en enfermedades del sistema inmune, desórdenes neurológicos y gliomas cerebrales, entre otras (Garcia et al., 2013; Miyashita, Otsuki, Hanai, Nakagawa, & Miyagawa, 2007; Joseph & George, 2012).

5.6. ANTECEDENTES

Colombia cuenta con un aproximado de 70 especies de escorpiones, distribuidas en 4 familias (*Buthidae*, *Chactidae*, *Diplocentridae* e *Ischnuridae*), en donde el principal exponente es la familia *Buthidae* con un poco más de la mitad de las especies (Gómez & Otero, 2007)

Uno de los géneros más importantes de la familia *Buthidae* es el género *Centruroides*, el cual en el nuevo mundo es considerado taxonómicamente como uno de los más complejos. Entre los pocos registros que se tienen sobre su distribución se destaca el informe realizado por Sissom & Lourenco (1987), en donde presentan el estado de la diversidad del género *Centruroides* en las américas, reportando el rango de dispersión de *Centruroides margaritatus* y *Centruroides gracilis*, desde la parte sur de Norte América hasta el norte de Sur América (Colombia, Perú, Ecuador). Más adelante,

Armas et al., (2011), reorganizan la distribución e identificación taxonómica de *Centruroides margaritatus* y vuelven a dar validez a *Centruroides edwardsii*, ubicando a *C. margaritatus* en la zona noroccidental de sur américa (Colombia, Ecuador, Perú), con algunas poblaciones en Cuba y Jamaica; *C. edwardsii* en todo centro américa y la parte norte de Suramérica (Colombia). De Armas et al., (2012) organizaron la distribución de *Centruroides edwardsii*, *Centruroides margaritatus* y *Centruroides gracilis* en territorio colombiano, junto con la descripción de una nueva especie, *Centruroides sanandres*.

Desde el punto de vista bioquímico, a la fecha son varias las evaluaciones que se han realizado sobre las toxinas producidas por el género *Centruroides*; un ejemplo es el caso de Escobar et al., (2003), los cuales caracterizaron algunos péptidos del veneno de *Centruroides margaritatus*, enfocando el trabajo y análisis en la actividad biológica; de igual manera Escobar et al., (2008) realizaron la búsqueda de un péptido antibacteriano en el veneno de *C. margaritatus* y *Hadruroides mauryi*. Por otro lado Rivera et al., (2010), realizaron una evaluación similar en la actividad antimicrobiana en *C. margaritatus*. En ambos trabajos no solo se confirmó la acción antimicrobiana del veneno, sino también la ausencia de actividad hemolítica en las toxinas de ambos escorpiones. También se ha trabajado con el veneno de otras especies en el mismo género, tal es el caso de Dehesa-Dávila et al (1996) los cuales realizaron una comparación estructural y funcional del veneno de *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* y *Centruroides noxius*, encontrando una gran similitud entre las toxinas de estas especies, dando un enfoque especial a aquellas cuya toxicidad es específica para mamíferos. Además, compararon las toxinas para otros grupos taxonómicos, como por ejemplo crustáceos, siempre teniendo en cuenta los péptidos que alteran las dinámicas neuronales en cada individuo.

En Colombia, el trabajo con escorpiones ha estado encaminado principalmente en aspectos eco-epidemiológicos, describiendo de manera general, las especies que representan un riesgo para la comunidad, los niveles de incidencia en cuanto a escorpionismo se refiere, la gravedad de los casos reportados y zonas del país en donde es frecuente la problemática (Charry, 2006; Gómez et al., 2010; Gómez & Otero,

2007; Otero et al., 2004). En una investigación relacionada con la evaluación del potencial biológico solo se han realizado dos trabajos, el primero es una determinación histopatológica del veneno de *Tityus pachyurus* realizado por Barona et al., (2004), en donde se demuestra que las toxinas producidas por esta especie presentan un bajo efecto citotóxico y necrotizante, convirtiendo los trastornos hemodinámicos y el gasto cardiaco en su principal herramienta de ataque en mamíferos, característica que comparte con varios miembros de la familia Buthidae. En el segundo trabajo desarrollado por García Núñez, (2012), se evaluó el efecto del veneno de *C. margaritatus* sobre la proliferación celular *in vitro*, y se destaca que no presentan toxicidad y que por el contrario; podría presentar un efecto mitogénico incrementando la proliferación celular a una concentración de 800 ng/ μ L. Con esta evidencia se deja claro que en el país la investigación en el tema es escasa, y supone una alternativa viable en la búsqueda de principios activos para su posible bioprospección.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. COLECTA Y DETERMINACIÓN TAXONÓMICA

En las dos salidas de campo realizadas a la vereda rincón de chipalo en el municipio de Alvarado. Se capturaron 35 escorpiones, de los cuales 7 fueron por búsqueda en rocas y troncos durante el día y 28 en presencia de luz ultravioleta. Los escorpiones se identificaron como *Centruroides edwardsii* teniendo en cuenta las comparaciones morfológicas realizadas en la colección (tabla 4).

En la diagnosis de *Centruroides edwardsii* en Antioquia y Tolima se encontró son presentan un tamaño moderado a grande (63-105 mm de longitud total). De coloración marrón amarillento oscuro (rara vez un poco más clara) en el carpacho, los terguitos I-VI, el segmento metasomal V, telson y pinza del pedipalpo; con una coloración más clara en el resto del cuerpo (en ocasiones casi del mismo color del carpacho, sin embargo las carenas (quillas) del metasoma y los pedipalpos contrastan por ser más oscuras que el color de base (Fig. 6).

Presentan abundante granulación, de tamaño variable en carapacho y terguitos. Segmentos del metasoma con consistencia coriácea, con quillas fuertes y denticuladas. Pedipalpos hirsutos, principalmente en la parte interna de fémur, patela y pinza; mano con la quilla dorsal marginal principalmente lisa y pilosa; dedo fijo con ocho hileras principales de dentículos; y lóbulo basal del dedo móvil bien desarrollado. Peines con 25 a 29 dientes en las hembras (moda 27) y 27 a 31 (moda 28 y 29) en los machos (Tabla 5). Metasoma: segmentos II-IV con tres o más pares de macrocerdas ventrolaterales; telson con tubérculo subaculear pequeño, próximo a la base del agujón y dirigido a la base de este. Descripción que concuerda lo reportado para la especie (Armas et al., 2011; de Armas et al., 2012).

Tabla 3 Actividad antimicrobiana de péptidos aislados del veneno de 4 escorpiones.

Microorganismos	Especies					
	<i>Heterometrus spinifer</i>	<i>Hadrurus gertschi</i>	<i>Vejovis mexicanus</i>	<i>Pandinus imperator</i>		
	HsAp	Hadrurina	Vejovina	Pantinina 1	Pantinina 2	Pantinina 3
Baterias gram-negativas						
<i>E. coli</i>	+	+/-	+/-	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	NE	NE	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	NE	NE	NE	NE	NE
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	NE	NE	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	NE	NE	+	+	+
Bacterias gram-positivas						
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	NE	NE	+	+	+
<i>Bacillus magaterium</i>	+	NE	NE	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	NE	NE	NE	NE	NE
Hongos						
<i>Candida tropicalis</i>	+	NE	NE	+	+	+

+ = con actividad antimicrobiana, - = sin actividad antimicrobiana, NE = no evaluada. (Nie et al., 2012; Zeng et al., 2013; Sánchez-Vásquez et al., 2013)

Tabla 4 Mediciones (mm) de *Centruroides edwardsii* de dos departamentos (Antioquia y Tolima) Colombia.

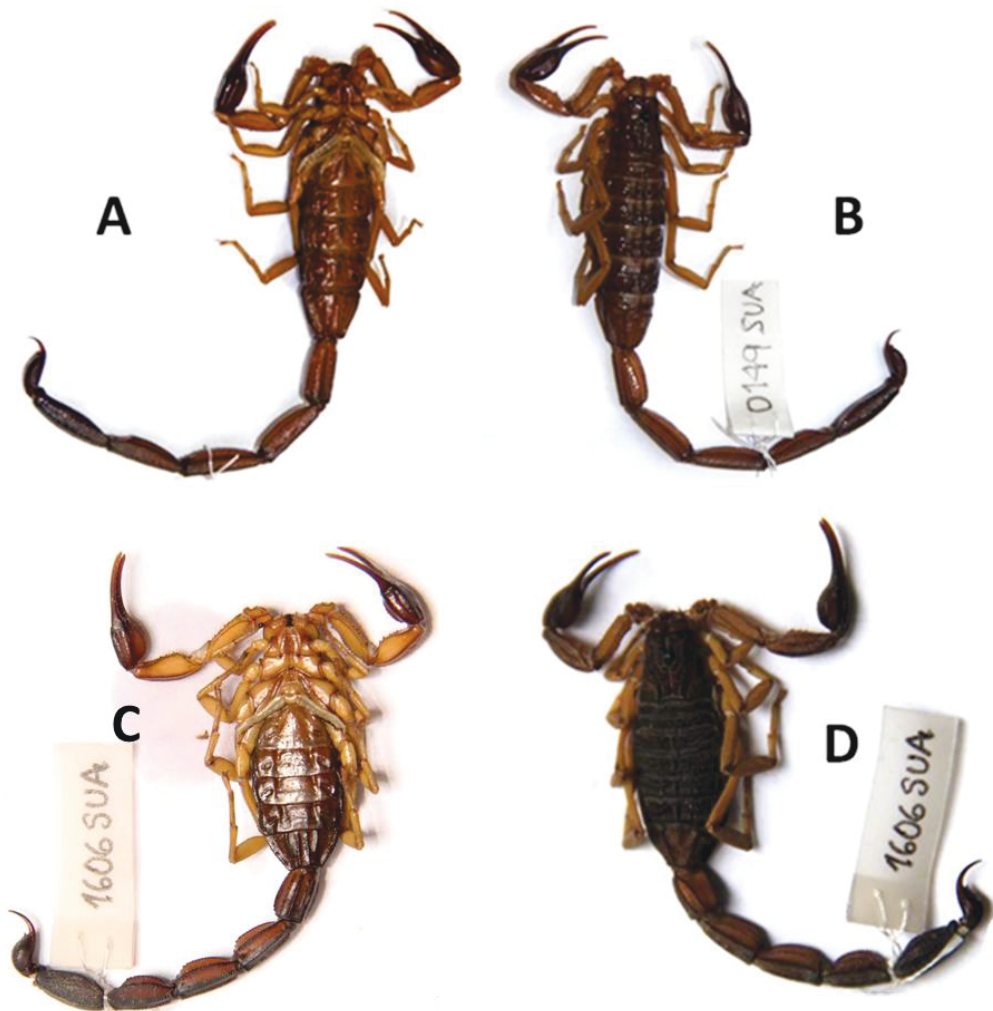
Caracteres	Hembras	Machos
Carpacho L/A	8.0/8.5	8/8.4
Pedipalpo L	30	36.9
Fémur L/A	7.2/2.5	8.9/2.4
Patela L/A	7.7/2.9	9.1/2.9
Pinza L	13.2	16.2
Mano L/A/H	5.1/4.2/3.6	6.5/4.8/4
Dedo movil L	8,6	9.8
Mesosoma L	19,2	23
Terguito VII L/A	5.4/8.5	6.5/8.2
Metasoma L	38.9	58.4
I L/A	6.3/4.9	9.2/4.5
II L/A	7.6/4.7	11.1/4.3
III L/A	8/4.7	11/4.2
IV L/A	8.3/4.6	11.7/4.2
V L/A/H	8.3/4.2/3.7	12.4/4/3.7
Telson L	7.3	8.2
Vesícula L/A/H	4.7/3.1/2.8	6.1/3.7/2.8
Total L	66.4	92.2

Tabla 5 Variación de la cantidad de dientes pectíneos en *Centruroides edwardsii* en los departamentos de Antioquia y Tolima Colombia. D.E., desviación estándar; N, cantidad de peines examinados; X, media aritmética.

Sexo	N	Número de dientes pectíneos							\bar{X}	D.E.
		25	26	27	28	29	30	31		
♀	39	3	6	14	10	6			27,3	1,1
♂	50			3	18	18	10	1	28,8	0,9

No se encontró diferencia en el tamaño de las estructuras de los individuos entre las regiones, con lo que se establece que ambas poblaciones de *Centruroides edwardsii* mantienen características morfológicas similares, aun cuando el flujo genético entre las mismas es mínimo por las limitaciones geográficas y biológicas para esta especie. sin embargo se debe aclarar que la información correspondiente a los especímenes colectados es insuficiente para establecer si existe o no diferencia morfológica entre ambas localidades, lo anterior teniendo en cuenta que el número de especímenes utilizados en las mediciones fue limitado, esto debido al riesgo que representaba la manipulación de los escorpiones, y que estos no fueron sacrificados porque eran necesarios para obtener el veneno, es por este motivo que se presentan los valores promedio de los caracteres para *Centruroides edwardsii* agrupando ambos departamentos (Tabla 4). No obstante, se evidenció una clara diferencia en los caracteres sexuales, dados por el tamaño de algunas estructuras (pedipalpo, metasoma, número de dientes pectíneos) y por patrón de coloración puesto que las hembras tienden a tener un color más oscuro (Fig. 6). Estas diferencias podrían estar dadas por adaptaciones reproductivas que les ayuden mejorar su eficacia en el cortejo y reducir las posibilidades de ser predado al terminar la copula en el caso de los machos, ya que al tener los machos pedipalpos y segmentos metasomales más largos le permitiría mantener una distancia “segura” de la hembra, al tiempo que le estimula el cuerpo con su aguijón en la danza previa al apareamiento (Polis, 1990)

Figura 4 *Centruroides edwardsii* A-B macho; C-D hembra.



Fuente: Grupo de Ofidismo/escorpionismo Universidad de Antioquia.

6.2. CARACTERIZACIÓN DEL VENENO

Cada escorpión tuvo una producción de veneno crudo aproximada de 500 μ g, dando como resultado una producción total de ~20 mg de veneno liofilizado. Solo 40 mg de veneno liofilizado se utilizaron en las pruebas de laboratorio, el veneno restante se conserva a -80 °C en las instalaciones de GIPRONUT en la Universidad del Tolima.

En el perfil cromatográfico por HPLC realizado al veneno de *Centruroides edwardsii*, se encontraron aproximadamente de 50 picos cromatográficos a una longitud de onda de 215 nm, de estos se recogieron los más representativos para ser evaluados en electroforesis bajo condiciones denaturantes (Fig. 7). En la PAGE-SDS del veneno crudo y las fracciones recolectadas de la cromatografía por HPLC del veneno se encontró que los componentes de mayor abundancia corresponden a péptidos de bajo peso molecular (< 10 kDa) (Fig. 8), un ejemplo de ello son las fracciones con tiempo de retención 28,6, 47, 57 minutos, las cuales presentan la mayor señal dentro de los componentes y su peso molecular no supera los 10 kDa. Este perfil electroforético concuerda con lo reportado en otros estudios para especies de este mismo género, donde el componente peptídico del veneno es de bajo peso molecular y en este rango es donde frecuente mente se encuentran las toxinas encargadas de la actividad biológica, generalmente sobre canales iónicos de células nerviosas (Bernardes et al., 2013; Dehesa-Dávila et al., 1996; García, Becerril, Selisko, Delepierre, & Possani, 1997; Vargas, 2008; Menaldo et al., 2013).

6.3. ACTIVIDAD DEL POTENCIAL BIOLÓGICO

El potencial biológico del veneno crudo de *Centruroides edwardsii* no presentó actividad proteasa en dosis de 500 μg y 250 μg ($p \leq 0,1236$); el resultado de la actividad indica que la ponzoña no contiene proteasas, asociadas a la activación de las cascadas de coagulación, actividad fibrinolítica, desbalance hemostático o predigestión de las presas, como si se evidencia en venenos de algunas serpientes y arañas (Foradori, Keil, Wells, Diem, & Tillinghast, 2001; da Silveira et al., 2007; Bernardes et al., 2013; Menaldo et al., 2013); Sin embargo, hay evidencia de proteasas en venenos de escorpión pertenecientes a la familia *Buthidae* como es el caso del *Tityus discrepans*, en el cual encontraron serin y metaloproteasas asociadas ambas en la actividad fibrinolítica, y su efecto anticoagulante (Brazón, Guerrero, D'Suze, Sevcik, & Arocha-Píango, 2014). Este a su vez podría ser utilizado como fármaco para evitar la formación de trombos.

No obstante, este resultado guarda relación con los antecedentes biológicos y clínicos presentados para *Centruroides edwardsii*, puesto que no han sido reportados casos en donde el accidente por su picadura genere necrosis, hemorragia, coagulopatias, o fallo renal posterior a la picadura, a diferencia del veneno de algunas serpientes en donde sí se presentan este tipo de afecciones (Gutiérrez & Chaves, 1980; Lomonte & Gutiérrez, 1983; Otero, Osorio, Valderrama, & Giraldo, 1992; Matsui, Fujimura, & Titani, 2000; Bernardes et al., 2008).

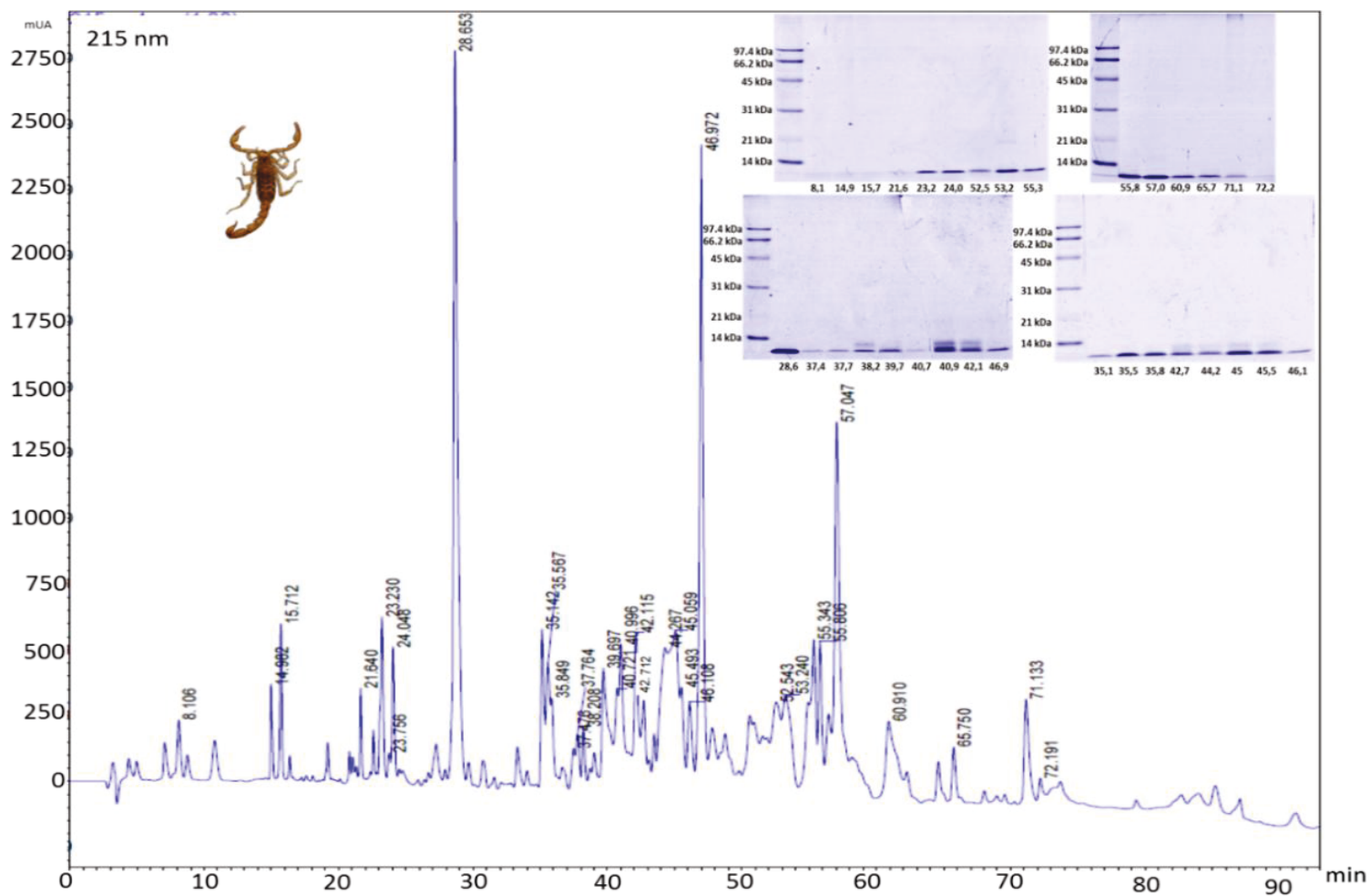
Tabla 6 Actividad antibacteriana del veneno de *Centruroides edwardsii* en bacterias Gram + y Gram a diferentes dosis.

Bacterias		Concentración (ppm)	
		2500	1250
Gram +	<i>Bacillus sp.</i>	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Pseudomona sp.</i>	-	-
	<i>Salmonella sp.</i>	-	-
	<i>klebsiella sp.</i>	-	-

(+) Inhibición de crecimiento bacteriano; (-) sin inhibición de crecimiento. Fuente: autor

El veneno de *Centruroides edwardsii* no presentó inhibición del crecimiento en bacterias Gram positivas y Gram negativas ($p \leq 0,1309$; Tabla 7); sin embargo, no se deben descartar otras formas de actividad antibiótica (comentarlas y citarlas), puesto que de *Centruroides edwardsii* no se tiene información de este tipo, pero en otros escorpiones (butidos y no-butidos) se han encontrado péptidos eficaces en el control de agentes infecciosos como virus, hongos, bacterias y parásitos (Chen et al., 2012; Almaaytah & Albalas, 2014), como es el caso de *Centruroides margaritatus* (recientemente separada taxonómicamente de *Centruroides edwardsii*) en el cual encontraron un péptido antibacteriano aislado de su veneno el cual inhibe el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y

Figura 5 Perfil cromatográfico del veneno de *Centruroides edwardsii* (0,5 mg) por RP-HPLC. En la cromatografía se monitorizó a 215 nm.



Fuente: Autor

Serratia marcencens (Rivera et al., 2010), información que alienta a realizar futuras evaluaciones para generar una confirmación de la actividad con otros modelos bacterianos sobre este tipo de actividad.

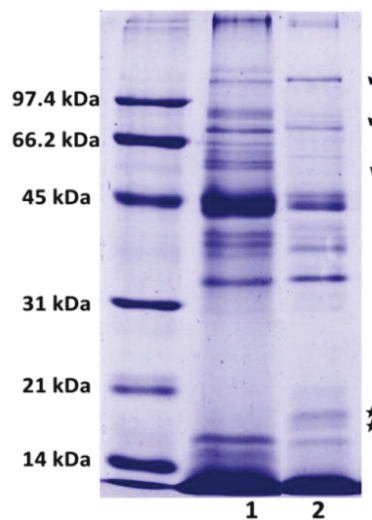
En el ensayo de acción fosfolipasa (Fig. 9) y la prueba de hemólisis sin enriquecimiento con cloruro de calcio (CaCl_2) ni yema de huevo, no se encontraron diferencias significativas con control negativo ($p \leq 0,095$ y $p \leq 0,105$), lo que asociado con los resultados de la actividad antibacteriana y proteolítica indicaría que de manera preliminar el veneno de *Centruroides edwardsii* no interviene en la pre-digestión enzimática o en la protección de inmune contra patógenos.

Por otro lado, en la prueba de hemólisis indirecta (con yema de huevo y CaCl_2) se generó un halo de actividad en las diferentes dosis sobre las que fue evaluada (Fig. 10; $p \geq 0,0001$); estableciendo la dosis hemolítica mínima (DHM) en 3,01 mg; la DHM encontrada indicaría que la actividad hemolítica mediada por la presencia de un cofactor podría darse a razón de la liberación de liso-fosfolípidos al medio como consecuencia de la acción de fosfolipasas A_2 dependiente de Ca^+ en el veneno (Fuentes, Hernández, Nieto, & Sánchez Crespo, 2002). Sin embargo, se deja abierta la discusión del por qué la prueba de fosfolipasa inicial no tuvo actividad y por el contrario en la hemólisis indirecta si la presentó aun cuando ambas estaban en presencia del cofactor. Una posibilidad para explicar este fenómeno podría ser la diferencia en los tiempos de incubación de ambos métodos, puesto que no se conoce la proporción de fosfolipasas que hay respecto al veneno crudo, y en ese caso un mayor tiempo de incubación permitiría que dicha actividad se evidenciara con mayor facilidad.

La presencia de FLA2 en el veneno estaría justificada con su participación en el síndrome de diestres respiratorio e inflamación (Valdés Rodríguez et al., 2002), los cuales son síntomas que hacen parte de cuadro clínico reportado para el accidente escorpiónico con *Centruroides edwardsii*. A su vez, la actividad de estas FLA2 podría estar involucrada con la proliferación celular, puesto que de manera natural se les asocia en los procesos de comunicación y señalización celular. Por otro lado, se ha mencionado para el veneno de *Centruroides gracilis*, que no presenta inhibición de la proliferación celular in vitro, de igual manera presentan que a dosis altas de veneno se

presentaba un incremento en el número de células, lo que podría considerarse como un efecto mitogénico (García Núñez, 2011), siendo este motivo de discusión para futuras evaluaciones, ya que con la información actual no es posible generar una conclusión acertada sobre los mecanismos de acción específicos de las FLPA₂ presentes en el veneno.

Figura 6 Perfil del veneno crudo de *Centruroides edwardsii* en gel a 12 % SDS-PAGE, observado por tinción de azul de comassie. El veneno se cargó a una concentración de 3 g / mL (1), 1,5 g / mL (2).

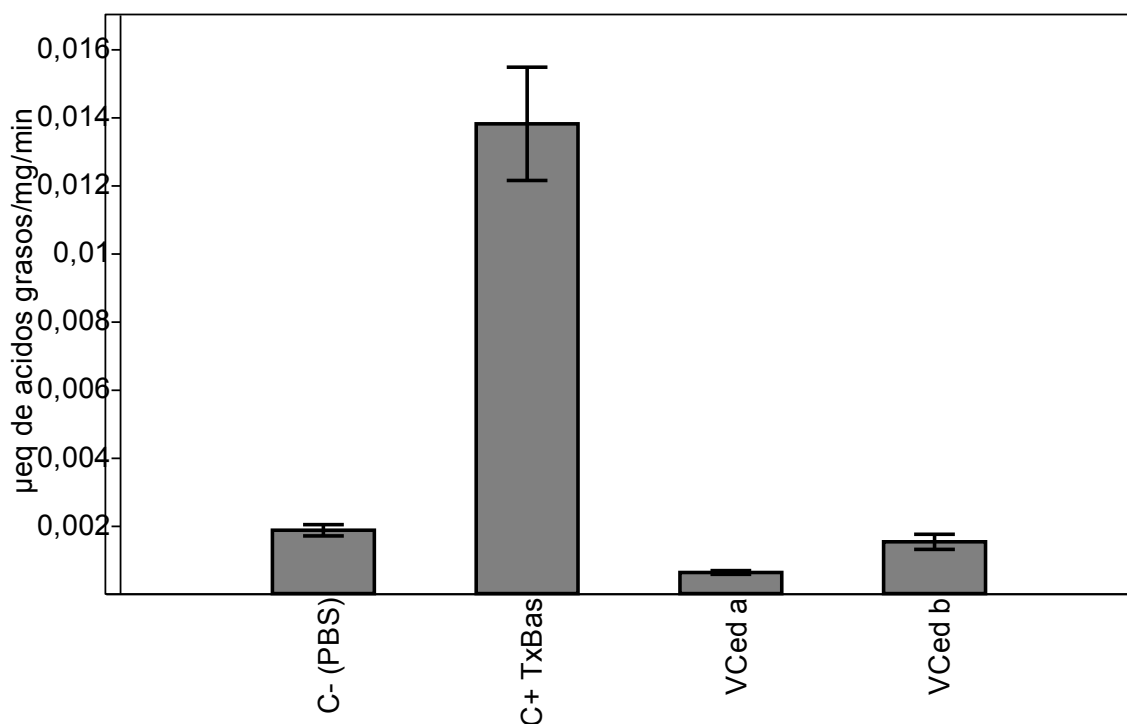


Fuente: Autor.

Aun cuando el veneno no mostró actividad antibacteriana o proteolítica, puede presentar componentes asociados a degradación tisular o defensa contra patógenos; puesto que para *Centruroides edwardsii*, y en general para los escorpiones colombianos, la información sobre los aspectos biológicos y ecológicos es insuficiente. La presencia de fosfolipasas en el veneno implica que es necesario realizar estudios que permitan establecer cuál es su relación con la capacidad neurotóxica, citotóxica, cardiotóxica, así como el potencial mitogénico (García Morín et al., 2010; García Núñez, 2012; Lee, Simonyi, Sun, & Sun, 2011), o desempeñarse como precursores de cascadas de señalización celular (Valdés Rodríguez et al., 2002). A su vez se debe mencionar que desde ya casi dos décadas se ha analizado la margarotoxina, aislada del veneno de *Centruroides margaritatus*, la cual ha demostrado tener una fuerte

afinidad como inhibidor de los canales de potasio dependientes de voltaje (García-Calvo et al., 1993), y con ello ha sido objeto de experimentación, investigado su papel como modulador en la liberación de neurotransmisores (Fischer & Saria, 1999), y como inmunosupresor (García et al., 1996). Además de ello no se descarta que esta margarotoxina descrita pertenezca a *Centruroides edwardsii* y no ha *Centruroides margaritatus* como se ha reportado, puesto que recientemente ambas especies fueron separadas a nivel taxonómico, y es *Centruroides edwardsii* la de mayor distribución en el continente americano (Armas et al., 2011; de Armas et al., 2012).

Figura 7 actividad fosfolipasa A2 del veneno de *Centruroides edwardsii*. C- (PBS); C+: fosfolipasa del veneno de *Bothrops asper*, VCed a: Veneno de *Centruroides edwardsii* (6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); VCed b: Veneno de *Centruroides edwardsii* (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

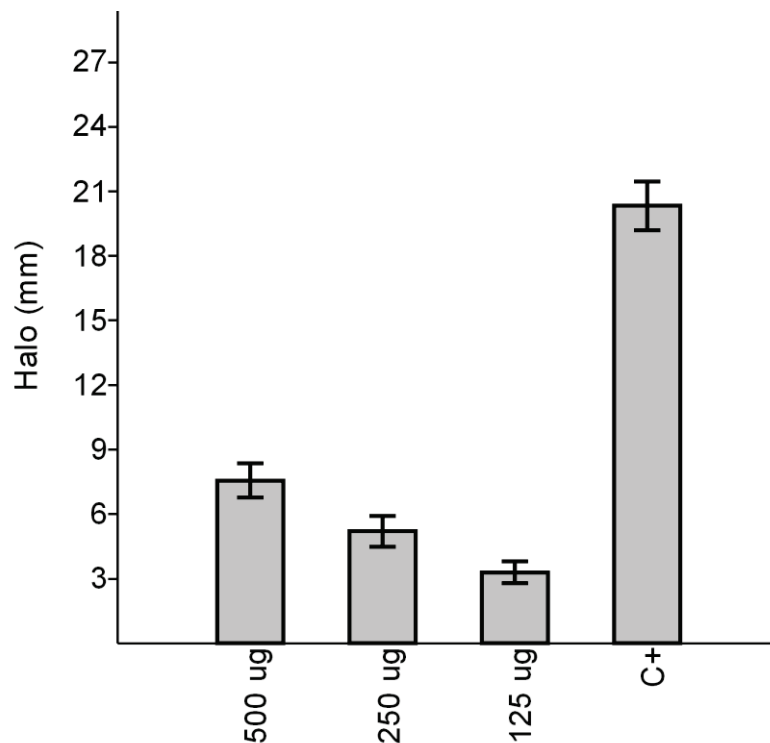


Fuente: Autor.

La investigación en las características del veneno de *Centruroides edwardsii* al igual que el de otros escorpiones no debe cesar aquí, este trabajo tan solo es la base para definir un enfoque claro en el destino para futuras investigaciones. Un ejemplo de ello son las toxinas inhibidoras de los canales de potasio dependientes de voltaje (KTx) en

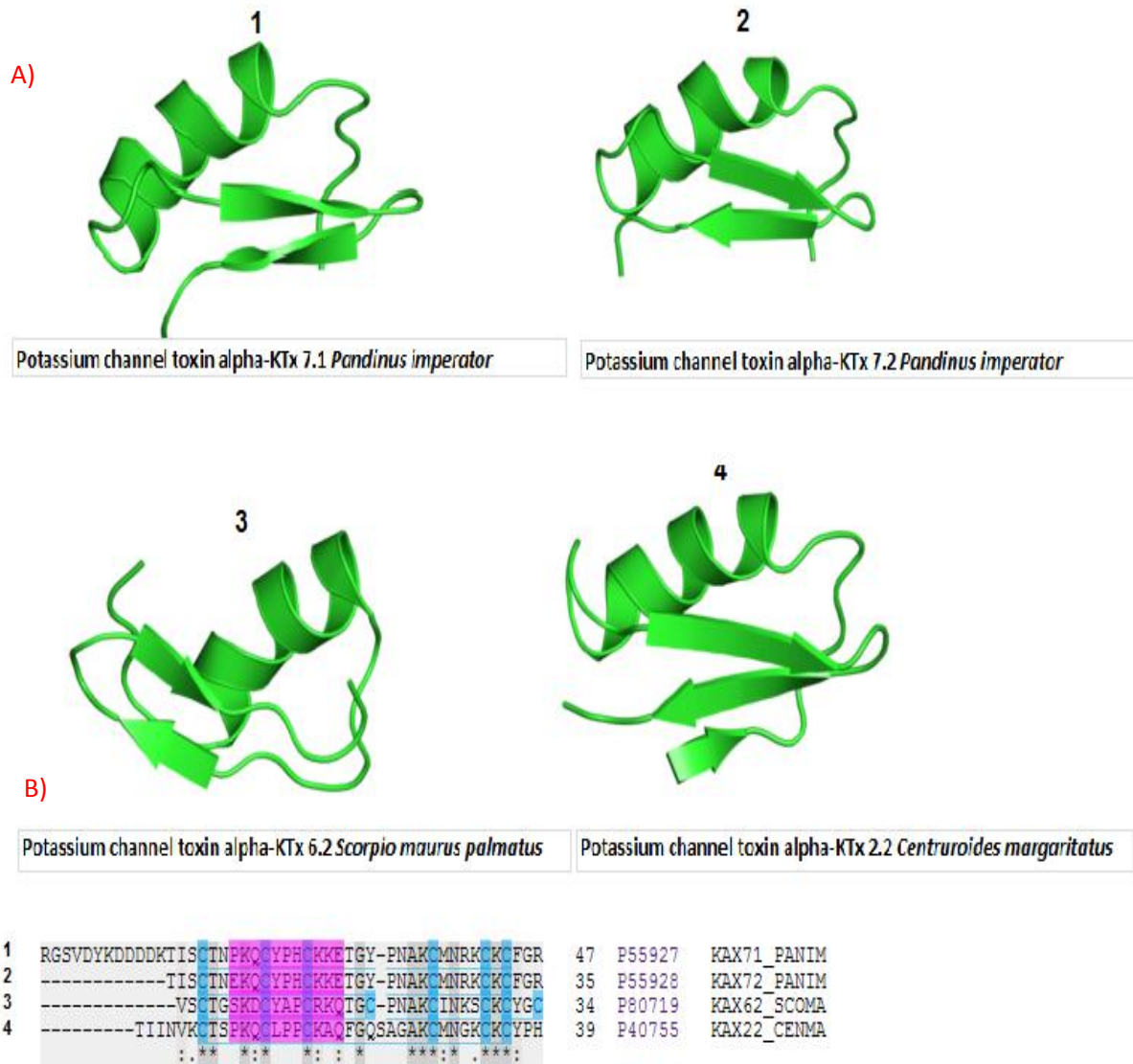
diferentes escorpiones, estas con el paso del tiempo han sufrido cambios en su estructura de acuerdo a cada especie en particular; en la Figura 10 se muestra el secuenciamiento de 4 KTx pertenecientes a *Pandinus imperator*, *Scorpio maurus* y *Centruroides margaritatus* (Garcia, Tanowitz, & Del Brutto, 2013; Miyashita, Otsuki, Hanai, Nakagawa, & Miyagawa, 2007; Joseph & George, 2012), en donde es posible observar que aun cuando son especies diferentes y es evidentemente que la secuencia de cada toxina en particular ha sufrido cambios. Se puede ver que algunos de los componentes más importantes que le dan su forma tridimensional a este grupo de péptidos como lo es la cisteína, se encuentra conservada en cada uno de ellos, tanto en número como en posición. Esta similitud entre las toxinas podría ser aprovechada desde la sistemática molecular, para general un perfil filogenético no solo de estos tres escorpiones, sino de aquellos en los que sea posible encontrar este tipo de toxinas e

Figura 8 Actividad hemolítica de diferentes dosis del veneno de *Centruroides edwardsii*. Control positivo: fosfolipasa dependiente de calcio del veneno de *Bothrops asper*.



Fuente: Autor.

Figura 9 A) Alineamiento y B) comparación estructural de α toxinas de los canales de potasio del veneno de 4 escorpiones depositados en el Proteín Data Bank (PDB). En el alineamiento la coloración azul corresponde a residuos de cisteína, el color fucsia muestra la ubicación de las hélices- α , y la coloración gris son los residuos que presentan homología en los 4 escorpiones.



Fuente: Autor.

Por lo anterior, es necesario conocer la naturaleza de las toxinas, para generar un perfil toxinológico del veneno que pueda asociarse con la biología y ecología de estos

escorpiones, como también para proponer soluciones alternativas a problemáticas actuales a partir de la caracterización del veneno. Por ejemplo, la búsqueda de péptidos insecticidas para el control de plagas en agricultura, o péptidos con potencial terapéutico sobre enfermedades del sistema nervioso, circulatorio, cáncer u otras, e inclusive en el desarrollo de un anti-veneno que mitigue el daño generado por el accidente escorpiónico.

7. CONCLUSIONES

No se encontraron divergencias taxonómicas notables en las poblaciones comparadas de *Centruroides edwardsii* en Antioquia y Tolima aun cuando son poblaciones aisladas alopatricamente, lo que indica que sus características biológicas les permiten adaptarse en diferentes ambientes sin necesidad de cambiar sus características morfológicas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la funcionalidad del veneno de *Centruroides edwardsii* parece estar relacionada con los procesos de inmovilización de las presas por acción de neurotóxicas, y no en la pre-digestión del alimento por procesos enzimáticos.

El veneno de *Centruroides edwardsii* contiene péptidos con actividad hemolítica indirecta, posiblemente por la presencia de fosfolipasas; sin embargo dicha actividad no representa un riesgo para la salud humana por no contener la cantidad de toxina necesaria para generar un daño tisular o hemolítico significativo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la hemolisis indirecta por fosfolipasas, y la información sobre la sintomatología de su accidente, el veneno de *Centruroides edwardsii*, podría ser considerado como una herramienta valiosa en la investigación básica dirigida a problemáticas biomédicas de carácter neurológico.

RECOMENDACIONES

El sustrato más adecuado para mantener los individuos en cautiverio es grava para acuarios de partícula pequeña, puesto que con el cartón la humedad puede generar hongos.

Es conveniente revisar la influencia de las condiciones de evaluación del efecto fosfolítico en las diferentes metodologías, puesto que los resultados pueden estar condicionados por la cantidad de toxinas, el tiempo de incubación u otros factores.

Investigaciones futuras sobre el potencial biológico de veneno de *Centruroides edwardsii*, deberían estar dirigidas a la evaluación de la actividad sobre el sistema nervioso, puesto que por revisión bibliográfica las especies del género *Centruroides* presentan una fuerte afinidad por los canales iónicos dependientes de voltaje.

En investigaciones futuras se podría generar un análisis sistemático, filogenético y ecológico de las población de escorpiones en Colombia, a través del análisis molecular de toxinas homólogas del veneno en las diferentes especies de escorpiones registrados, esto de la mano de otras áreas como la biogeografía y la biología, de tal manera que sea posible obtener un perfil aproximado de la historia de vida de los escorpiones en Colombia.

REFERENCIAS

Aguilar, M. (2004). TM HPLC of Peptides. *Methods in Molecular Biology*, 251, 3–8.

doi:10.1002/0471140864.ps0807s23

Almaaytah, A. & Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. *Peptides*, 51, 35-45.

Alcaldia de Alvarado (2014). *Mapa político del municipio de Alvarado*. Recuperado de http://www.alvarado-tolima.gov.co/mapas_municipio.shtml?apc=bcxx-1-&x=1647394.

Arboleda, E., Meneses, O., & Aguilar, P. (1973). Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. III: El veneno del escorpión de Lambayeque. *Rev.Per.Ent*, 16, 78-82.

Armas, L. D., Teruel, R., & Kovarick, F. (2011). On *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) and closely related species (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius*, 132, 1-16.

Barona, J., Otero, R., de Ofidismo, V. P., & Escorpionismo, F. N. (2004). Aspectos toxicológicos e inmunológicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica*, 24, 42-49.

Bernardes, C. P., Menaldo, D. L., Camacho, E., Rosa, J. C., Escalante, T., Rucavado, A. et al. (2013). Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. *Journal of proteomics*, 80, 250-267.

Bernardes, C. P., Santos-Filho, N. A., Costa, T. R., Gomes, M. S., Torres, F. S., Costa, J. et al. (2008). Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, 51, 574-584.

Bosmans, F. & Tytgat, J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion toxins. *Toxicon*, 49, 142-158.

Brazón, J., Guerrero, B., D'Suze, G., Sevcik, C., & Arocha-Píango, C. L. (2014). Fibrinolytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 168, 62-69.

Cao, L., Dai, C., Li, Z., Fan, Z., Song, Y., Wu, Y. et al. (2012). Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative in vitro and in vivo. *PloS one*, 7, e40135.

Cárdenas, S., Otero, R., Quintana, J., Díaz Cadavid, A., Navío, E., Toro, F., ... & Alagón, A. (2004). Correlación clínica y toxicológica en pacientes con envenenamiento escorpiónico en Colombia. *Iatreia*, 17(2-S), pág-159.

Carrasco, L. (1996). *El virus del SIDA: un desafío pendiente*. (1 ed.) Editorial Hélice.

Charry, H. (2006, December). Accidentes por picadura de escorpión. In *Memorias del primer simposio de Toxinología Clínica " César Gómez Villegas"*. Laboratorios Probiol Ltda. Facultad de medicina Fundación Universitaria San Martín. Bogotá.

Chen, Y., Cao, L., Zhong, M., Zhang, Y., Han, C., Li, Q. et al. (2012). Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *PloS one*, 7, e34947.

Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29, 1279-1303.

Chulluncuy, H. & Enrique, F. (2014). Análisis y purificación de las enzimas proteolíticas presentes en el veneno de *Loxosceles laeta* "Araña del rincón". *UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS*.

Cooper, J. E. (2011). Anesthesia, analgesia, and euthanasia of invertebrates. *Ilar Journal*, 52, 196-204.

Coronado, L., Alvarado, M., & Dutari, J. E. (2008). Características Clínicas y Epidemiológicas del Alacranismo. Periodo 2002-2007. Hospital Del Niño. Panama. *Pediátrica de Panamá*, 36.

Cortolima (2014). *Mapa político del departamento del Tolima*. Recuperado de <http://www.cortolima.gov.co/contenido/cortolima-le-aporta-visi-n-tolima-2025>.

Cué Brugueras, M. & Morejón García, M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14, 347-361.

da Silveira, R., Wille, A., Chaim, O., Appel, M., Silva, D., Franco, C. et al. (2007). Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem.J*, 406, 355-363.

de Armas, L. F., Sarmiento, D. L., & Flórez, E. (2012). Composición del género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae) en Colombia, con la descripción de una nueva especie. *Boletín de la SEA*, 105-114.

de Roodt, A. R., Coronas IV, F., Lago, N., González, M. E., Laskowicz, R. D., Beltramino, J. C. et al. (2010). General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. *Toxicon*, 55, 307-319.

Dehesa-Dávila, M., Ramfrez, A. N., Zamudio, F. Z., Gurrola-Briones, G., Liévano, A., arszon, A. et al. (1996). Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113, 331-339.

Douglas, A., Skoog, R., Holler, A., & Nieman, P. (2008). Principios de análisis instrumental. *México DF, pag*, 157-159.

Escobar, E., Flores, L., & Rivera, C. (2008). Péptidos antibacterianos de los venenos de *Hadruidoidea mauryi* y *Centruroides margaritatus*. *Revista Peruana de Biología*, 15, 139-142.

Escobar, E., Velásquez, L., & Rivera, C. (2003). Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841)(Scorpiones: Buthidae). *Revista Peruana de Biología*, 10, 209-216.

Fischer, H. S. & Saria, A. (1999). Voltage-gated, margatoxin-sensitive potassium channels, but not calcium-gated, iberitoxin-sensitive potassium channels modulate acetylcholine release in rat striatal slices. *Neuroscience letters*, 263, 208-210.

Flores Herrera, O., Rendón Huerta, E., Riveros Rosas, H., Sosa Peinado, A., Vázquez Contreras, E., & Velázquez López, I. (2005). Nuevas funciones para las fosfolipasas y aciltransferasas de fosfolípidos: una breve revisión de las funciones y el metabolismo de fosfolípidos. *Mensaje Bioquímico*, 29.

Flórez, E. (2001). Escorpiones de la Familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. *Biota Colombiana*, 2, 25-30.

Flórez, E. (2012). Escorpiones de la familia Buthidae (chelicerata: scorpiones) de Colombia. *Biota Colombiana*, 2, 25-30.

Foradori, M. J., Keil, L. M., Wells, R. E., Diem, M., & Tillinghast, E. K. (2001). An examination of the potential role of spider digestive proteases as a causative factor in spider bite necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, 209-218.

Francke, O. F. (1977). The genus *Diplocentrus* in the Yucatan Peninsula with description of two new troglobites (Scorpionida: Diplocentridae). *Association of Mexican Cave Studies Bulletin*, 6, 49-61.

Fuentes, L., Hernández, M., Nieto, M. L., & Sánchez Crespo, M. (2002). Biological effects of group IIA secreted phospholipase A2. *FEBS letters*, 531, 7-11.

García Morín, G. A., Gaitán, Á. A., García Cardona, A., Clavijo Grimaldi, D., Ramón Mejía, Ó., Cobos, C., & Casadiego, C. A. (2008). Aspectos biomédicos de las fosfolipasas A2 en la especie humana. *MedUNAB*, 11(1).

García Níñez, J. (2011). Efecto del veneno entero de *Centruroides gracilis* (scorpionida: buthidae) sobre la proliferación celular in vitro [recurso electrónico] (Doctoral dissertation).

García, C., Becerril, B., Selisko, B., Delepierre, M., & Possani, L. D. (1997). Isolation, Characterization and Comparison of a Novel Crustacean Toxin with a Mammalian Toxin from the Venom of the Scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 116, 315-322.

Garcia, H. H., Tanowitz, H. B., & Del Brutto, O. H. (2013). Neurological effects of venomous bites and stings: snakes, spiders, and scorpions. *Neuroparasitology and Tropical Neurology: Handbook of Clinical Neurology Series (Editors: Aminoff, Boller, Swaab)*, 114, 349.

Garcia, M. L., Koo, G. C., Leonard, R. J., Lin, C. C., Slaughter, R. S., Stevens, S. P. et al. (27-2-1996). Scorpion peptide margatoxin with immunosuppressant activity. Google Patents.

Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., Novick, J., Stevens, S. P., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G. J. et al. (1993). Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 18866-18874.

Google Earth (2014). *Imagen satelital Vereda Rincón de Chípalo-Alvarado*. Recuperado de <https://www.google.es/intl/es/earth/index.html>.

Gómez, J. P., Quintana, J. C., Arbeláez, P., Fernández, J., Silva, J. F., Barona, J. et al. (2010). Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá, Colombia: aspectos epidemiológicos, clínicos y toxinológicos. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, 30.

Gómez, J. P. & Otero, R. (2007). Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Rev Fac Nac Salud Pública*, 25, 50-60.

González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10, 179-188.

Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M. et al. (2007). The insecticidal potential of scorpion β -toxins. *Toxicon*, 49, 473-489.

Gutiérrez, J. & Chaves, F. (1980). Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon*, 18, 315-321.

Gutiérrez, J., Avila, C., Rojas, E., & Cerdas, L. (1988). An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 26, 411-413.

Habermann, E. & Hardt, K. L. (1972). A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical biochemistry*, 50, 163-173.

Heinen, T. E. & Gorini da Veiga, A. B. (2011). Arthropod venoms and cancer. *Toxicon*, 57, 497-511.

Herrmann, R., Moskowitz, H., Zlotkin, E., & Hammock, B. D. (1995). Positive cooperativity among insecticidal scorpion neurotoxins. *Toxicon*, 33, 1099-1102.

Hoffmann, A. (1993). El maravilloso mundo de los arácnidos. La ciencia desde México. México:

Joseph, B. & George, J. (2012). Scorpion toxins and its applications. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 4, 57-61.

Kloock, C. T., Kubli, A., & Reynolds, R. (2010). Ultraviolet light detection: a function of scorpion fluorescence. *Journal of Arachnology*, *38*, 441-445.

Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual review of biochemistry*, *46*, 331-358.

Lee, J. C. M., Simonyi, A., Sun, A. Y., & Sun, G. Y. (2011). Phospholipases A2 and neural membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, *116*, 813-819.

Lomonte, B. & Gutiérrez, J. M. (1983). La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev Biol Trop*, *31*, 37-40.

Ma, Y., He, Y., Zhao, R., Wu, Y., Li, W., & Cao, Z. (2012). Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *Journal of proteomics*, *75*, 1563-1576.

Matsui, T., Fujimura, Y., & Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1477*, 146-156.

McGilvery, R. W. (1977). *Conceptos bioquímicos*. España: Reverté.

Menaldo, D. L., Bernardes, C. P., Pereira, J. C., Silveira, D. S., Mamede, C. C., Stanziola, L. et al. (2013). Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. *International immunopharmacology*, *15*, 764-771.

Miyashita, M., Otsuki, J., Hanai, Y., Nakagawa, Y., & Miyagawa, H. (2007). Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (Hemiscorpiidae). *Toxicon*, *50*, 428-437.

Möller, C., Vanderweit, N., Bubis, J., & Marí, F. (2013). Comparative analysis of proteases in the injected and dissected venom of cone snail species. *Toxicon*, *65*, 59-67.

Nie, Y., Zeng, X. C., Yang, Y., Luo, F., Luo, X., Wu, S. et al. (2012). A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. *Peptides*, *38*, 389-394.

Otero, R., Navío, E., Céspedes, F. A., Núñez, M. J., Lozano, L., Moscoso, E. R. et al. (2004). Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *98*, 742-750.

Otero, R., Osorio, R. G., Valderrama, R., & Giraldo, C. A. (1992). Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). *Toxicon*, *30*, 611-620.

Pereañez, J. A. & VARGAS, L. J. (2009). Neurotoxinas de invertebrados como alternativas terapéuticas y herramientas en investigación básica. *Vitae*, *16*.

Pérez, H. M. G. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, *1*, 31-34.

Perumal Samy, R., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M. M., Chow, T. K. V., Bow, H., Yap, E. H. et al. (2007). Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *Journal of applied microbiology*, *102*, 650-659.

Polis, G. A. (1990). *The biology of scorpions*. California: Stanford University Press.

Possani, L. D., & Rodríguez de la Vega, R. C. (2006). Scorpion venom peptides. *Handbook of Biologically Active Peptides*, 339-354.

Possani, L. D. (2011) El estudio de los componentes del veneno de alacranes en el contexto de la biología molecular, la farmacología y la medicina. *Biotecnología V14 CS3*. indd, 177-188.

Prendini, L. (2000). Phylogeny and classification of the superfamily Scorpionoidea Latreille 1802 (Chelicerata, Scorpiones): an exemplar approach. *Cladistics*, *16*, 1-78.

Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food research international*, 43, 1545-1548.

Ramos, C. & Escobar, E. (2007). Aislamiento y algunas propiedades de la toxina Be1 del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* (Gervais, 1841)(Scorpiones: Bothriuridae). *Revista Peruana de Biología*, 13, 243-248.

Remuzgo, C., Alvarez, M. P., Lazo, F., & Yarlequé, A. (2000). Caracterización parcial del veneno de la serpiente cascabel peruana *Crotalus durissus terrificus*. *Revista Peruana de Biología*, 7, 67-73.

Rivera, C., Flores, L., Pantigoso, C., & Escobar, E. (2010). Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de *Centruroides margaritatus*. *Revista Peruana de Biología*, 17, 129-132.

Riverón Garrote, M. N., López López, R. J., Mesa, E. V., Tena Rodríguez, S. I., & Álvarez Pérez, M. D. C. (2012). Sintomatología de la picadura del alacrán azul cubano *Rhopalurus junceus*. *Revista Médica de Homeopatía*, 5(1), 7-12.

Rodríguez Vega, C. A. (2011). Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial (*Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín*).

Rodríguez-Vargas, A. L. (2012). Comportamiento general de los accidentes provocados por animales venenosos en Colombia, 2006-2010. *Revista de Salud Pública*, 14, 1001-1009.

Sánchez-Vásquez, L., Silva-Sanchez, J., Jiménez-Vargas, J. M., Rodríguez-Romero, A., Muñoz-Garay, C., Rodríguez, M. C. et al. (2013). Enhanced antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from vejovine and hadrurin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830, 3427-3436.

Sissom, W. D. & Hendrixson, B. E. (2005). Scorpion biodiversity and patterns of endemism in northern Mexico. *Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico*. Oxford University Press, Oxford, 122-137.

Sissom, W. D. & Lourenco, W. R. (1987). The genus *Centruroides* in South America (Scorpiones, Buthidae). *Journal of Arachnology*, 11-28.

Sollod, B. L., Wilson, D., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Drinkwater, R., & King, G. F. (2005). Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides*, 26, 131-139.

Souto, A. & María, A. (2009). Validación de técnicas de electroforesis bidimensionales para el estudio del proteoma y complexoma de membrana externa de *Neisseria*. Univ Santiago de Compostela.

STAHNKE, H. L. 1970. Scorpion nomenclature and mensuration. *Entomological News*, 81: 297–316.

Teruel, R. (2004). Primer registro de partenogénesis en *Centruroides gracilis* (Latreille, 1804)(Scorpiones: Buthidae). *Rev.Ibér.Aracnol*, 9, 141-142.

VACHON, M. 1952. Études sur les Scorpions. *Alger: Institut Pasteur d'Algérie*, 482 pp.

VACHON, M., 1974. Etude des caractères utilisés pour classer les familles et les genres de Scorpions (Arachnides). 1. La trichobothriotaxie en arachnologie. Sigles trichobothriax et types de tri-chobothriotaxie chez les Scorpions. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*, Paris, 3è sér., n° 140, Zool., 104: 857–958.

Valdés Rodríguez, Y. C., Bilbao Díaz, M., León Álvarez, J. L., & Merchán González, F. (2002). Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *Revista Cubana de Farmacia*, 36, 121-128.

Vargas Muñoz, L. J. (2013). Evaluación in vitro de la capacidad antimicrobiana de proteínas aisladas de venenos de serpientes colombianas (*Doctoral dissertation*).

Vargas, J. A. G. (2008). Análise proteômica parcial da peçonha do escorpião colombiano *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Doctoral dissertation, Universidade de Brasília).

Williams, S. C. (1987). Scorpion bionomics. *Annual review of entomology*, 32, 275-295.

Wulff, H. & Zhorov, B. S. (2008). K⁺ channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. *Chemical reviews*, 108, 1744-1773.

Zeng, X. C., Zhou, L., Shi, W., Luo, X., Zhang, L., Nie, Y. et al. (2013). Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. *Peptides*, 45, 28-34.

ANEXOS

Anexo A. Claves para la determinación taxonómica del genero *Centruroides* en Colombia

1 Dedo fijo del pedipalpo con nueve hileras principales de dentículos; segmentos II-IV del metasoma con dos pares de macrocerdas ventrolaterales; tubérculo subaculear espiniforme y fuerte (Fig. 3 B-C); peines con 28 a 32 dientes en la hembra y 29 a 35 en el macho..... *gracilis*

1' Dedo fijo del pedipalpo con ocho hileras principales de dentículos; segmentos II-IV del metasoma con cuatro o más pares de macrocerdas ventrolaterales; tubérculo

- subaculear espiniforme, pequeño a moderado; peines con 24 a 28 dientes en la hembra y 24 a 31 en el macho 2
- 2** Pedipalpos (fémur, patela y pinza) con abundante pilosidad (Fig. 6 B, D); mano con la quilla dorsal marginal muy pilosa (Fig. 6 H) *edwardsii*
- 2'** Pedipalpos (fémur, patela y pinza) con escasa pilosidad (Fig. 6 A, C); mano con la quilla dorsal marginal no pilosa (Fig. 6 E, G) 3
- 3** Tubérculo subaculear moderado, algo separado de la base del agujón (Fig. 4 F-G); mano del pedipalpo ovalada (Fig. 4 D, H, K) *margaritatus*
- 3'** Tubérculo subaculear rudimentario, próximo a la base del agujón (Fig. 5 E-F); mano del pedipalpo globosa (Fig. 6 E, G) *sanandres* sp. n.