

Estudio sobre la composición y la actividad biológica de las
neurotoxinas y las cardiotoxinas presentes en el veneno del
escorpión *Tityus forcípula* (Scorpiones: Buthidae) del
municipio de Cali



FRANKLIN HELID MORENO VÉLEZ

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2019

Estudio sobre la composición y la actividad biológica de las
neurotoxinas y las cardiotoxinas presentes en el veneno del
escorpión *Tityus forcípula* (Scorpiones: Buthidae) del
municipio de Cali



FRANKLIN HELID MORENO VÉLEZ

Trabajo de investigación presentado para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

LEONARDO FIERRO PÉREZ, MD, Ph. D.

Director

SANTIAGO CASTAÑO VALENCIA, Biólogo, Ph. D.

Codirector

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2019

Nota de aceptación:

Los integrantes del jurado, designados por el comité de postgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle, abajo firmantes, revisaron y aprobaron el presente trabajo de investigación presentado por el estudiante **FRANKLIN HELID MORENO VÉLEZ**, para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas, el día _____ de _____ de 2019.

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

*A la memoria de mi padre,
quien dejó su terruño huyendo de la pobreza,
y de la nada construyó una familia que es mi orgullo y mi fuerza.*

AGRADECIMIENTOS:

Quiero expresar las gracias a mi tutor, Dr. Leonardo Fierro Pérez, cuyo acompañamiento y enseñanzas permanentes hicieron posible este trabajo, y a mi co-tutor y amigo, Dr. Santiago Castaño, que me introdujo en este apasionante campo del conocimiento.

Al Dr. Lourival Possani y su equipo de investigación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en México, donde pude hacer parte de esta investigación, y al Dr. Alain Labro, quien me recibió generosamente durante mi estancia de investigación en la UAntwerp en Bélgica. A la Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte y mis queridos colegas docentes allí, muy especialmente al Decano de la Facultad de Salud y Rehabilitación, MgSc. Carlos Andrés Quiróz, por su apoyo permanente. Al Dr. José Oscar Gutiérrez, al querido Profe Ernesto Combariza, a la Dra. Mildrey Mosquera, de la Universidad del Valle, y al Dr. Jimmy Alexander Guerrero-Vargas de la Universidad el Cauca, quienes no dudaron en brindar su apoyo y recomendaciones en momentos clave.

A mis compañeros y compañeras de los laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Farmacología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, Betty Oviedo, Silverio Garzón, Eliécer Jiménez, siempre generoso en compartir saberes y experiencias, José Beltrán, Paulo César Calvo, Jenny Juliana Banguero, Claudia Mosquera, Libardo González, Johanna Marcela Feijóo, Gonzalo Sterling. A Mauricio, siempre tan dispuesto a dar su ayuda. A Jaime Muñoz, a Aura Maritza Toro y a Amparito. Gracias por todo!

Y por último, pero sobre todo, a mi familia. Mi mujer María Fernanda, mi hija María Mónica, mi madre Myriam, mis hermanos y hermanas, mis cuñados y cuñadas, mis sobrinos y sobrinas. Han sido pilar y motor de todos mis proyectos. Nada de esto habría sido posible sin su apoyo, paciencia y presencia.

RESUMEN

Se estudió por primera vez el veneno del escorpión *Tityus forcípula* de la localidad de Cali, y algunas de sus fracciones, así como el transcriptoma de la glándula productora del veneno. Modelos murinos envenenados de forma experimental mostraron síntomas de envenenamiento central y autonómico, efecto cronotrópico negativo y alteraciones hemodinámicas y de la función pulmonar. La inyección subplantar del veneno entero en ratones causó una intensa respuesta de fase aguda y de fase crónica. Las variables de la química sanguínea en ratas experimentalmente envenenadas evidenciaron la activación de cascadas inflamatorias y la alteración del perfil glucémico. El veneno entero presentó actividad enzimática significativa (proteasa, fosfolipasa e hialuronidasa), lo que probablemente contribuye a la rápida difusión del veneno y a sus efectos tóxicos. Se evaluó por primera vez la toxicidad del veneno ($DL_{50}=2.39 \pm 0.05$ mg/kg ratón, $P_c=1.02$ mg de proteína soluble), siendo la más alta reportada para especies colombianas y similar a las de escorpiones bítidos de regiones vecinas, que han sido asociados con accidentes fatales, principalmente en niños.

Mediante LC-MS se determinó la huella de masas moleculares del veneno de *T. forcípula* (VMF), y se identificaron 44 masas individuales, con rangos reconocidos por incluir péptidos que modifican la actividad de los canales Na_v y K_v . Mediante tecnologías de secuenciación de nueva generación (plataforma Illumina) se hizo el análisis transcriptómico de la glándula de veneno en estado “activo”. Se identificaron 218 componentes putativos del veneno, con una composición típica del veneno de las especies del género *Tityus* del Nuevo Mundo, incluyendo numerosos transcritos putativos codificantes para proteínas relacionadas con procesos celulares, así como péptidos y proteínas relacionadas con componentes del veneno.

Más del 60% de los transcritos de componentes putativos del veneno correspondió con enzimas. También se identificaron α y β -NaTx (13.8%), así como α , β y ϵ -KTx (9.2%) y porcentajes menores de transcritos codificantes para péptidos antimicrobianos, inhibidores de proteasa y proteínas ricas en cisteína, entre otros. Las toxinas putativas de *T. forcipula* presentaron alta similitud con otras previamente reportadas para especies distribuidas al norte de la cuenca amazónica, como *T. pachyurus*, *T. zulianus* y *T. obscurus*.

Se fraccionó el veneno mediante cromatografía HPLC y se determinó el perfil proteómico. Se secuenciaron parcialmente mediante degradación automatizada de Edman, cinco péptidos aislados del veneno, identificados como α y β -sodio toxinas, y fue secuenciado totalmente un péptido identificado como α -potasio toxina. Las secuencias de estos péptidos fueron identificadas en el transcriptoma.

Se estudió la actividad del veneno entero y algunas fracciones homogéneas, sobre el canal hNav1.5, expresado de forma transitoria en células HEK 293, en experimentos de electrofisiología de voltaje controlado en modo de célula entera. El veneno entero de *T. forcipula* inhibió la corriente máxima en una forma dependiente de la concentración. La subfracción III-3(9), de 7350 Da, que correspondería con una alfa toxina activa sobre canales de sodio dependientes de voltaje, fue el péptido más tóxico del veneno en experimentos con ratón, y en ensayos de electrofisiología inhibió la corriente pico en un 40% y desplazó la curva de activación hacia la derecha.

Considerados en conjunto, los resultados anteriores indican que el veneno de *T. Forcipula* presenta toxicidad moderada en comparación con el de especies cercanas asociadas a

accidentes fatales. Sin embargo, el envenenamiento severo por picadura de *T. forcipula*, especialmente si las víctimas son niños, podría requerir atención médica, y monitoreo de posibles secuelas de lesión miocárdica y pancreática, entre otras.

PALABRAS CLAVES

Escorpiones bítidos, *Tityus forcipula*, escorpionismo, sodio toxinas de escorpión, potasio toxinas de escorpión, neurotoxinas del veneno de escorpión, cardiotoxinas del veneno de escorpión, HPLC, FPLC, test de Irwin, DL₅₀, actividad enzimática, actividad proteasa, actividad fosfolipasa, actividad hialuronidasa, modelos murinos, nocicepción, electrofisiología, clamp de voltaje, patch-clamp, canales iónicos, canales de sodio dependientes de voltaje, hNav1.5, células HEK 293, canales de potasio dependientes de voltaje, proteómica del veneno de escorpión, transcriptómica de la glándula del veneno, electroforesis, SDS-PAGE, degradación de Edman, secuenciación de péptidos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
PALABRAS CLAVES.....	3
INDICE DE TABLAS	7
ÌNDICE DE FIGURAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	15
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1 LOS ESCORPIONES	19
4.2 EL VENENO DE LOS ESCORPIONES.....	21
4.3 ESCORPIONISMO.....	25
4.4 CANALES DE SODIO.....	28
4.5 SODIO TOXINAS DE ESCORPIÓN: PÉPTIDOS DE VENENOS DE ESCORPIÓN QUE BLOQUEAN SELECTIVAMENTE LOS VGSC.....	32
4.6 SODIO TOXINAS DE ESCORPIÓN COMO FUENTES TERAPÉUTICAS POTENCIALES	35
4.7 LOS CANALES DE POTASIO.....	36
4.8 POTASIO TOXINAS: PÉPTIDOS DE VENENOS DE ESCORPIÓN QUE ALTERAN SELECTIVAMENTE LOS VGKC	38
4.9 POTASIO TOXINAS DE ESCORPIÓN COMO POTENCIALES FÁRMACOS	41
4.10 VENÓMICA: TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA DEL VENENO DE ESCORPIÓN.....	43
4.11 NEUROTOXINAS Y CARDIOTOXINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL ESCORPIONISMO	44
5. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS EN MODELOS MURINOS Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DEL VENENO ENTERO DE <i>Tityus forcípula</i>	49
5.1 METODOLOGÍA	49
5.1.1 Comité de ética, permisos de colecta y acceso a recursos genéticos	49
5.1.2 Animales para experimentación.....	50
5.1.3 Colecta de escorpiones y extracción del veneno.....	51

5.1.4	Contenido de proteína en el veneno entero.....	53
5.1.5	Dosis letal 50 (DL ₅₀) y neurotoxicidad del veneno entero en ratones	54
5.1.6	Efectos del veneno entero sobre los parámetros hematológicos en ratones ...	57
5.1.7	Ensayos de nocicepción en ratones.....	59
5.1.8	Efectos del veneno entero sobre la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca en ratas.....	60
5.1.9	Actividad enzimática in vitro.....	62
5.2	RESULTADOS.....	65
5.2.1	Colecta de escorpiones y obtención del veneno de <i>Tityus forcipula</i>	65
5.2.2	Determinación del contenido de proteína en el veneno entero	65
5.2.3	Dosis letal 50 (DL ₅₀) y neurotoxicidad del veneno entero en ratones	66
5.2.4	Efectos del veneno entero sobre los parámetros hematológicos en ratones ...	69
5.2.5	Ensayos de nocicepción mediante la prueba de lamido de pata	71
5.2.6	Medición no invasiva de la frecuencia cardíaca y variables de la presión arterial.....	72
5.2.7	Actividad enzimática in vitro.....	74
5.3	DISCUSIÓN.....	76
6.	ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LA GLÁNDULA DEL VENENO DEL ESCORPIÓN <i>Tityus forcipula</i>	92
6.1	METODOLOGÍA	92
6.1.1	Extracción del RNA de las glándulas de veneno y secuenciación total	92
6.1.2	Análisis bioinformático de secuencias nucleotídicas.....	93
6.1.3	Predicción de estructuras terciarias.....	96
6.2	RESULTADOS.....	96
6.2.1	Extracción del ARN de las glándulas de veneno	96
6.2.2	Resultados globales del análisis transcriptómico.....	97
6.2.3	Perfil del transcriptoma de la glándula del veneno	97
6.2.4	Componentes del veneno	100
6.2.5	Determinación de la identidad de los péptidos secuenciados con los precursores putativos del veneno de <i>T. forcipula</i> y modelamiento mediante homología de la estructura terciaria de péptidos secuenciados	111
6.3	DISCUSIÓN.....	117
7.	ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL VENENO DE <i>T. forcipula</i> Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL VENENO ENTERO Y FRACCIONES HOMOGÉNEAS SOBRE CANALES hNAV _{1.5}	143
7.1	METODOLOGÍA	143

7.1.1	Fraccionamiento cromatográfico del veneno mediante el método A	143
7.1.2	Fraccionamiento cromatográfico del veneno mediante el método B.....	144
7.1.3	Análisis de espectrometría de masas.....	148
7.1.4	Secuenciación de péptidos homogéneos.....	149
7.1.5	Reacción de reducción y alquilación (RC)	150
7.1.6	Fragmentación enzimática de péptidos homogéneos.....	152
7.1.7	Comparación de secuencias de aminoácidos	154
7.1.8	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	154
7.1.9	Ensayos electrofisiológicos.....	155
7.2	RESULTADOS	159
7.2.1	Fraccionamiento cromatográfico del veneno mediante el método A	159
7.2.2	Análisis proteómico del veneno de <i>Tityus forcipula</i>	162
7.2.3	Secuenciación de péptidos homogéneos	167
7.2.4	Purificación mediante el método B para experimentos de electrofisiología.....	172
7.2.5	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	177
7.2.6	Evaluación de la actividad cardiotoxica mediante experimentos de electrofisiología	182
7.3	DISCUSIÓN.....	187
8.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	207
9.	BIBLIOGRAFÍA	212

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de isoformas de Na _v en tejidos excitables y no excitables, y patologías asociadas a mutaciones de pérdida o ganancia de función.	31
Tabla 2. Parámetros hematológicos evaluados en ratones albino suizo 2 horas después de inyección IP de 1/2 DL ₅₀ de veneno entero de <i>T. forcipula</i>	57
Tabla 3. Resultados de DL ₅₀ por el método de Dixon, 1965.	67
Tabla 4. Parámetros evaluados en Test de Irwin..	68
Tabla 5. Resultados del análisis estadístico (t de Student), para las variables de la química sanguínea en ratones albino suizo (n=9, machos, 25 g) tratados con veneno entero de <i>T. forcipula</i> e inyectados con solución control.	70
Tabla 6. Ensayo de nocicepción. Tiempo de lamido de pata (s) de ratones albino suizo (n=5 ratones por tratamiento) después de la inyección intraplantar de 20 µL de agua tipo I, formalina y veneno entero de <i>T. forcipula</i> (1/3 de la DL ₅₀)..	71
Tabla 7. Efecto del veneno entero sobre la frecuencia cardíaca y sobre variables de la presión sanguínea en ratas.	72
Tabla 8. DL ₅₀ reportada para diversas especies de escorpiones de la familia Buthidae en Colombia y América.	79
Tabla 9. Estadística global del transcriptoma de <i>T. forcipula</i>	97
Tabla 10. Secuencias de la α-NaTx putativas del veneno de <i>T. forcipula</i>	100
Tabla 11. Alpha-NaTx putativas del veneno de <i>T. forcipula</i> y sus ortólogos con mayor porcentaje de identidad.	101
Tabla 12. Secuencias de la β-NaTx putativas del veneno de <i>T. forcipula</i>	102
Tabla 13. Lista de β-NaTx putativas del veneno de <i>T. forcipula</i> y sus ortólogos con mayor porcentaje de identidad.	103

Tabla 14. Secuencias de las KTx putativas del veneno de <i>T. forcipula</i>	106
Tabla 15. Lista de KTx putativas del veneno de <i>T. forcipula</i> y sus ortólogos con mayor porcentaje de identidad.	107
Tabla 16. Péptidos secuenciados por degradación de Edman y los correspondientes precursores putativos según los resultados del BLAST-P con Geneious.	111
Tabla 17. Análisis del fraccionamiento por HPLC del veneno entero de <i>T. forcipula</i> con base en los reportes del software Millenium..	161
Tabla 18. Resultados de ensayo de toxicidad en ratones BALB/C.	163
Tabla 19. Huella dactilar de masas del veneno (Mass Fingerprint of the Venom, MFV) de <i>T. forcipula</i>	164
Tabla 20. Huella dactilar de masas del veneno soluble de <i>T. forcipula</i> (fingerprint).....	165
Tabla 21. Resultados de la secuenciación por degradación automatizada de Edman, de péptidos aislados del veneno entero de <i>T. forcipula</i>	171
Tabla 22. Comparación del fraccionamientos del veneno de <i>T. forcipula</i> , métodos A y B..	181

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del escorpión <i>Androctonus crassicauda</i> (Buthidae) A. Vista dorsal. B. Vista ventral.....	20
Figura 2. Composición del veneno de escorpión.....	22
Figura 3. Estructura, plegado y dianas moleculares de toxinas de escorpión conocidas	24
Figura 4. Sitio de unión de las toxinas de escorpión α y β sobre los canales Na_v	30
Figura 5. Alineamientos múltiples de NaScTx y epítopes funcionales.	34
Figura 6. Esquema de los canales K_v mostrando el mecanismo de modificación de la permeabilidad por las SckTx.	37
Figura 7. Alineamientos múltiples de SckTx y epítopes funcionales.	40
Figura 8. Hábitat de colecta, localidad Km 18 Vía al Mar.....	52
Figura 9. Obtención del veneno por estimulación eléctrica del telson.....	52
Figura 10. Método de Lowry.....	53
Figura 11. Test de Irwin y ensayos en ratón.....	56
Figura 12. Reacción de hidrólisis del enlace éster en el sustrato 4-NOBA, catalizada por PLA2.....	63
Figura 13. Curva de calibración por el método micro Lowry..	66
Figura 14. Frecuencia cardíaca en ratas Wistar bajo tratamiento con veneno de <i>T. forcipula</i> y control.....	73
Figura 15. Resultados de la determinación de actividad fosfolipasa del veneno de <i>T. forcipula</i> sobre el sustrato cromógeno 4-NOBA.....	74
Figura 16. Resultados de la determinación de actividad proteolítica del veneno de <i>T. forcipula</i> sobre el sustrato azocaseína..	75
Figura 17. Resultados de la determinación de actividad hialuronidasa del veneno entero de <i>T. forcipula</i>	76
Figura 18. Flujograma del análisis del transcriptoma de <i>T. forcipula</i>	96
Figura 19. Resultados globales del análisis transcriptómico de la glándula del veneno de <i>T. forcipula</i>	98
Figura 20. Distribución de los transcritos manualmente anotados según familias y subfamilias de proteínas. KScTx, toxinas específicas para canales de potasio.....	99

Figura 21. Alpha-Toxinas específicas para canales de sodio.....	103
Figura 22. Beta-Toxinas específicas para canales de sodio..	105
Figura 23. Alfa-Toxinas específicas para canales de potasio.....	109
Figura 24. Épsilon-Toxinas específicas para canales de potasio.....	109
Figura 25. Toxina Frac_25(tr35.61) específica para canales de potasio, secuenciada mediante degradación de Edman.....	112
Figura 26. Toxina Frac_25(tr35.61) específica para canales de potasio, secuenciada mediante degradación de Edman.....	112
Figura 27. Modelamiento por homología de la estructura terciaria de Frac_25(tr35.61), probable KScTx secuenciada mediante degradación de Edman.	113
Figura 28. Toxina Frac_36(tr42.01) con pm de 7357 Da secuenciada mediante degradación de Edman..	113
Figura 29. Modelamiento por homología de la estructura terciaria de la toxina Frac_36(tr42.01), pm 7357 Da, secuenciada mediante degradación de Edman.....	114
Figura 30. Toxina específica para canales de sodio parcialmente secuenciada.	115
Figura 31. Modelamiento por homología de la estructura terciaria de la toxina Frac_39(tr43.29), pm 7082 Da, parcialmente secuenciada mediante degradación Edman....	115
Figura 32. Toxina específica para canales de sodio parcialmente secuenciada.	116
Figura 33. Toxina específica para canales de sodio parcialmente secuenciada.....	116
Figura 34. Toxina específica para canales de sodio parcialmente secuenciada.	117
Figura 35. Flujograma ilustrativo de los métodos de purificación A y B.....	146
Figura 36. A. Protocolo de corriente máxima. B. Protocolo I-V para células HEK.	159
Figura 37. Cromatograma RP-HPLC del veneno soluble de <i>T. forcipula</i>	160
Figura 38. Rangos de masa moleculares en el proteoma de <i>T. forcipula</i>	166
Figura 39. Ejemplos de repurificación de algunas de las fracciones cromatográficas.....	168
Figura 40. Purificación del veneno de <i>T. forcipula</i> mediante el método B.....	173
Figura 41. Repurificación de fracciones del veneno de <i>T. forcipula</i> mediante método B.. ..	175
Figura 42. Cromatografía del veneno entero de <i>T. forcipula</i>	176
Figura 43. Resultados de la Electroforesis del veneno de <i>T. forcipula</i> en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). A) Veneno entero. B) Fracciones III-1 a III-8	177

Figura 44. SDS-PAGE con tris-tricina de la fracción III-4.	180
Figura 45. Efecto del veneno entero de <i>T. forcipula</i> a tres concentraciones sobre los registros de corriente de sodio en hNa _v 1.5 durante experimentos de patch-clamp en modo célula entera (whole-cell).....	183
Figura 46. A) Gráfica de corriente normalizada vs voltaje (I-V) en condiciones de perfusión con solución de Tyrode y con veneno entero 7.5 µg/mL. B) Curvas de activación en condiciones de perfusión con solución de Tyrode y con veneno entero 7.5 µg/mL	184
Figura 47. Efecto de la fracción III-3(9) del veneno entero de <i>T. forcipula</i> sobre los registros de corriente de sodio en hNa _v 1.5 durante experimentos de patch-clamp en modo célula entera (whole-cell).....	185
Figura 48. Efecto de fracciones homogéneas del veneno entero de <i>T. forcipula</i> sobre los registros de corriente de sodio en hNa _v 1.5 durante experimentos de patch-clamp en modo célula entera (whole-cell).. ..	186

1. INTRODUCCIÓN

Los escorpiones son artrópodos depredadores ampliamente distribuidos en todo el mundo, con unas 2100 especies agrupadas en 16 a 19 familias (Stockman, 2013). La familia Buthidae que incluye la mayoría de especies potencialmente peligrosas para los humanos, es la más diversa y presenta la mayor distribución geográfica (Abdel-Rahman, Quintero-Hernández y Possani, 2016). El mayor número de géneros de bítidos se presenta en el Viejo Mundo, pero en América se encuentra el género más diverso, *Tityus*. En las cadenas montañosas de Colombia y Venezuela diversas especies de *Tityus* representan un factor de riesgo pediátrico (Borges *et al.* 2006).

En Colombia se reporta la presencia de 80 especies de escorpiones, de los cuales 50 pertenecen a la familia Buthidae (Guerrero-Vargas *et al.* 2015). Reportes de investigaciones en algunas regiones del país, indican que los bítidos *Tityus pachyurus*, *T. asthenes*, *T. fuhrmanni* y *Centruroides margaritatus* son las especies que podrían representar riesgo para la salud humana (Gómez *et al.* 2007). En el Valle del Cauca se ha reportado la presencia de seis especies de bítidos incluyendo *C. margaritatus*, *T. asthenes* y *T. Forcipula* (Flórez, 2001). Este último ha sido observado y colectado por nuestro grupo de investigación en la región del Km 18 Vía al Mar. Se le conoce comúnmente como “sietenudos” y suele ocasionar picaduras en humanos, caracterizadas por dolor intenso y signos de intoxicación sistémica (Moreno, 2008).

El veneno de los escorpiones está formado por una mezcla compleja de proteínas y péptidos que incluye neurotoxinas y cardiotoxinas que alteran la actividad de los canales

iónicos, varios tipos de enzimas y péptidos con actividad antimicrobiana, entre otros (Santibáñez-López et al., 2016). Abdel-Rahman et al., 2016, estiman que se conoce menos del 1% de los 150.000 péptidos y proteínas potencialmente expresados en las glándulas del veneno de las especies conocidas de escorpiones. Múltiples investigaciones en diferentes países contribuyen a este conocimiento, agregando nuevos componentes aislados del veneno y nuevos péptidos y proteínas putativos identificados por transcriptómica (Smith y Alewood, 2014).

Los péptidos neurotóxicos y cardiotóxicos han despertado el mayor interés de los investigadores. Estas moléculas alteran de forma muy específica la actividad de los canales iónicos dependientes de voltaje permeables a sodio, potasio, cloruro y calcio, ocasionando los principales efectos del envenenamiento por picadura de escorpión en los humanos (Laraba-Djebari, Adi-Bessalem y Hammoudi-Triki, 2013). Se han identificado en el venenos de los escorpiones al menos siete tipos de toxinas moduladoras de la actividad de los canales de sodio y al menos cuatro familias de péptidos que modifican la actividad de los canales de potasio (Gurevitz et al., 2015; Bartok, Panyi y Varga, 2014). Además, estas moléculas se consideran como potenciales fuentes de fármacos, dado que los canales iónicos dependientes de voltaje constituyen dianas moleculares en el tratamiento de diversas patologías (Cummins *et al.*, 2007). Otros componentes que también han llamado la atención son los péptidos antimicrobianos, los cuales se han encontrado en forma abundante en los venenos de escorpiones (Harrison, Abdel-Rahman, Miller y Strong, 2014; Samy et al., 2017).

La picadura por escorpión, o escorpionismo, es un importante problema de salud pública en países como México, Brasil y Venezuela (Borges, 1996; De Sousa et al., 2006). Desde

2008 Colombia fue incluida por la OMS dentro de los países con escorpionismo endémico. La picadura de escorpión es motivo frecuente de consulta médica en algunas regiones de nuestro país, aunque por lo general los casos registrados son menores que los ocurridos. La incidencia del accidente escorpiónico ha aumentado en varias regiones del país, y aunque no se conocen exactamente los índices de morbilidad y mortalidad, Gómez et al., 2007, estimaron que en el país ocurren unos 4000 accidentes escorpiónicos cada año, y se han reportado varios casos fatales, especialmente en niños.

Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del envenenamiento por bútididos en Colombia se reportan en algunas investigaciones (Gómez et al, 2002; Barona et al, 2004; Otero et al, 2004; Gómez et al 2010), así como estudios de caracterización del veneno (Barona et al, 2006; Guerrero-Vargas et al, 2012; Estrada-Gómez et al., 2017; Rincón-Cortés, Reyes-Montaña y Vega-Castro, 2017). Sin embargo, a pesar de su escorpiofauna diversa, en nuestro país faltan estudios de caracterización bioquímica de los venenos, que incluyan el fraccionamiento y purificación de los componentes y la caracterización de la actividad moduladora de los canales iónicos dependientes de voltaje. Estas investigaciones ayudarían a comprender la naturaleza de su toxicidad. Las pocas investigaciones sobre el tema se han enfocado más bien en los aspectos epidemiológicos y en el cuadro clínico asociado al envenenamiento.

En las zonas montañosas de Cali el escorpión *Tityus forcípula* suele invadir las viviendas provocando accidentes de consideración al inocular su veneno en humanos. En la literatura revisada no se encontraron estudios clínicos ni epidemiológicos sobre el accidente escorpiónico debido a picaduras por *T. forcípula* en Colombia y no hay referencias a investigaciones de caracterización de su veneno.

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los habitantes de las áreas montañosas de Cali refieren accidentes frecuentes causados por la picadura del escorpión *Tityus forcípula*, comúnmente denominado “sietenudos”. La inoculación de su veneno en humanos ocasiona dolor intenso y síntomas de envenenamiento sistémico que pueden prolongarse hasta 24 horas (observaciones no publicadas).

Numerosas investigaciones sobre los escorpiones y su veneno se adelantan actualmente, motivadas por la gran variedad de moléculas con actividad biológica presentes entre sus componentes, y que podrían ayudar a entender el cuadro clínico observado en el escorpionismo. Las toxinas presentes en el veneno de escorpión se investigan también como fuentes potenciales de moléculas con actividad antimicrobiana y posiblemente de nuevos fármacos para el tratamiento de patologías asociadas a la actividad anormal de los canales iónicos (Rodríguez de la Vega y Possani, 2005; Ortiz et al., 2015; Peigneur y Tytgat, 2018).

Los canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje participan en numerosos procesos fisiológicos en los tejidos muscular y nervioso, de modo que los péptidos que modifican selectivamente la actividad de los canales dependientes de voltaje, son mediadores fundamentales de los efectos neurotóxicos y cardiotóxicos de los venenos de escorpión (Bartok, Panyi y Varga, 2014).

Un síntoma muy común presente en el escorpionismo es el dolor, y las neurotoxinas identificadas en el veneno de los escorpiones se han postulado como potenciales causantes.

Los canales iónicos dependientes de voltaje (VGICs) tienen roles fundamentales en los mecanismos asociados a la producción de dolor. Estos VGICs constituyen blancos moleculares importantes donde actúan los péptidos neurotóxicos, modulando selectivamente su actividad. Las neurotoxinas, pueden tener efectos tanto nociceptivos como antinociceptivos, los cuales pueden atribuirse a la alteración de la actividad de los VGICs permeables a sodio, potasio y calcio, en neuronas sensoriales aferentes primarias. Por esta razón, las neurotoxinas podrían ser usadas como herramientas farmacológicas para comprender mejor los roles de los canales iónicos en la conducción de las señales de dolor, así como moléculas que posibiliten el desarrollo futuro de nuevos analgésicos (Krafte et al., 2008; Liu Pang, Jiang y Ji, 2008; Bhattacharya, Wickenden y Chaplan, 2009).

Los estudios sobre la composición del veneno de los escorpiones se justifican entonces por la gran variedad de moléculas con actividad biológica que están presentes entre sus componentes, y que podrían explicar todos y cada uno de los efectos tóxicos producidos por el veneno. En Colombia, a pesar de poseer una rica escorpiofauna, faltan estudios de caracterización de los venenos y de sus fracciones. Las investigaciones se han centrado principalmente en los aspectos epidemiológicos y descriptivos del cuadro clínico del accidente escorpiónico, faltando estudios sobre la caracterización biológica y bioquímica de los venenos, incluyendo el fraccionamiento, la purificación de los componentes y la caracterización de su capacidad moduladora de la actividad de los VGICs, responsables de los efectos neurotóxicos y cardiotóxicos del veneno. El análisis del proteoma se ha abordado para unas pocas especies (Barona et al, 2006; Rincón-Cortés et al., 2017), en tanto que el análisis del transcriptoma se ha reportado para una sola especie (Guerrero-Vargas, Mourão, Quintero-

Hernández, Possani y Schwartz, 2012). Los estudios del proteoma y transcriptoma para *T. forcipula* faltan por completo.

Como se mencionó, la picadura por *T. forcipula* es un accidente frecuente, que cursa con dolor intenso y signos de envenenamiento sistémico. No hay registros formales del accidente causado por *T. forcipula*, de modo que, desde el punto de vista epidemiológico, toda contribución al estudio de esta especie es también un aporte importante para entender el cuadro clínico causado por la inoculación de su veneno.

Buscando entender cuáles son los mecanismos moleculares por los cuales el veneno de *Tityus forcípula* causa sus efectos tóxicos, en el presente estudio se ha caracterizado el veneno de *T. forcipula* del municipio de Santiago de Cali en términos de actividad biológica *in vivo* e *in vitro*, del análisis transcriptómico de la glándula que produce el veneno, y de la capacidad del veneno entero y sus fracciones para modular la fisiología normal del canal de sodio hNav1.5 expresado de forma transitoria en células embrionarias de riñón humano (HEK).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la composición y la actividad biológica de las neurotoxinas y las cardiotoxinas presentes en el veneno del escorpión *Tityus forcípula* del municipio de Cali.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.2.1. Evaluar la actividad enzimática *in vitro* y los efectos tóxicos del veneno entero de *T. forcípula* en modelos murinos.

3.2.2. Analizar la presencia de neurotoxinas y cardiotoxinas en el transcriptoma de la glándula que produce el veneno de *T. forcípula*.

3.2.3. Purificar algunas fracciones neurotóxicas y cardiotóxicas del veneno entero de *T. forcípula* y analizar su acción moduladora sobre la actividad del canal Na_v1.5.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 LOS ESCORPIONES

Los escorpiones o alacranes se encuentran distribuidos en todos los continentes, en todas las zonas naturales de vida en los trópicos y subtrópicos, entre 0 y 5000 msnm con mayor concentración de especies entre 0 y 2000 msnm (Flórez, 2001). El orden Scorpiones C. L. Koch, 1850, comprende entre 16 y 19 familias, con más de 2100 especies descritas a la fecha, en 190 géneros. La familia Buthidae es la más diversa del orden Scorpiones, presenta la mayor distribución geográfica e incluye la mayoría de especies potencialmente peligrosas para los humanos. El mayor número de géneros de bítidos se presenta en el Viejo Mundo, pero en América se encuentra *Tityus*, el más diverso, con 128 especies (Fet *et al.*, 2000; Stockman, 2013), alcanzando la mayor diversidad en las cadenas montañosas de Colombia y Venezuela donde representa un factor de riesgo pediátrico (Borges *et al.*, 2006).

Los escorpiones depredan principalmente sobre artrópodos. Las picaduras a humanos son accidentales y constituyen un reflejo protector. El aparato del veneno se localiza en el telson, al final del metasoma (Figura 1) y consiste del acúleo, utilizado para inocular el veneno, y un par de glándulas secretoras asociadas a grupos musculares extrínsecos que lanzan el acúleo hacia la presa, e intrínsecos, que impulsan el veneno a través del acúleo. El epitelio glandular y los tipos de células que lo componen varía entre especies, pero incluye al menos una capa de células columnares con microvellosidades apicales, células de soporte, (consideradas a veces esencialmente como células de reemplazo), células de goblet secretoras de moco, y células glandulares serosas que contienen gránulos secretores de tamaños, formas y

densidades variables. Intercaladas en la capa de células secretoras se encuentran células nerviosas y dendritas (Stokcman, 2013).

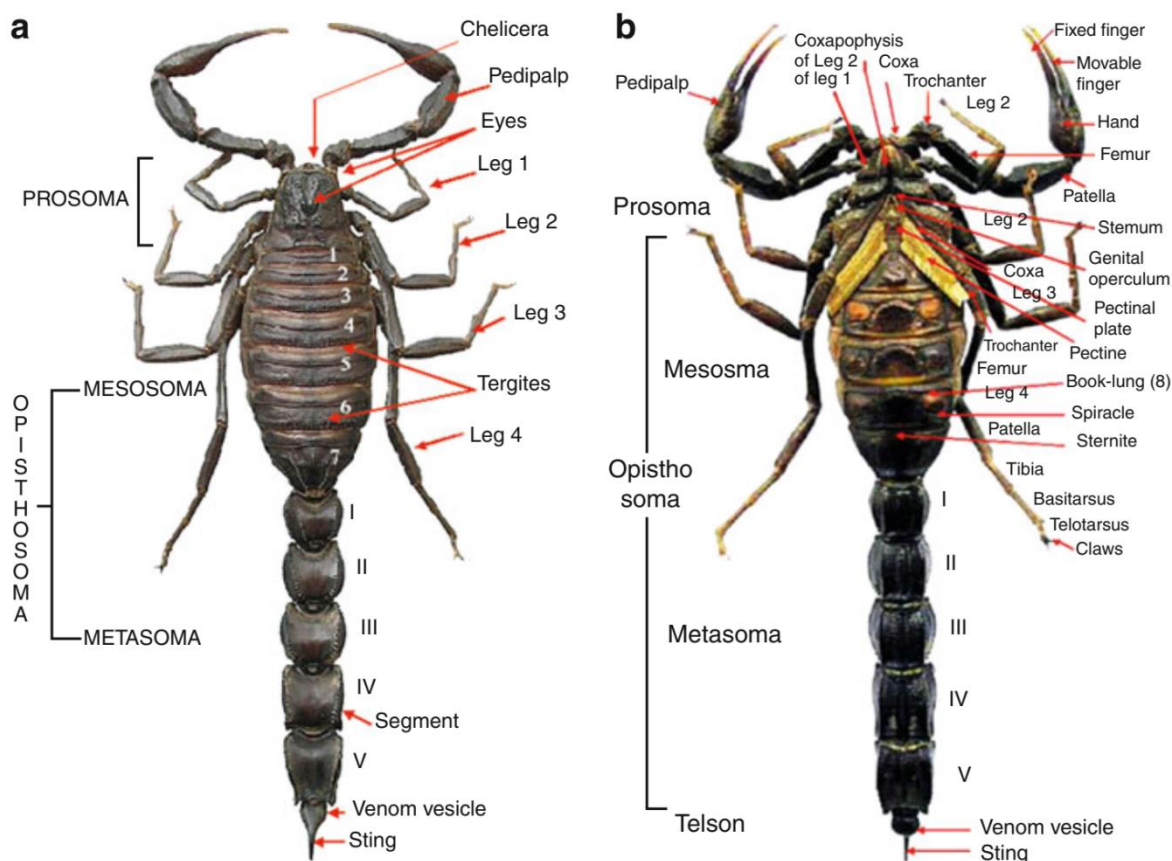


Figura 1. Anatomía del escorpión *Androctonus crassicauda* (Buthidae). A. Vista dorsal. B. Vista ventral. (Tomado de Stockman R., Introduction to Scorpion Biology and Ecology. En Scorpion Venoms. Springer).

En Colombia se reporta la presencia de cinco familias de escorpiones (Buthidae, Chactidae, Diplocentridae, Liochelidae y Troglotayosicidae), clasificados en 14 géneros y 65 a 80 especies, de los cuales cinco géneros con unas 50 especies pertenecen a la familia Buthidae: *Tityus* (30 especies), *Centruroides* (cuatro especies), *Ananteris* (trece especies), *Rhopalurus* (una especie) y *Microtityus* (dos especies) (Flórez, 2010; Guerrero-Vargas et al., 2015). La familia Buthidae ha sido relativamente poco estudiada en nuestro país, pero algunas

investigaciones en los departamentos de Antioquia, Tolima, Cundinamarca y Caldas, indican que *Tityus pachyurus*, *T. asthenes*, *T. fuhrmanni* y *Centruroides gracilis*, son las especies potencialmente riesgosas para la salud humana (Gómez et al., 2002; Otero et al., 2004; Barona, Otero y Núñez, 2004; Gómez y Otero, 2007; Gómez et al., 2010).

Flórez, 2001, reportó la presencia de seis especies de bítidos en el Valle del Cauca, cuatro en el área continental (*C. margaritatus*, *T. asthenes*, *T. betschi*, *T. forcipula* y *T. sastrei*), y una en Isla Gorgona (*Ananteris gorgonae*). *Tityus forcipula*, comúnmente conocido como “sietenudos” debido a la apariencia robusta de los segmentos del posabdomen, ha sido observado por nuestro grupo de investigación en varias localidades en ambas cordilleras del Valle del Cauca entre los 1400 y 2000 msnm, y colectado en la zona rural de Cali, en el Km 18 de la vía al Mar (Moreno, 2008).

4.2 EL VENENO DE LOS ESCORPIONES

El veneno de escorpión es una mezcla compleja de una fracción tóxica y una no tóxica, con rápida acción y difusión (Figura 2). La fracción tóxica consiste principalmente de neurotoxinas y cardiotoxinas altamente específicas para los canales iónicos de las células eléctricamente excitables. La fracción no tóxica incluye mucopolisacáridos, enzimas como hialuronidasas y fosfolipasas, inhibidores de proteasa y bioaminas como serotonina e histamina, aminoácidos libres, nucleótidos, lípidos, carbohidratos y muchas moléculas de bajo peso molecular con función desconocida. Los péptidos neurotóxicos y cardiotóxicos actúan específicamente sobre los canales iónicos dependientes de voltaje permeables a sodio (VGSC), potasio (VGKC), cloruro (VGCLC) y calcio (VGCC) (Rodríguez de la Vega y

Possani, 2005; Ortiz *et al.*, 2014; Smith y Alewood, 2014). Las manifestaciones observadas después de exposición al veneno de escorpión se deben principalmente a las neurotoxinas y cardiotoxinas que actúan sobre los VGSC y los VGKC en las terminaciones nerviosas, causando la liberación de neurotransmisores que pueden inducir síntomas generales, y resultan en dolor local, inflamación, alteraciones cardiorrespiratorias y desórdenes neurológicos (Laraba-Djebari, Adi-Bessalem y Hammoudi-Triki, 2013).

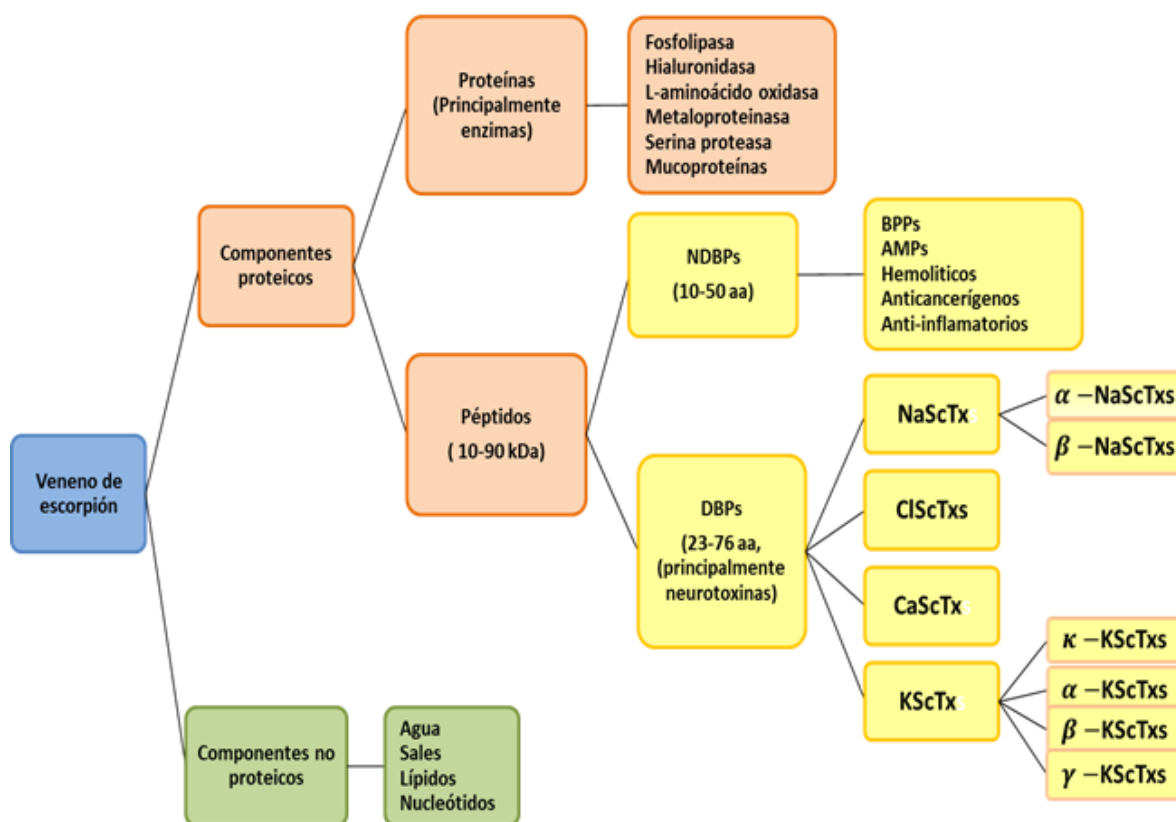


Figura 2. Composición del veneno de escorpión. DBPs: péptidos con puentes disulfuro. NDBPs: péptidos sin puentes disulfuro. BPP: péptidos potenciadores de bradicinina. AMPs: péptidos antimicrobianos. NaScTx, KScTx, CaScTx, ClScTx: Toxinas de los canales iónicos de sodio, potasio, calcio y cloruro, respectivamente. (adaptado de Abdel-Rahman *et al.*, 2015. Scorpion venom gland transcriptomics and proteomics: An overview. In venom genomics and proteomics. Springer).

Las toxinas que alteran la actividad de los VGKC se denominan "de cadena corta", presentan unos 35 residuos de longitud, mientras que las toxinas específicas para VGSC son

"de cadena larga", y presentan unos 64 residuos (Rodríguez de La Vega y Possani, 2005). Los esqueletos peptídicos de las toxinas, tanto de cadena corta como larga, adoptan un doblado consistente en una α -hélice conectada a tres hojas β antiparalelas mediante tres o cuatro puentes disulfuro (motivo α/β estabilizado por cisteína, $CS\alpha\beta$), presente en unas 600 de las aproximadamente 750 secuencias peptídicas identificadas en los venenos de escorpiones y correspondientes a toxinas específicas para canales de sodio y potasio (Jungo et al., 2012). Sin embargo, los péptidos del veneno de escorpión pueden adoptar otras estructuras como la hélice α lineal, el motivo α/α estabilizado por cisteína ($CS\alpha\alpha$) y el motivo de nudo inhibidor de cisteína (Figura 3). Solamente se ha investigado el veneno de unas cien, de las más de 2000 especies de escorpiones del mundo, de las cuales unas 30 especies contienen venenos peligrosos para los humanos (Revisado en Smith y Alewood, 2013).

Los síntomas observados después del envenenamiento escorpiónico, dependen del sitio de la picadura, la edad, el peso y el estado de salud de la víctima, de la especie de escorpión involucrada y la cantidad de veneno inyectada. El veneno se distribuye rápidamente desde el sitio de la picadura presentando en 10 minutos altas concentraciones en sangre (70% de la dosis total) y de allí hacia los compartimientos extravasculares del hígado y el corazón (15-30 min), con distribución más tardía en pulmones, bazo y páncreas (60 min), pero sin ser detectable en el sistema nervioso central, probablemente debido a la barrera hematoencefálica.

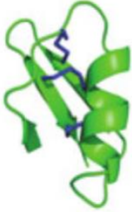
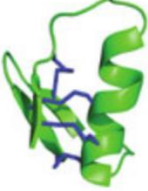
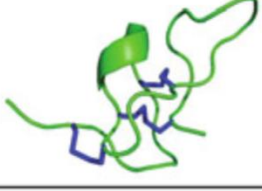
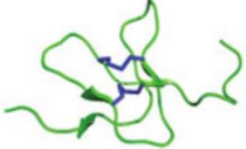
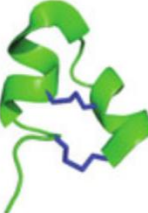
Estructura	Plegado; Dianas moleculares	Rango de tamaño (0.5 kDa más cercano)
	α/β estabilizada por Cys (cadena corta); Canales de potasio dependientes de voltaje y activados por calcio	2.5 to 5
	α/β estabilizada por Cys (cadena larga); canales de sodio dependientes de voltaje	6.5 to 8.5
	Nudo inhibidor de Cys (conteniendo hojas β antiparalelas y α -hélices); canales de cloruro de conductancia pequeña, metaloproteasas-2 de matriz, anexina A2, canales de potasio dependientes de voltaje	3.5 to 5
	Nudo inhibidor de Cys (principalmente espiral aleatoria; Receptores de ryanodina	4
	Horquilla dirigida por disulfuros; Receptores de rianodina	4
	α/α estabilizada por Cys; canales de potasio dependientes de voltaje	2.5 to 3
	α -hélice sin enlaces disulfuro; antibacterial y citolítica	1 to 5

Figura 3. Estructura, plegado y dianas moleculares de las toxinas de escorpión conocidas. Adaptado de Smith y Alewood, 2013.

Los primeros síntomas evolucionan desde signos locales (inquietud, sudoración, vómito, náusea, entumecimiento, inflamación) hacia choque distributivo en ausencia de tratamiento (desórdenes cardiovascular y respiratorio). Estas alteraciones hemodinámicas son la principal causa de muerte. Los venenos afectan el sistema cardiovascular causando arritmias cardíacas y edema pulmonar fatal. Se observa hipertensión en casos de envenenamiento moderado e hipertensión y edema agudo en casos severos (Revisado en Laraba-Djebari, Adi-Bessalem y Hammoudi-Triki, 2013). La concurrencia de procesos inflamatorios se ha demostrado en varios estudios experimentales (Petricevich, 2010).

4.3 ESCORPIONISMO

La picadura por escorpión, o escorpionismo, es un importante problema de salud pública en países como México, Brasil y Venezuela (De Sousa, 2006; De Sousa et al., 2000, 2006). Aunque en Colombia la picadura de escorpión es motivo de consulta médica en algunas regiones, predomina el sub-registro, y solamente desde 2008 Colombia aparece en la lista global de países afectados por escorpionismo severo (Chippaux y Goyffon, 2008). La severidad del accidente por picadura de escorpión se ha clasificado en tres categorías según los síntomas presentados. La clase I corresponde a manifestaciones locales: parestesias, dolor localizado, sudoración, hiperestesia, eritema. La clase II incluye manifestaciones sistémicas moderadas que no ponen en riesgo la vida del paciente, como náusea y emesis, sialorrea, agitación sicomotora, ataxia, diarrea, broncoespasmo, distonía, confusión, entre otros. La clase III corresponde a manifestaciones sistémicas que amenazan la vida: arritmia ventricular, hipotensión, bradicardia, edema pulmonar, convulsiones, compromiso neuromuscular y compromiso neurológico con coma (Revisado en Guerrero-Vargas, 2015).

La incidencia del accidente escorpiónico se ha incrementado en los últimos años especialmente en Caldas, Antioquia, Tolima, Huila, Cundinamarca, Valle del Cauca, Santanderes y San Andrés, desconociéndose exactamente los índices de morbilidad y mortalidad. Se han reportado casos fatales en poblaciones del valle del río Magdalena donde habitan las especies más peligrosas. En el departamento de Caldas se reportan numerosos accidentes anuales entre los que se registran casos graves y severos (Gómez y Otero, 2007; Gómez et al., 2010; 2011). Gómez y Otero, 2007, estudiaron aspectos biológicos y ecoepidemiológicos de los escorpiones de Colombia y su incidencia en las poblaciones humanas, encontrando que en Antioquia y Tolima las especies que podrían poner en grave riesgo la vida humana son *T. pachyurus*, *T. asthenes*, *T. fuhrmanni* y *C. gracilis*. Los autores estiman que, si se extrapolaran a toda Colombia los resultados obtenidos, se registrarían uno 4000 accidentes escorpiónicos cada año en el país, dado un sub-registro del 70-90%.

Según los registros del Centro de Investigación, Gestión e Información Toxicológica (CIGITOX) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, de los 1783 casos de accidentes con animales venenosos reportados en Colombia entre 2006 y 2010, el 25% involucraron escorpiones, con mayor incidencia en Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca. En ese período fue el segundo accidente en prevalencia, después de la mordedura de serpiente, y se reportaron cinco casos de muerte de niños por picadura de *T. pachyurus* (Revisado en Guerrero-Vargas et al., 2015).

La Guía para el Manejo de Urgencias Toxicológicas del Ministerio de Salud de Colombia incluye desde 2008 el escorpionismo como urgencia toxicológica, y menciona entre los posibles complicaciones, los efectos cardiovasculares del veneno: efecto cronotrópico

positivo, hipertensión y taquicardia o hipotensión y bradicardia (según la predominancia del efecto adrenérgico o colinérgico del veneno), aumento del consumo miocárdico de oxígeno (contribuyendo a la presentación de alteraciones electrocardiográficas como elevación del segmento ST y a la aparición de otros signos y síntomas isquémicos), aparición de arritmias y defectos de la contractilidad miocárdica. En la Guía se recomienda un manejo general del escorpionismo encaminado a estabilizar al paciente y controlar los síntomas del envenenamiento, y en casos severos, soporte hemodinámico y ventilatorio, y uso de suero antiescorpiónico (Minsalud, 2008).

Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del envenenamiento por *T. pachyurus* se estudiaron en Colombia, con evaluación de la DL_{50} por vía intraperitoneal en ratones (4,8 $\mu\text{g/kg}$). La inoculación del veneno por vía intraperitoneal (IP) en ratones causó signos tóxicos evidentes en los primeros 15-30 minutos después de la inyección (sialorrea, dificultad respiratoria, sudoración generalizada, ataxia y alteraciones del comportamiento, hiperhidrosis, y lacrimación) y muerte en las primeras 3 horas. Se observó hiperglucemia 3 y 24 horas después de la inyección de la mitad de la DL_{50} del veneno por vía intraperitoneal (IP) (Barona *et al.*, 2004). Un caso de envenenamiento severo causado por *T. Pachyurus* en un niño de 12 años en Tolemaida (Cundinamarca), fue reportado en 2012. La complicación de los síntomas iniciales, que progresaron a incremento de la presión sanguínea, falla respiratoria, signos de edema pulmonar y falla cardíaca, demandó atención médica de complejidad y tratamiento con antiveneno, al cual respondió bien, siendo dado de alta 10 días después de la hospitalización (Izquierdo y Rodríguez, 2012).

Un estudio de picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá (Antioquia), reportó la evaluación de la DL₅₀ por vía IP en ratones (6.1 mg de veneno/kg ratón) y la aparición de los signos más frecuentes de envenenamiento 10-15 minutos después de la inyección (sialorrea, piloerección, pelambre mojado por secreciones muscarínicas e hipoactividad). Entre los 20 y 30 minutos los ratones presentaron ataxia, pelaje mojado, taquicardia, lagrimeo, taquipnea, cianosis y muerte (Gómez et al, 2010).

Marinkelle y Stahnke, 1965, en el único estudio realizado en Cali, analizaron casos de pacientes picados por el escorpión *C. margaritatus* atendidos en hospitales y centros de salud de la ciudad. Encontraron como síntomas más comunes, dolor local, equimosis, sudoración, entumecimiento, mareos y escalofríos. En las zonas montañosas de Cali el escorpión *Tityus forcípula* suele invadir las viviendas provocando accidentes de consideración caracterizados por intenso dolor local y síntomas de envenenamiento sistémico. En la literatura revisada no se encontraron estudios clínicos ni epidemiológicos sobre el accidente escorpiónico por *T. forcípula* en Colombia y no hay referencias a caracterización del veneno de esta especie.

4.4 CANALES DE SODIO

Los canales Na_v están formados por una subunidad α única, formadora del poro (aprox. 260 kDa) y una o más subunidades β auxiliares (β 1- β 4, 30 a 40 kDa), que modulan la expresión y propiedades funcionales de la subunidad α . Los canales Na_v constan de cuatro dominios homólogos (DI, DII, DIII y DIV) cada uno con 6 segmentos transmembrana (STM) α -helicoidales (S1 a S6), dispuestos concéntricamente alrededor del poro de conductividad de iones del canal, que a su vez está formado por las hélices S5-S6 y sus bucles enlazantes

(Figura 4). El filtro de selectividad formado por cuatro residuos de glutamato en el poro, confiere la alta selectividad característica de estos canales. Este arreglo estructural fue confirmado por la resolución de la estructura cristalina del canal bacteriano homotetramérico, aunque la estructura de alta resolución del canal Na_v de mamíferos no ha sido aún determinada (Revisado en Israel, Tay, Deuis y Vetter, 2017).

En un modelo simplificado, los canales de Na_v presentan tres estados discretos: reposo (cerrado, impermeable), abierto (activo, permeable) e inactivo (impermeable). La despolarización de la membrana hace que el canal pase del reposo al estado activo, permitiendo el flujo de iones Na^+ a favor de su gradiente de concentración. La rápida inactivación del canal detiene la conductancia de los iones, requisito necesario para el retorno de la membrana a su potencial de reposo. La recuperación de la inactivación, proceso relativamente mal comprendido, completa la transición, regresando los canales inactivados al estado de reposo. Los péptidos específicos para canales Na_v actúan modulando la permeabilidad de los iones y afectando la transición entre estados, lo que lleva a diversos efectos funcionales.

La activación del canal Na_v depende fundamentalmente de los segmentos transmembrana S4 de los dominios I a III, cada uno de los cuales contiene un motivo repetido de residuos aminoacídicos positivamente cargados, separados uniformemente por aminoácidos no polares. La despolarización de la membrana causa el movimiento de estas "cargas de activación" hacia la superficie, y el cambio conformacional resultante abre el poro y permite el paso de los iones Na^+ (Catterall, 2009). La inactivación del canal puede ocurrir desde el estado abierto (inactivación rápida) o desde el estado cerrado (inactivación de estado cerrado). La

inactivación rápida bloquea físicamente el movimiento de iones, tiene lugar pocos ms después de la activación y es el resultado de la oclusión del poro por la partícula citosólica de inactivación (el bucle intracelular que enlaza DIII y DIV), luego del movimiento de los sensores de voltaje, en particular de DIV, lo cual expone el sitio de unión de la partícula de inactivación. Sin embargo, el canal no tiene que abrirse completamente antes de ser bloqueado por la partícula de inactivación. El movimiento de dos de los dominios sensores de voltaje puede ser suficiente para que la partícula de inactivación se una, posibilitando que los canales Nav pasen directamente del estado cerrado al estado inactivado en condiciones que favorecen cinéticamente el desarrollo de la inactivación (Armstrong, 2006).

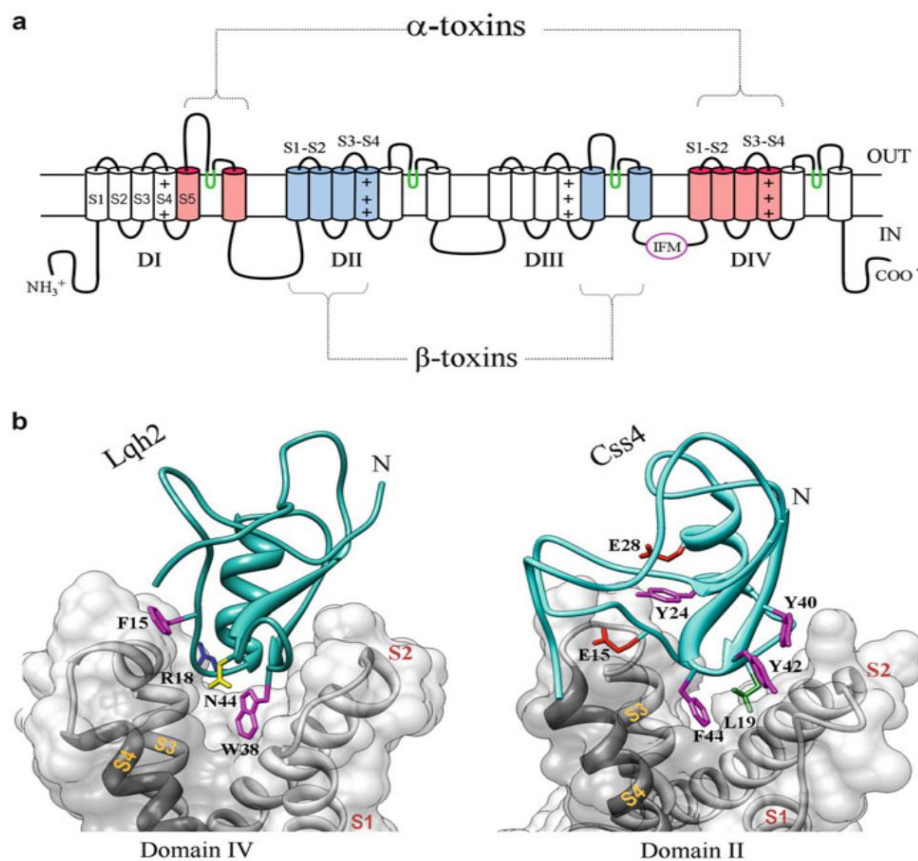


Figura 4. Sitio de unión de las toxinas de escorpión α y β sobre los canales Nav. A) Esquema de la subunidad α formadora del poro y las regiones de los sitios receptores 3 (rojo) y 4 (azul). Los dominios DI a DIV se ensamblan en la membrana alrededor del canal del poro (verde). B) superficie de interacción de las toxinas Lqh2 α y Csx4 β con el canal rNav1.2a, de cerebro de rata (Tomado de Gurevitz et al, 2015).

La "inactivación lenta" es un tipo distinto de inactivación que no implica el movimiento de la partícula de inactivación, y se produce después de una despolarización prolongada de la membrana o un largo período de disparo de potenciales de acción con alta frecuencia. Los canales en estado de inactivación lenta requieren períodos más largos (100 ms a 10 s) de tiempo para recuperarse. Se cree que la inactivación lenta surge de un cambio conformacional en el canal, muy probablemente asociado con la región DIV/S4 y los segmentos S6 formadores de poro, de modo que el poro no estaría completamente bloqueado (Payandeh et al., 2012).

Tipo	Sensibilidad TTX	Tejido Primario	Tejido No excitable	Canalopatías
Na _v 1.1	S	Neuronas del SNC	Microglía	Epilepsia, migraña
Na _v 1.2	S	Neuronas del SNC	Islotes de células β	Epilepsia
Na _v 1.3	S	Neuronas del SNC	Islotes de células β	Epilepsia
Na _v 1.4	S	Músculo Esquelético	Células cancerosas	Miotonía, Parálisis periódica
Na _v 1.5	R	Músculo Esquelético No Inervado, Corazón	Macrófagos, Microglía, Astrocitos, Células cancerosas	Arritmias cardíacas
Na _v 1.6	S	Neuronas del SNC	Macrófagos, Microglía, Células cancerosas	Epilepsia, desórdenes del movimiento
Na _v 1.7	S	Neuronas del SNP	Células dendríticas, Células cancerosas	Sensibilidad alterada al dolor
Na _v 1.8	R	Neuronas del SNP	Keratinocitos	Sensibilidad alterada al dolor
Na _v 1.9	R	Neuronas del SNP	Glía de Müller	Sensibilidad alterada al dolor

Tabla 1. Distribución de isoformas de Na_v en tejidos excitables y no excitables, y patologías asociadas a mutaciones de pérdida o ganancia de función.

En mamíferos se conocen nueve genes que codifican las isoformas de la subunidad α del canal Na_v, y se expresan en tejidos excitables y no excitables. Las mutaciones asociadas a

pérdida o ganancia de función del Na_v , ocasionan varias patologías, algunas de las cuales se presentan en la tabla 1. Las isoformas Na_v 1.1 y Na_v 1.2 se expresan predominantemente en sistema nervioso, Na_v 1.4 en músculo esquelético, Na_v 1.5 en músculo cardíaco, Na_v 1.7 y Na_v 1.8 en sistema nervioso periférico, asociados a nocicepción.

4.5 SODIO TOXINAS DE ESCORPIÓN: PÉPTIDOS DE VENENOS DE ESCORPIÓN QUE BLOQUEAN SELECTIVAMENTE LOS VGSC

Los péptidos específicos para canales de Na^+ son uno de los principales causantes de la toxicidad de los venenos de escorpión en mamíferos e insectos. Se han identificado al menos tres tipos de toxinas moduladoras de la actividad de los VGSC, identificadas como NaTx según la nomenclatura propuesta por Tytgat, 1999, de las cuales las α -NaTx son las más investigadas. Las α -NaTx se unen de forma dependiente de voltaje al sitio del canal determinado farmacológicamente como sitio receptor 3 (Figura 4), e inhiben la inactivación rápida de la corriente de sodio (I_{Na}) en experimentos de voltaje controlado. El enlentecimiento de la inactivación se ha atribuido a la perturbación del movimiento hacia afuera de la membrana, del sensor de voltaje DIV/S4 durante la activación del canal, movimiento que se acopla al cambio conformacional que lleva a la inactivación rápida de la I_{Na} (Cestèle et al., 2006; Campos et al., 2008).

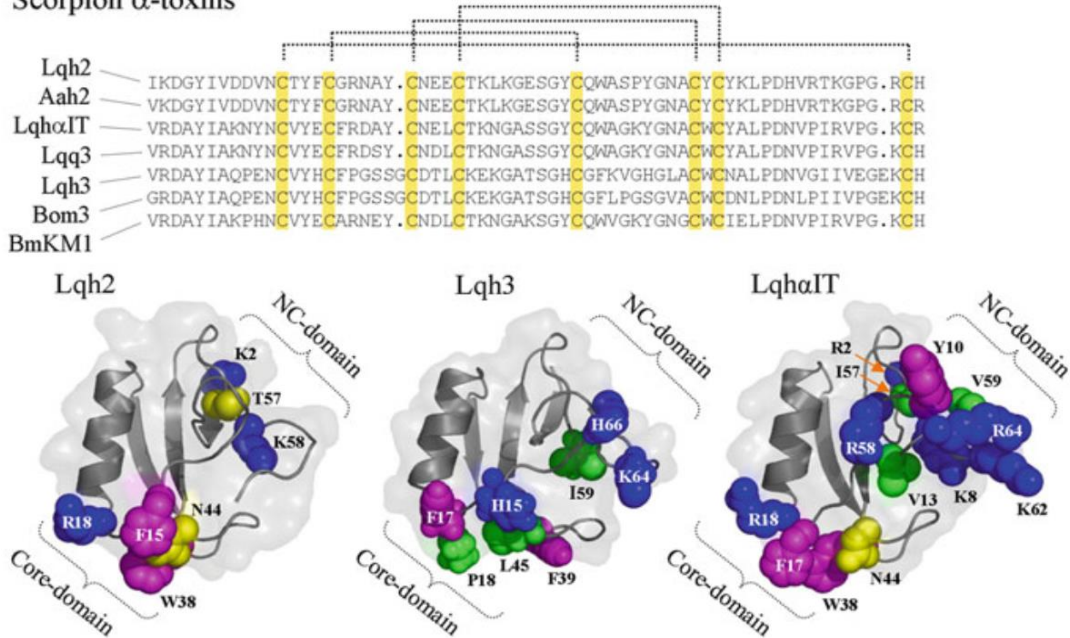
Según se revisa en Gurevitz et al., 2015, las α -NaTx difieren en especificidad respecto a los VGSC de insectos y mamíferos, así como en potencia en ensayos de competición de unión entre preparados neuronales, y de acuerdo con esto, se han dividido en tres grupos: (1) α -Toxinas anti mamífero, presentes en escorpiones del Viejo y del Nuevo Mundo, se unen con alta afinidad a sinaptosomas de rata (K_d 0.2-0.3 nM), son muy activas mediante inyección

intra cerebro ventricular (ICV) en ratones, pero débilmente tóxicas cuando se inyectan a insectos. (2) α -Toxinas muy activas sobre insectos y muy débiles en ratones mediante ICV, se unen con afinidad <1 nM a preparaciones neuronales de insecto y compiten en rango μ M en ensayos de unión en preparados de sinaptosoma de rata. (3) Toxinas tipo α , tóxicas cuando se inyectan en insectos y activas en ratones mediante inyección ICV.

Las β -NaTx se caracterizan por modificar la activación del canal Nav hacia potenciales de membrana más negativos, aunque presentan secuencias y selectividad variable e inducen también síntomas variables cuando se inyectan en animales. El receptor se ha denominado sitio receptor 4 de neurotoxina (Figura 4). No se han establecido completamente las características de la interacción entre el sitio receptor 4 del canal Nav y las β -Tx, pero la evidencia sugiere que el receptor comprende los dominios II y III del Nav, y que el efecto se debe al atrapamiento de DII/S4 durante la despolarización de la membrana.

Con base en ensayos de competición, la β -toxinas se han dividido en cuatro grupos farmacológicos: (1) β -Toxinas antimamífero, encontradas en escorpiones del Nuevo Mundo, se unen de forma independiente de voltaje y con alta afinidad al sitio 4 en sinaptosomas de rata. (2) β -Toxinas excitatorias selectivas anti-insecto, que inducen parálisis espástica en larvas de insecto por actividad repetitiva de nervios motores a consecuencia del incremento de las I_{Na} y el enlentecimiento de la inactivación de los canales Nav. (3) β -Toxinas depresoras anti-insecto, prácticamente inocuas cuando se inyectan en ratones, inducen parálisis flácida en larvas de insecto, y en experimentos de voltaje controlado despolarizan axones de cucaracha y bloquean la corriente pico transitoria de entrada. (4) β -Toxinas que se unen con alta afinidad, tanto a canales Nav de mamífero, como de insecto (Revisado en Gurevitz et al., 2013).

Scorpion α -toxins



Scorpion β -toxins

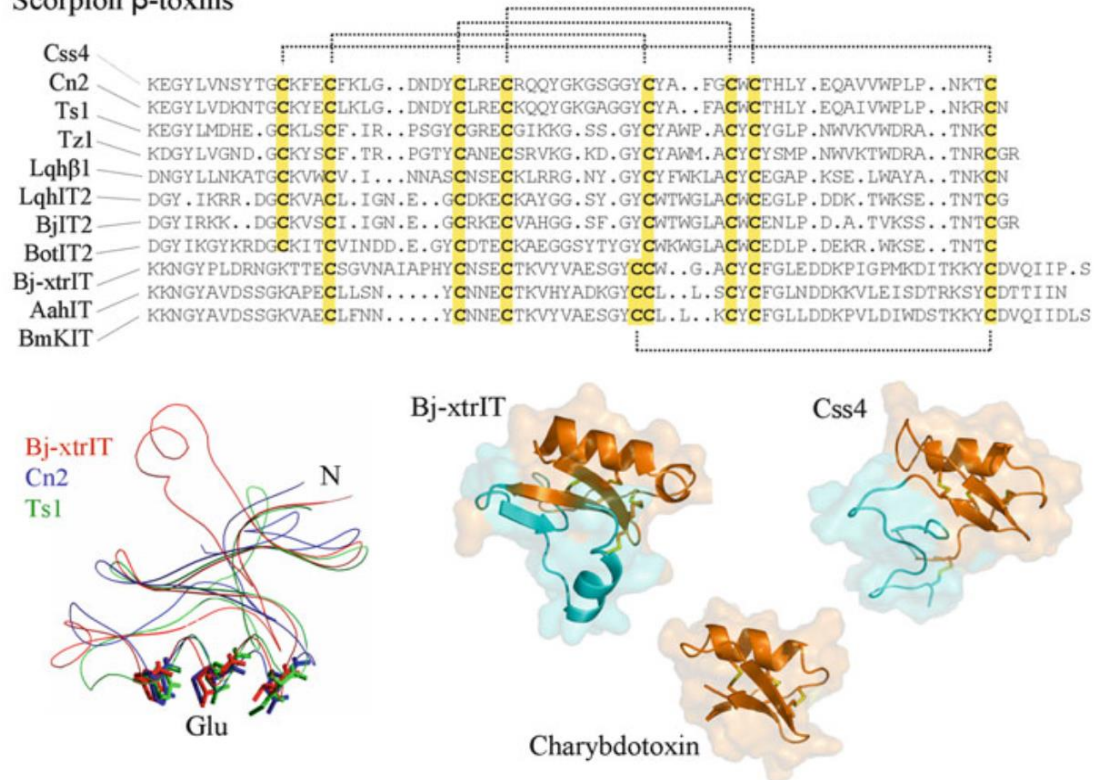


Figura 5. Alineamientos múltiples de NaScTx y epítopos funcionales de α y β toxinas de escorpión seleccionadas. Las secuencias se alinean según los residuos altamente conservados de Cys. Lqh *Leiurus quiquettrius hebraeus*, Aah *Androctonus australis hector*, Lqq *L. q. quiquettrius*, Bom *Buthus occitanus mardochei*, BmK *Mesobuthus martensii* Karsch, Css *Centruroides suffusus suffusus*, Cn *Centruroides noxius*, Ts *Tityus serrulatus*, Tz *tityus zulianus*, Bj *Buthotus judaicus*, Bot *Buthus occitanus tunetatus* (tomado de Gurevitz et al., 2015).

Guerrero-Vargas *et al.*, 2012, clonaron escorpiotoxinas putativas específicas para canales de sodio a partir de glándulas del veneno de *T. pachyurus*, analizaron sus relaciones filogenéticas con escorpiotoxinas conocidas de otras especies de *Tityus*, y mediante aproximación proteómica obtuvieron las secuencias aminoacídicas y las masas molares.

4.6 SODIO TOXINAS DE ESCORPIÓN COMO FUENTES TERAPÉUTICAS POTENCIALES

Las toxinas de escorpión ofrecen posibilidades para el desarrollo de nuevos analgésicos debido a su capacidad para modular la función de los VGSC con alta especificidad. En la medicina tradicional china se usan los escorpiones enteros, las colas y extractos del veneno, en el tratamiento de enfermedades neurales y dolor crónico (Liu *et al.*, 2008). En años recientes los VGSCs han sido considerados como nuevas dianas moleculares en el tratamiento de estados de dolor crónico. Estudios fisiológicos y farmacológicos han mostrado el papel crítico de los VGSC en el dolor crónico asociado con lesión tisular o nerviosa (Krafte *et al.*, 2008), resultados confirmados por estudios de genética humana y ratones knock-out (Cummins *et al.*, 2007).

El veneno del escorpión asiático *Buthus martensii* Karsch (*BmK*, familia Buthidae) es fuente de péptidos moduladores específicos de los VGSC, y se ha investigado su potencial terapéutico en el desarrollo de nuevos analgésicos. Las α -toxinas *BmK* I y *BmK*Abt inducen efectos nociceptivos en ratas, en tanto que las β -neurotoxinas *BmK* AS, *BmK* AS-1 y *BmK* IT2 producen efectos antinociceptivos potentes en modelos animales de dolor. *BmK* I prolonga fuertemente la inactivación rápida de las I_{Na} sensibles a tetrodotoxina (TTX-S) en neuronas de ganglio dorsal de rata (GRD) y aumenta la amplitud de la corriente pico. *BmK*

IT2 y *BmKASs*, suprimen fuertemente tanto los picos de corriente resistente a TTX como los sensitivos, en neuronas pequeñas de DRG de rata. Sin embargo, el desconocimiento completo de la estructura del canal Na_v de mamíferos ha retrasado la descripción molecular detallada de la interacción toxina-canal, y por tanto el potencial uso de las escorpiotoxinas como agentes terapéuticos (Revisado en Gurevitz et al., 2015).

4.7 LOS CANALES DE POTASIO

Los canales selectivos para el transporte de K^+ , son el grupo más grande y diverso de canales iónicos, con variedad de cinética, estructura, farmacología y propiedades de regulación, y roles fundamentales en múltiples procesos celulares (Figura 6). Los canales de K^+ se clasifican en tres clases principales dependiendo de su estructura y función: (1) Canales dependientes de voltaje (K_v , con 6STM), (2) canales rectificadores de entrada (Kir , con 2STM) y (3) canales con dominio de poro en tándem (K2P , con 4STM). También existen canales de K^+ regulados por ligando, con dos o seis STM (Kuang et al., 2015). Los canales K_v (con 6STM) se han dividido en 5 subclases: Canales de potasio dependientes de voltaje (VGKC, o también K_v), canales tipo KQT, canales relacionados con *ether-a-go-go* (EAG), que incluyen canales eag, herg y elk, canales modulados por nucleótidos cíclicos (KCNG) y los canales de K^+ activados por Ca^{+2} , de conductancia pequeña e intermedia (SKCa e IKCa, respectivamente). Los canales con 6STM se componen de 4 subunidades homotetraméricas y son dianas de toxinas de escorpiones (Martin-Euclaire, Pimenta, Bougis y De Lima, 2016). Estos VGKC están conformados por las subunidades formadoras del poro y las subunidades reguladoras. La estructura del poro es similar en todos los tipos de canales K_v . La subunidad reguladora es sensible a diversos estímulos, su estructura es menos conocida y difiere entre

las clases de canales K_V . El sitio activo de los canales K_V se compone de cuatro secuencias TVGYG altamente conservadas, que actúa como filtro de selectividad para el movimiento de iones K^+ con velocidad cercana al límite de difusión (10^7 iones·canal⁻¹·s⁻¹), y permeabilidad 10000 veces mayor para iones K^+ que para Na^+ . Algunos canales K_V presentan inactivación, de modo que pasan a estados estables no permeables poco después de la apertura (Kuang *et al.*, 2015). El poro del canal consta de cuatro subunidades, con el núcleo de una subunidad compuesto como mínimo por dos STM α -helicoidales y un bucle externo (bucle P) que forma la región del poro (Figura 6).

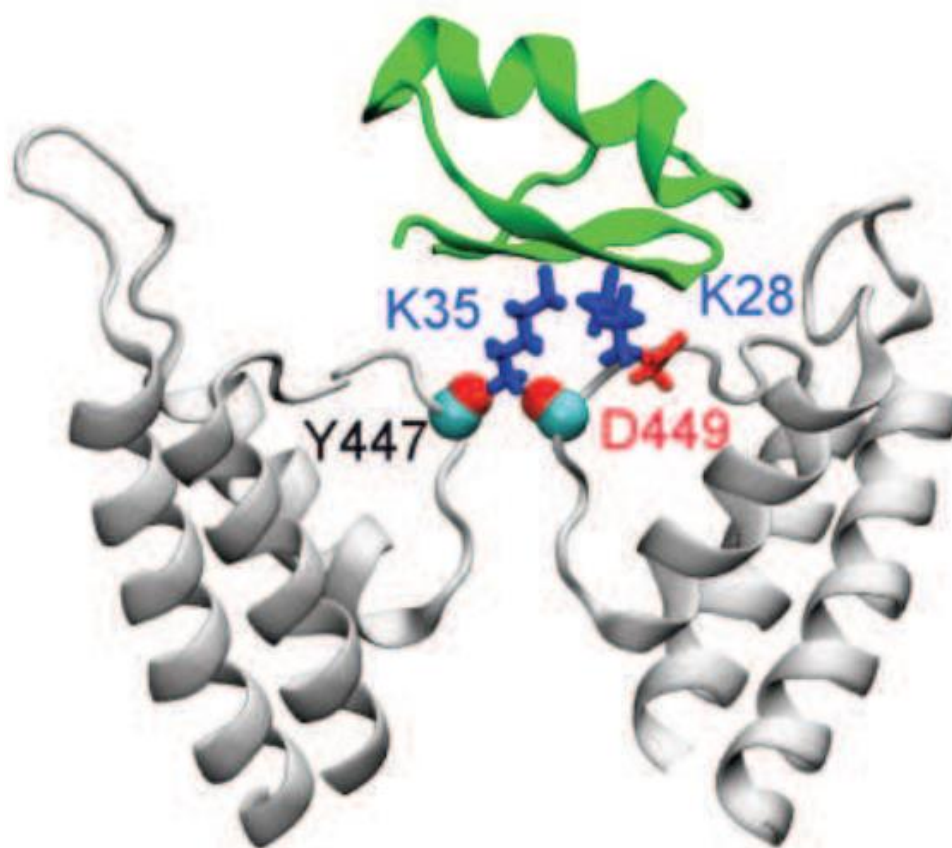


Figura 6. Esquema de los canales K_V mostrando el mecanismo de modificación de la permeabilidad por las KScTx. Este ejemplo ilustra la unión de la KTx de *C. margaritatus* MgTx (en color verde), al vestíbulo exterior de $K_V1.3$, una diana farmacológica en inmunosupresión. Mediante simulaciones de docking y dinámica molecular, se estudió la formación del complejo MgTx- $K_V1.3$. Se estableció que el residuo MgTx-Lys35 ocluye el filtro de selectividad y MgTx-Lys28 forma un puente salino con $K_V1.3$ -Asp449 en el lado exterior del filtro. (Tomado de Chen y Chung, 2014. Binding Modes of Two Scorpion Toxins to the Voltage-Gated Potassium Channel $K_V1.3$ Revealed from Molecular Dynamics. Toxins).

4.8 POTASIO TOXINAS: PÉPTIDOS DE VENENOS DE ESCORPIÓN QUE ALTERAN SELECTIVAMENTE LOS VGKC

Se han aislado más de 120 péptidos en el veneno de escorpión que son bloqueadores de los VGKC, los cuales se han clasificado en 22 familias, y se identifican como KTx de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Tytgat, 1999. Las KTx interactúan con los VGKC de manera electrostática e hidrofóbica, mediante un residuo de lisina que ocluye el poro del canal (Figura 6). Muchas KTx presentan alta especificidad y afinidad hacia su canal diana (Martin-Euclaire et al, 2016). En las KTx se incluyen péptidos de cadena corta (23-43 residuos) y de cadena larga (42-84 residuos), con estructura estabilizada por 3-4 puentes disulfuro. Las KTx se han agrupado en cuatro familias principales (α , β , γ y κ), con base en similitud estructural y afinidad hacia los varios tipos de canales K_V . Excepto por las κ -KTx, todos los grupos comparten el motivo estructural $CS\alpha\beta$, con una α -hélice conectada a dos hojas β por dos puentes disulfuro en configuración C_i-C_j y $C_{i+4}-C_{j+2}$ (Bartok, Panyi y Varga, 2014).

La "díada funcional", fundamental en muchas KTx para el bloqueo del canal K_V con alta afinidad, consiste en un par de residuos altamente conservados, una lisina y otro residuo usualmente aromático, a menudo situado nueve residuos más allá, a una distancia de unos 7 Å, que juega un papel importante en el bloqueo del canal cuando la lisina positivamente cargada protruye hacia el filtro de selectividad del VGKC (Figura 6). Se han descrito KTx sin la díada, que igualmente bloquean con alta afinidad canales K_V . La estructura peptídica primaria, el arreglo de la díada y los residuos del entorno, definen la selectividad y afinidad por los diferentes tipos de VGKCs (Rodríguez de la Vega y Possani, 2004).

Las α -KTx forman la familia más grande, con 23-43 residuos, la gran mayoría con tres puentes disulfuro, y bloquean canales K_V tipo Shaker y canales de K^+ activados por Ca^{+2} . Las β -KTx son más largas (47-84 residuos, estabilizadas por tres enlaces disulfuro) y contienen dos dominios funcionalmente diferentes: el segmento N-terminal, posiblemente α -helicoidal y de libre movimiento, y el segmento C-terminal, más compacto, rico en Cys, que contiene el típico motivo estructural $CS\alpha\beta$. El extremo N-terminal confiere actividad citolítica a la toxina, en tanto que el dominio C-terminal le confiere la capacidad de bloquear los canales K_v . La familia γ -KTx designa las toxinas que interactúan con los canales de K^+ de la familia ERG (gen relacionado con *ether-á-go-go*). Presentan 36-47 residuos y mayoritariamente cuatro puentes C-C. La familia más nueva y pequeña la forman las κ -KTX, que incluye péptidos de 22-28 residuos, y a diferencia de las otras familias de KTx, adopta una estructura formada por dos hojas β paralelas unidas por dos puentes disulfuro (Bartok et al., 2014).

La mayoría de las KTx aisladas bloquean selectivamente y con alta afinidad la familia de canales $K_V1.1$, particularmente $K_V1.2$ y $K_V1.3$. Ts7, la primera KTx purificada a partir del veneno de *Tityus serrulatus* (también denominada tityustoxina K- α , α -TsTx-K), bloqueó selectivamente y con alta afinidad canales K_V que no se inactivan, en sinaptosomas de cerebro de rata y canales $K_V1.3$ clonados. En experimentos electrofisiológicos, Ts7 mostró bloqueo sobre $K_V1.1$, $K_V1.2$, $K_V1.3$, $K_V1.6$ y Shaker (85%, 91%, 89%, 94% y 97%, respectivamente). Ts6 (butantoxina, familia alfa-KTx12.1), el primer bloqueador de canales de K^+ completamente secuenciado a partir de veneno de *T. serrulatus* (41 residuos, masa estimada de 4520 Da), bloqueó reversiblemente los canales K_V Shaker con afinidad nM, e inhibió la proliferación de células T y la producción de interleuquina-2 en células T colaboradoras (Martin-Eauclaire et al., 2016).

Barona *et al.*, 2006, hicieron el análisis proteómico del veneno del escorpión colombiano *T. pachyurus*, encontraron al menos 104 componentes de diferentes pesos moleculares y secuenciaron completamente tres péptidos, uno de los cuales (pm de 2457 Da, con 23 residuos y tres C-C) bloqueó el canal Shaker-B. Olamendi-Portugal *et al.*, 2016, aislaron nuevos péptidos del veneno de *Centruroides tecomanus* y encontraron cuatro péptidos con 32 a 39 residuos de aminoácidos y tres puentes disulfuro, pertenecientes a la familia α -KTx, que bloquearon K_v1.2 en concentración nM y mostraron varios grados de selectividad hacia K_v1.1, K_v1.3, Shaker y KCa3.1. Reportaron un quinto péptido (42 aminoácidos y 4 puentes disulfuro) clasificado como una γ -Ktx, que bloqueó canales ERG.

4.9 POTASIO TOXINAS DE ESCORPIÓN COMO POTENCIALES FÁRMACOS

Los canales de potasio de la familia K_v 1.1 son la diana principal de las toxinas peptídicas animales, en particular de las toxinas de escorpión. En tejidos eléctricamente excitables y no excitables, los VGKC participan en la señalización mediada por Ca²⁺, la regulación del volumen celular, la secreción, la migración y la proliferación celular, por lo que constituyen potenciales dianas farmacológicas para el tratamiento de cáncer, desórdenes autoinmunes, metabólicos, neurológicos y cardiovasculares (Martin-Euclaire *et al.*, 2016), y para el tratamiento de enfermedades que implican expresión aberrante de canales específicos, como diabetes, hipertensión, epilepsia y arritmia cardíaca (Huang y Jan, 2014).

Múltiples estudios reportan la expresión desregulada de diversos tipos de canales K_v en tejidos neoplásicos. Así, el canal K_v1.1 se sobre-expresa en ciertos tipos de meduloblastoma (Mcferrin y Sontheimer, 2006), K_v1.3 en cáncer de mama, colon y próstata, K_v11.1 (HERG)

se observa en varios tipos de cáncer de la sangre y en tumores sólidos, y K_v10.1 (EAG1) se sobreexpresa en más del 70% de tipos de cáncer en órganos diversos. La sobre-expresión del canal de potasio GIRK1 (KCNJ3) rectificador de entrada, se correlaciona con la presencia de cáncer de mama y el grado de metástasis a ganglios linfáticos. El canal K2P está sobreexpresado en cáncer de mama y pulmón (Huang y Jan, 2014). La inhibición farmacológica o la supresión genética de tipos específicos de canales de potasio reduce el crecimiento de múltiples tipos de cáncer, y se plantea que la mayoría de los canales de potasio desempeñen un papel "permisivo", como reguladores en procesos de proliferación y migración de células cancerígenas (Pardo y Stühmer, 2014; Huang y Jan, 2014).

Actualmente no existen fármacos contra el cáncer que funcionen como bloqueadores de canales de potasio, pero diversos estudios sugieren que los canales de potasio podrían ser dianas en la terapia antineoplásicas (Huang y Jan, 2014). La familia de canales de EAG (EAG1, EAG2 y HERG) ha sido ampliamente estudiada como diana terapéutica (Pardo *et al.*, 2005; Pardo y Stühmer, 2008). La margatoxina (MgTx, 39 residuos aminoácidos, pm 3185 Da) aislada del veneno de *Centruroides margaritatus* inhibió selectivamente corrientes tipo n en linfocitos T humanos a través de canales K_v1.3 (García-Calvo *et al.*, 1993), inhibió la proliferación de la línea celular A549 del adenocarcinoma de pulmón humano y causó reducción del volumen *in vivo* de un tumor en ratón (Jang *et al.*, 2011). La Iberiotoxina purificada a partir del veneno de *Mesobuthus tumulus* (IbTx, 37 residuos aminoácidos), bloqueó selectivamente canales maxi-K inhibiendo la proliferación de células de astrocitoma humano (Basrai *et al.*, 2002), indujo arresto en fase S y muerte celular en células de glioma (Weaver *et al.*, 2004) e inhibió el crecimiento de la línea celular PC-3 de cáncer de próstata (Bloch *et al.*, 2007).

4.10 VENÓMICA: TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA DEL VENENO DE ESCORPIÓN

El transcriptoma es el conjunto de ARNs presentes en una célula, tejido u órgano, en un momento dado, incluyendo los ARN mensajeros que codifican proteínas (ARNm), los ribosomales (ARNr), los de transferencia (ARNt), y otros no codificantes (ARN pequeños, ARNs). El estudio de especies venenosas es relevante principalmente por el veneno que producen, que en el caso de los escorpiones se restringe a la glándula del veneno (Rendón-Anaya, Camargo y Possani, 2015). Los venenos de escorpión pueden contener cientos de componentes incluyendo moléculas pequeñas, péptidos cortos y proteínas grandes (1-100 kDa), con variedad de propiedades físicas.

La venómica o estudio de los venenos escorpiónicos, se puede abordar desde el análisis del transcriptoma, o desde el estudio del proteoma. Actualmente las tecnologías de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS) proporcionan a bajo costo información de los transcritos que codifican péptidos y toxinas del veneno, a partir del transcriptoma de la glándula de veneno (Escoubas, 2006; Santibáñez-López y Possani, 2015).

Los estudios del transcriptoma han mostrado la presencia de transcritos que codifican para diversos péptidos con múltiples funciones potenciales: modificadores de los canales iónicos, factores activadores de lipólisis, fosfolipasas A2, serina proteasas, metaloproteasas, péptidos con actividad antimicrobial, antiparasitaria y antivírica entre otros (Ortiz et al., 2014; Luna-Ramírez et al., 2015; Quintero-Hernandez et al., 2015; Santibáñez-López y Possani, 2015; Santibáñez-López et al., 2016; Zhong et al., 2017).

Los estudios de transcriptoma tienen limitaciones, a pesar de ser una herramienta valiosa para explorar la variedad de péptidos y toxinas presentes en los venenos de escorpión. No necesariamente los niveles de transcripción se correlacionan con la expresión de péptidos del veneno. En todos los estudios de transcriptoma, un gran porcentaje de los marcadores de secuencia expresados (Expressed Sequence Tags, ESTs), codifican péptidos putativos del veneno con función desconocida, o sin homología con toxinas existentes. Además, el análisis transcriptómico no proporciona información sobre las modificaciones pos-traduccionales.

Por lo expuesto en el párrafo anterior, se requiere complementar el estudio de la composición de los venenos con métodos adicionales como la proteómica, la genómica y la caracterización bioquímica. Según Smith y Alewood, 2014, solamente en cinco estudios de venenos escorpiónicos se ha usado una combinación de aproximaciones transcriptómica y proteómica. El método más común de análisis proteómico implica el fraccionamiento mediante uno o más pasos cromatográficos, seguido del análisis de las fracciones por espectrometría de masas (mass-spectrometry, MS). Los métodos espectrométricos usuales implican la ionización de las muestras por electrospray (Electrospray ionization mass-spectrometry, ESI-MS), o la ionización/desorción láser asistida por matriz, con detector de tiempo de vuelo (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight, MALDI-ToF), y ambos han sido usados para el análisis proteómico de los venenos de escorpión.

4.11 NEUROTOXINAS Y CARDIOTOXINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL ESCORPIONISMO

Todas las especies de escorpiones producen veneno, pero solamente las especies de la familia Buthidae (y algunas especies de la familia Hemiiscorpidae) producen venenos

potencialmente peligrosos para la salud humana. En el Nuevo Mundo, las especies asociadas a riesgo sanitario se incluyen en los géneros *Centruroides* y *Tityus*. El riesgo es especialmente pediátrico, y probablemente la principal razón tiene que ver con la relación dosis de veneno/masa corporal para niños en comparación con adultos (Revisado en Bucaretschi et al., 2014).

En Brasil, las especies de escorpión responsables de los incidentes más graves pertenecen al género *Tityus*, y entre ellas las más peligrosas son *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* y *T. obscurus*. En un estudio retrospectivo de las consecuencias clínicas de las picaduras de escorpiones *Tityus* en Brasil (1994-2011), se encontró que pacientes atendidos por escorpionismo clase III, presentaron anormalidades de la química sanguínea (hiperglucemia, hipocalemia, leucocitosis; elevaciones de CK total, CK-MB y troponina T en suero; consumo de bicarbonato y aumento en el déficit de base y lactato en sangre), cambios electrocardiográficos (Segmento ST) y alteraciones ecocardiográficas (fracción de eyección ventricular <54%). Otros mediadores como NO, kininas, concentración de veneno circulante y efecto cardiotóxico directo del veneno, también se asociaron con la severidad del envenenamiento (Teixeira et al., 2001). La hiperglucemia, hipocalemia y leucocitosis observadas, fueron indicadores indirectos del aumento de la actividad adrenérgica, en tanto que el consumo de bicarbonato, el déficit básico y el aumento de lactato, se asociaron a la disminución de la perfusión tisular. Las alteraciones electrocardiográficas (cambios en ST) indicaron isquemia miocárdica transitoria. Los cambios en la fracción MB de fosfocreatinquinasa (CPK-MB), troponina T y parámetros ecocardiográficos, fueron mayores en los casos severos, indicando disfunción y lesión cardíaca transitoria (Revisado en Bucaretschi et al., 2014).

Guinand *et al.*, 2004, en un estudio con pacientes de escorpionismo por *T. discrepans* y *T. falconensis* en Venezuela, encontraron fuerte relación entre la fisiopatología del envenenamiento escorpiónico, y el aumento en los niveles de interleukina-6 (IL-6) y otras proteínas de fase inflamatoria aguda. La picadura de *T. falconensis* también produce elevación plasmática de IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y NO en los pacientes con complicaciones sistémicas, sin alteración de la glucemia ni la amilasa plasmáticas, indicando activación de mecanismos inflamatorios con poca actividad pancreatotóxica, a diferencia del escorpionismo por *T. discrepans*.

La miocarditis fue una complicación del escorpionismo grave por *T. falconensis*, indicada por la elevación de los niveles plasmáticos de CPK-MB en pacientes con envenenamiento sistémico (uno de ellos con valores 12 veces mayores que los de referencia), lo cual sugiere la presencia de toxinas cardiotóxicas en el veneno. Similarmente, el veneno de *T. Zulianus* produjo principalmente alteraciones cardiovasculares, lo cual sugiere alta presencia que cardiotoxinas en los venenos de escorpiones *Tityus* del occidente de Venezuela.

Teixeira *et al.*, 2001, encontraron efectos cronotrópicos e inotrópicos del veneno de *T. serrulatus* en un modelo aislado de corazón de rata (sistema Laghendorf), y mostraron que, si bien los primeros dependen de liberación de catecolaminas, el aumento de la contractilidad independiente de neurotransmisores parece deberse a una acción directa del veneno sobre los cardiomiocitos. Los autores sugieren que este efecto directo sobre las fibras cardíacas puede desempeñar un papel en el desarrollo de arritmias cardíacas y defectos de contractilidad en el escorpionismo por *T. serrulatus*.

El veneno de escorpión de *Hadruroides lunatus* (“escorpión de las rocas”, búpido común en la costa central peruana) indujo alteraciones cardiorrespiratorias en ratas Wistar macho envenenadas experimentalmente (aumento de la frecuencia cardíaca, arritmias). El análisis histopatológico del tejido pulmonar evidenció alteraciones significativas, con hemorragia difusa. La inmunofluorescencia mostró que el veneno de *H. lunatus* se unió a los cardiomiocitos. Cardiomiocitos ventriculares de ratón incubados con veneno de *H. lunatus* mostraron disminución significativa del calcio transitorio, confirmando el efecto tóxico del veneno de *H. lunatus* en el corazón (Costal-Oliveira *et al.*, 2017). Respecto a los búpidos del Viejo Mundo, Abdel-Rahman *et al.*, 2015, encontraron que el veneno del búpido asiático *Androctonus bicolor* alteró la actividad eléctrica cardíaca de sapos experimentalmente envenenados, a través de los receptores β -adrenérgicos.

Según se revisa en Housley *et al.*, 2017, en los venenos de escorpiones se han descrito 63 péptidos tóxicos únicos con acción específica sobre los VGSCs. Los péptidos muestran mecanismos de acción variados, que se presentan en un amplio rango de concentraciones (100 pM-30 μ M), y variabilidad en la afinidad por el canal. La toxina Cn8 de *C. noxius* presentó gran afinidad por $\text{Na}_v1.1$ y acción sobre $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.6$; la toxina Tf2 de *T. fasciolatus* activó selectivamente $\text{Na}_v1.3$. La toxina Ts1 (de *T. serrulatus*) es una de las mejor caracterizadas entre las específicas para $\text{Na}_v1.5$, en tanto que Cn2 de *C. noxius* inhibió selectivamente el canal $\text{Na}_v1.6$. La acción de los péptidos de escorpión sobre $\text{Na}_v1.8$ y $\text{Na}_v1.9$ no se ha caracterizado bien, aunque se ha reportado que TbScV (de *T. bahiensis*) y TsVII (de *T. serrulatus*), tienen acción potencial sobre estos canales (Housley *et al.*, 2017). En el Viejo Mundo, toxinas de *Buthus martensii* afectaron $\text{Na}_v1.5$ con efectos variados.

Aunque se discute la capacidad de los venenos de escorpión para superar la barrera hematoencefálica (BHE), se han aislado varias toxinas del veneno de *T. serrulatus*, y descrito sus efectos sobre el sistema nervioso central. Se han caracterizado electrofisiológicamente toxinas del veneno de *T. serrulatus*, como Ts1 (con acción de β -toxina clásica, modula la activación de $\text{Na}_V1.6$, $\text{Na}_V1.3$ y $\text{Na}_V1.5$), Ts2 (clasificada como α -Tx, impide la inactivación de $\text{Na}_V1.2$, $\text{Na}_V1.3$, $\text{Na}_V1.5$, $\text{Na}_V1.6$ y $\text{Na}_V1.7$), la α -toxina Ts3 (Revisado en Deuis, Mueller, Israel y Vetter, 2017), y la α -neurotoxina Ts5 (actúa sobre $\text{Na}_V1.2$, $\text{Na}_V1.3$, $\text{Na}_V1.4$, $\text{Na}_V1.5$, $\text{Na}_V1.6$ y $\text{Na}_V1.7$) (Revisado en Nencioni *et al.*, 2018).

5. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS EN MODELOS MURINOS Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA *IN VITRO* DEL VENENO ENTERO DE *Tityus forcípula*

5.1 METODOLOGÍA

5.1.1 Comité de ética, permisos de colecta y acceso a recursos genéticos

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle mediante acta 021-015. Para dar cumplimiento a la legislación colombiana vigente relacionada con la protección de la biodiversidad, se han adelantado los trámites correspondientes para la obtención del permiso de recolección regido por el Decreto 1376 de 2013. En este sentido se obtuvo permiso de recolección de especies en el marco de la Resolución 1070 del 28 de agosto de 2015 mediante la cual la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales ANLA concedió a la Universidad del Valle el Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial.

En el marco de la recolección y como parte de los compromisos de la Resolución 1070, se realizó la consulta al Ministerio del Interior sobre la presencia o no de comunidades étnicas en las zonas de colecta, y se obtuvo la certificación aclarando que no se registra presencia de comunidades indígenas, minorías, ROM, negras, afrocolombianas, raizales y palenqueras en el área del proyecto (certificación número 305 del 24 de marzo de 2015). Igualmente, considerando que en este proyecto se estudió la composición del veneno de la especie de escorpión *Tityus forcípula* (Gervais, 1843), con fines de comprender su variación molecular y

su evolución con respecto a otras especies de escorpión, no fue necesario un Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados. Los bioensayos que se adelantaron en el marco de este proyecto se hicieron con fines de caracterización molecular de los componentes del veneno y no con fines de bioprospección, ni de búsqueda de fármacos aunque esta aplicación se menciona como potencial para futuros estudios.

5.1.2 Animales para experimentación

Se utilizaron dos grupos de animales. Por una parte, ratones albinos CD1 (20 g de peso corporal aproximadamente), machos, adultos, suministrados por el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, para evaluar la toxicidad del veneno entero y sus fracciones y determinar la dosis letal 50 (DL₅₀). En estos experimentos, se siguieron los protocolos aprobados por el Comité de Ética (IBT, UNAM, México), utilizando una muestra reducida para evitar infligir dolor innecesario a los animales. Por otra parte, para las pruebas de Test de Irwin, hematología y química sanguínea, y test de nocicepción, se emplearon ratones albino suizo (*Mus musculus*) de la cepa CFW, machos adultos, con peso entre 20-25 g. Para evaluar el efecto del veneno entero sobre la presión arterial y frecuencia cardiaca se emplearon ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), machos adultos, con un peso entre 200-250 g.

Los ratones albino suizo y las ratas Wistar fueron suministrados por el laboratorio intermedio de investigación preclínica y bioterio (LABBIO), de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Durante la permanencia en el LABBIO los animales se distribuyeron en jaulas separadas, suministrándoles agua y alimento a demanda, se mantuvieron en condiciones ambientales de 25°C, humedad relativa entre el 45-55%, 12 h de luz/oscuridad y

niveles de ruido menores a 70 decibeles, y se supervisó el bienestar de los animales por el equipo investigador con apoyo de un veterinario. Al menos 2 veces al día se monitorearon los biomodelos en busca de signos de enfermedad o deterioro, observando la condición general del cuerpo, deshidratación, postura, tasa de respiración, inmovilidad, interacción social y respuesta a manipulación.

Para minimizar el sufrimiento durante los procedimientos experimentales, los animales se llevaron a sedación (pentobarbital IP, 60 mg/kg, Sigma, EE.UU.). Todos los procedimientos se realizaron respetando las normas de asepsia y antisepsia necesarias. Cuando en el curso de algún procedimiento se observó perturbación o sufrimiento en los animales, se les practicó inmediatamente la eutanasia (Eutanex IP, INVET, Colombia, 0.3 mL/kg de peso) y estos animales no se utilizaron para experimentación. En el diseño de los experimentos se tuvo en cuenta minimizar el sufrimiento y limitar el número de animales usados, y la manipulación se realizó de acuerdo a las normas éticas nacionales e internacionales recogidas en el manual del bioterio. Todos los protocolos experimentales se sometieron a la revisión del Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle. Al finalizar los ensayos los animales fueron sometidos a eutanasia (Eutanex IP, INVET, Colombia, 0.3 mL/kg de peso). La cantidad de biomodelos por prueba se describe a continuación en cada una de los experimentos realizados.

5.1.3 Colecta de escorpiones y extracción del veneno

Los escorpiones pertenecientes a la especie *Tityus forcípula* se capturaron entre las 17 y las 22 horas, utilizando luz UV, a lo largo de un sendero boscoso de la localidad Km 18 del

municipio de Cali, a una altitud de 1800 msnm (Figura 8). Se realizaron dos colectas, la primera en los meses de diciembre 2015 y enero 2016, y la segunda en julio 2018.

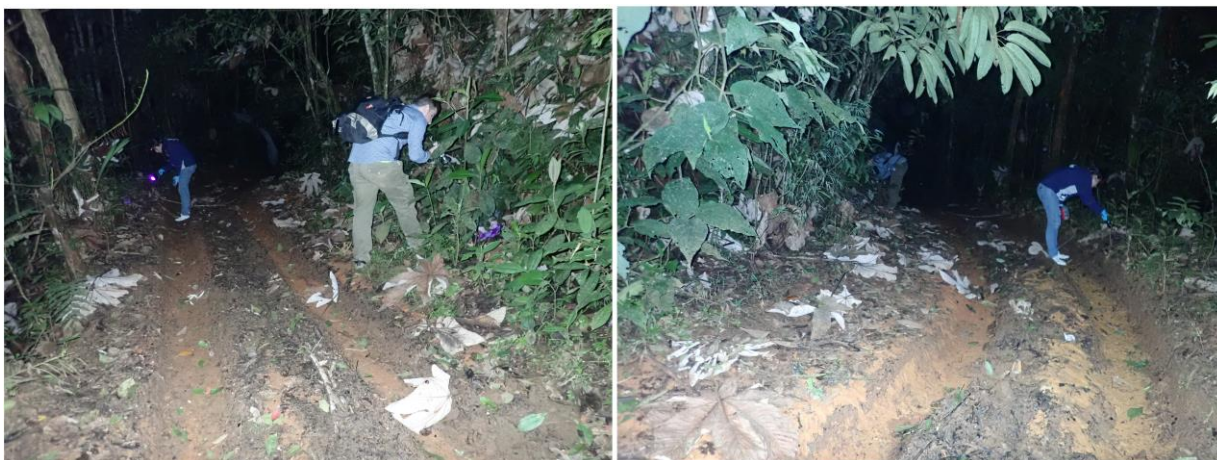


Figura 8. Hábitat de colecta, sendero boscoso en la localidad del Km 18 Vía al Mar. Se realizó búsqueda nocturna con lámparas UV.

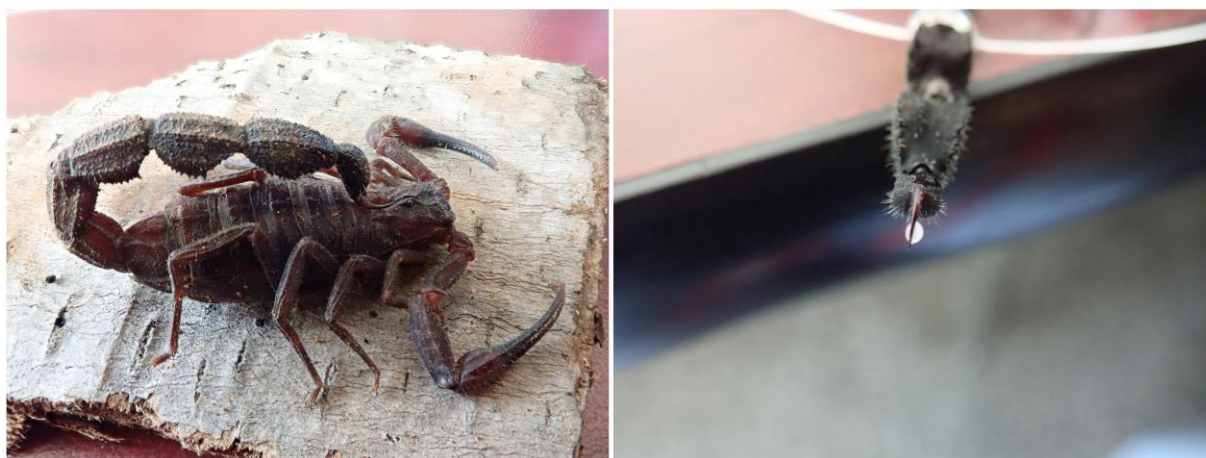


Figura 9. Obtención del veneno por estimulación eléctrica del telson. A la izquierda, ejemplar de *Tityus forcípula* mantenido en cautiverio. A la derecha, desvenenamiento del espécimen.

Los escorpiones de la primera colecta se desvenenaron una vez, mediante estimulación eléctrica del telson (Figura 9), y luego se liberaron. Los escorpiones de la segunda colecta se mantuvieron en cautiverio, en cajas plásticas, con sustrato al piso, agua a demanda, y alimento provisto una vez por semana (grillos y cucarachas). Cada individuo se desvenenó

tres veces con intervalos de un mes entre desvenenamientos, mediante estimulación eléctrica del telson. El veneno se resuspendió en agua tipo I y se centrifugó por 15 minutos a 14000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, que se liofilizó y se guardó a -10 °C hasta su uso. Este liofilizado se denomina veneno entero (DeRoodt *et al.*, 2010).

5.1.4 Contenido de proteína en el veneno entero

El contenido de proteína se evaluó según el método de Lowry modificado por Frye *et al.*, 1986, para determinación de absorbancia con espectrofotómetro automático en microplacas de 96 pozos (micro método de Lowry). El método se basa en formación de un complejo entre el ión cobre(II) y los enlace peptídicos de las proteínas para producir Cu(I) en condiciones alcalinas, según la reacción de Biuret, seguida de la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu para generar azul de heteropolimolibdeno por la oxidación de aminoácidos aromáticos catalizada por cobre (Figura10).

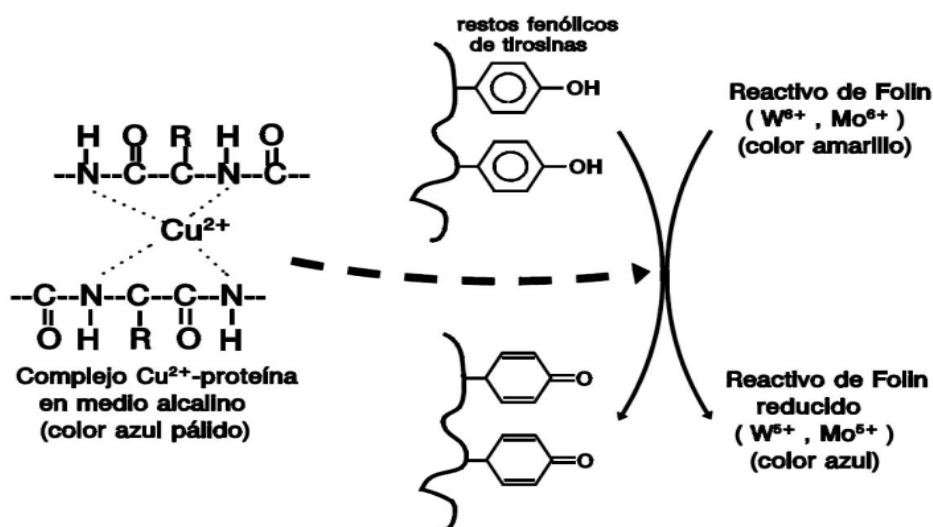


Figura 10. Método de Lowry. En el primer paso los enlaces peptídicos reaccionan con Cu^{+2} produciendo Cu^{+1} , y en el segundo paso la reducción del reactivo de Folin por grupos aromáticos, catalizada por Cu^{+1} , genera el compuesto coloreado que puede cuantificarse determinando la absorbancia a 550-750 nm.

Se construyó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) para determinar la concentración de proteína de una muestra de veneno entero de *T. forcipula*. Muestras de 100 µL de proteína estándar BSA (concentraciones de 100, 200, 500, 1000 y 2000 µg/mL) y 100 µL de veneno de *T. forcipula*, se llevaron a viales de reacción con 100 µL de NaOH 2M y se incubaron a 100°C durante 10 min. Enseguida se adicionó 1 mL del reactivo formador del complejo Cu-proteína (2% Na₂CO₃, 1% CuSO₄·5H₂O y 2% KNaC₄H₄O₆·4H₂O) y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 10 min. Se adicionó 1 mL del reactivo de Folin, se sirvieron alícuotas de 250 µL en una microplaca de 96 pozos, y se leyó la absorbancia en modo single a 570 nm, en un lector de microplacas (iMarkMicroplate Reader, Bio-Rad Laboratories, CA, EE.UU.), dentro de los 60 minutos siguientes. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. Los reactivos para el ensayo fueron grado analítico y se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis Missouri, EE. UU.). La concentración de proteína en el veneno entero se comparó con la concentración obtenida mediante mediciones en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Waltham, Massachussets, EE.UU.), en el modo preconfigurado Protein A260/A280.

5.1.5 Dosis letal 50 (DL₅₀) y neurotoxicidad del veneno entero en ratones

El test de letalidad se realizó en ratones albinos CD1 (n=9, machos, aproximadamente 20 g de peso corporal), mediante inyección IP de dosis variables de veneno soluble en 200 µL de PBS, pH 7.4. El valor de la DL₅₀ se determinó mediante el método arriba y abajo (Up-and-Down) para pequeñas muestras según Dixon, 1965. Los métodos basados en “Up-and-Down” son recomendados por la OCDE y la UE desde 2002, para minimizar el número de animales utilizados en ensayos de toxicidad aguda. Brevemente, se inyectó un solo animal en cada

experimento, se observó el resultado en las 48 horas siguientes (muerte=X, sobrevivida=O), para determinar la dosis a aplicar al siguiente animal (Bruce, 1985). El primer animal se inyectó con una dosis de veneno soluble de 50.1 $\mu\text{g}/20\text{ g}$ de peso corporal de ratón, estimativo basado en reportes previos de toxicidad de escorpiones del género *Tityus*. El ratón murió a los 67 minutos posinyección y se inyectó el segundo biomodelo con una dosis de 49.0 $\mu\text{g}/20\text{ g}$ ratón. Dado que el segundo ratón murió dentro de las dos horas siguientes a la inyección, se inyectó el tercer biomodelo con 47.9 μg veneno/20 g de ratón. Este animal murió en las 12 horas siguientes a la inyección, por lo cual se inyectó el cuarto ratón con 46.8 μg veneno/20 g ratón. El cuarto biomodelo mostró signos de intoxicación sistémica, pero se recuperó, por lo cual el quinto ratón se inyectó con la siguiente dosis alta (47.9 $\mu\text{g}/20\text{ g}$ de ratón).

El procedimiento se repitió con cada ratón, subiendo la dosis en caso de supervivencia del animal precedente y bajándola en caso de muerte, hasta obtener una tendencia estable de muerte/sobrevivencia. Las dosis (D) se calcularon de modo que la diferencia entre los valores de la variable normalizada ($\log D$) fuera siempre constante e igual a 0.01, para cumplir los supuestos de la prueba. La transformación $\log D$ es necesaria para garantizar la distribución normal de la variable en una muestra pequeña, de modo que el método estima la DL_{50} a través de $\log DL_{50}$ (Dixon, 1965).

La toxicidad de las fracciones cromatográficas y de péptidos purificados se determinó en ratones CD1 mediante inyección IP de 50 μL , o inyección intracerebroventricular (ICV), de 0.5 μg de la fracción purificada suspendida en 5 μL de PBS, pH 7.4. Este último procedimiento fue necesario, dado que en las etapas finales de purificación se obtienen cantidades cada vez menores del material de interés.

La neurotoxicidad y los efectos sistémicos del veneno entero se evaluaron mediante el test de Irwin modificado en grupos de ratones albino suizo cepa CFW. Los animales se separaron aleatoriamente en tres grupos experimentales (n=6, 20 g de peso corporal aproximadamente). Dosis de 0.5 veces la dosis letal 50 (DL₅₀) del veneno entero se diluyeron en 50 µL de solución salina (NaCl al 0.9% p/v) y se inyectaron vía intraperitoneal (IP) al primer grupo experimental. El segundo grupo de ratones se inyectó con la DL₅₀ del veneno, y el tercer grupo se inyectó vía IP con el mismo volumen de solución salina (grupo control). En el test de Irwin típico no se utiliza una sustancia de referencia como control positivo puesto que los mecanismos de acción de la sustancia a ensayar usualmente son desconocidos (Roux, Sablé y Porsol, 2005). Los ratones se dispusieron en cajas plásticas transparentes (20 x 30 x 25 cm) y se registraron los signos de intoxicación a los 15, 30 y 60 min, y a las 12 horas posinoculación, de acuerdo a los protocolos y la lista de chequeo del test de Irwin modificado (Irwin, 1968; Roux, Sablé y Porsol, 2005).

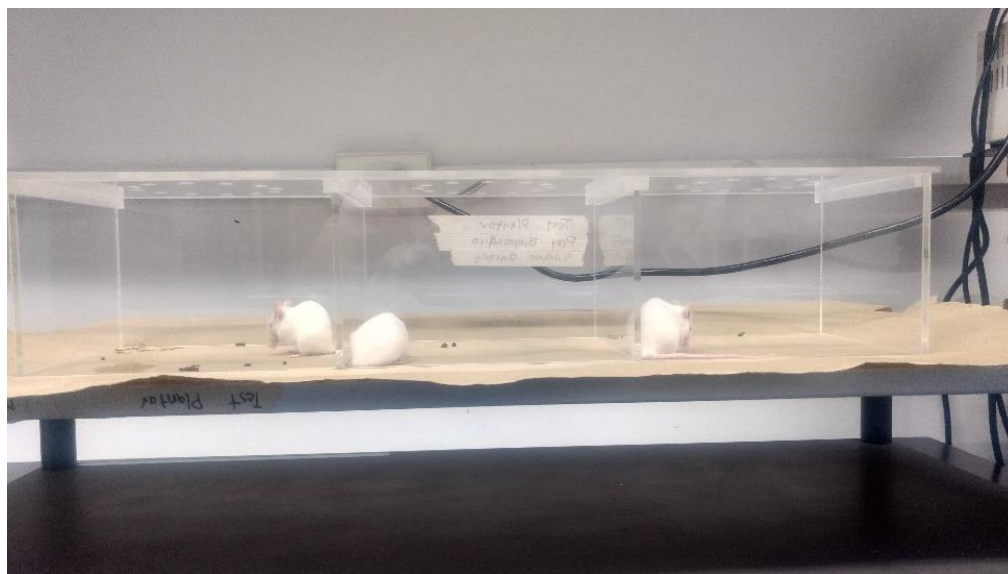


Figura 11. Test de Irwin y ensayos en ratón. Ratones albino suizo cepa CFW se separaron en tres grupos experimentales y el primer grupo se inyectó vía IP con 0.5 veces la dosis letal 50 (DL₅₀) de veneno entero de *T. forcipula* disuelto en 50 µL de solución salina (NaCl al 0.9% p/v). El segundo grupo de ratones se inyectó con la DL₅₀ del veneno, y el tercer grupo se inyectó vía IP con el mismo volumen de solución salina (grupo control).

5.1.6 Efectos del veneno entero sobre los parámetros hematológicos en ratones

Se inyectaron vía IP ratones albino suizo (n=9, machos, aproximadamente 25 g) con 50 µL de suspensión de veneno entero (0.5 DL₅₀ en agua tipo I) y se administró solución de PBS al grupo control (n=5).

Leucograma:	Recuento de células blancas (WBC)
Serie leucocitaria	Recuento absoluto de linfocitos (LYM)
	Recuento absoluto de mononucleares (MID)
	Recuento absoluto de granulocitos (GRA)
	Recuento relativo de linfocitos (LY%)
	Recuento relativo de mononucleares (MI%)
	Recuento relativo de granulocitos (GR%)
Eritrograma:	Recuento de células rojas (RBC)
Serie eritrocitaria	Concentración de hemoglobina (HGB)
	Valor del hematocrito (HCT)
	Tamaño promedio de los eritrocitos (MCV)
	Promedio del contenido de hemoglobina en los eritrocitos (MCH)
	Concentración media de hemoglobina en el promedio de eritrocitos (MCHC)
	Ancho de distribución de la población eritroide
Perfil plaquetario	Recuento absoluto de plaquetas (PLT)
	Plaquetocrito(PCT)
	Volumen medio plaquetario (MPV)
	Ancho de distribución de las plaquetas (población homogénea o heterogénea) (Anisocitosis plaquetaria) (pdwc).
Diferencial del extendido del hemograma	Neutrófilos
	Bandas o cayados
	Linfocitos
	Monocitos
	Eosinófilos
	Basófilos
	Linfocitos reactivos
Morfología	Leucocitaria
	Eritrocitaria
	Plaquetaria
Glicemia	Concentración de glucosa en sangre.

Tabla 2. Parámetros hematológicos evaluados en ratones albino suizo 2 horas después de inyección IP de 0.5 DL₅₀ de veneno entero de *T. forcipula*.

Dos horas después de la inyección los animales se anestesiaron (xylazina 10 mg/kg y ketamina 75 mg/kg) y se efectuó punción intracardiaca para colectar 500 μ L de sangre en tubos vacutainer heparinizados (Costal-Oliveira *et al.*, 2015). La muestra de sangre se envió a un laboratorio clínico veterinario de la ciudad para la medición de los parámetros hematológicos enlistados en la tabla 2. Las determinaciones se hicieron con un equipo de hematología automatizado KT-6200 GENIUS (GenRui electronics, China), realizando las mediciones con los reactivos en fase sólida ("Química Seca") mediante la técnica de impedancia electrónica (principio de Coulter). Para todos los parámetros hematológicos se evaluaron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk para $n < 30$) y homogeneidad de varianza (Test de Levene), verificando la validez de las hipótesis:

Ho: Los datos de las variables hematológicas presentan una distribución normal.

Ha: Los datos de las variables hematológicas no siguen una distribución normal.

Ho: Hay homogeneidad de varianzas en los datos de las variables hematológicas entre los diferentes tratamientos.

Ha: Las varianzas en las variables hematológicas entre los diferentes tratamientos son heterogéneas.

Se estableció la siguiente hipótesis nula para evaluar mediante pruebas de comparación entre grupos independientes, si hubo diferencia significativa en los valores de los parámetros hematológicos, entre los grupos de ratones tratados con solución control y con veneno:

Ho: No existen diferencias significativas en las medias de las variables hematológicas evaluadas, entre ratones tratados con solución control y ratones tratados con veneno entero de *T. forcipula*.

Ha: Las medias de las variables hematológicas evaluadas entre ratones tratados con solución control y con veneno de *T. forcipula* son diferentes.

Se rechazó la hipótesis nula cuando el valor de $p < 0.05$. En los casos en que se verificaron los parámetros de normalidad y homogeneidad de varianza, se realizó la prueba paramétrica T-Student de comparación de medias. En casos de violación de alguno de los supuestos se realizó una prueba no paramétrica U-Mann Whitney de comparación de medianas.

5.1.7 Ensayos de nocicepción en ratones

El efecto nociceptivo del veneno entero se evaluó mediante la prueba de lamido de pata en ratones albino suizo. Se distribuyeron aleatoriamente 15 biomodelos experimentales en 3 grupos independientes de cinco animales cada uno, y a cada individuo se le inyectaron en la región sub-plantar de la pata derecha trasera, 20 μ L del correspondiente tratamiento: Tratamiento 1: vehículo (agua tipo I, como control negativo), tratamiento 2: formalina (como control positivo), tratamiento 3: veneno entero de *T. forcipula* (1/3DL₅₀) (Hunskaar y Hole, 1987).

Después de la inyección los animales se dispusieron en recipientes transparentes (20 cm x 30 cm x 25 cm) y se registró la respuesta como la cantidad de tiempo que los roedores pasaron lamiendo la pata inyectada. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre las vías de

dolor agudo y crónico, se definieron dos fases de registro: fase temprana (0-5 minutos) y fase tardía (20-25 minutos). La interfase entre los dos periodos se caracteriza por un comportamiento de dolor mínimo y se utiliza comúnmente para diferenciar las dos fases (Lima *et al.*, 2017; Fischer *et al.*, 2014). Se grabó el comportamiento de los animales durante 30 minutos mediante una videocámara digital. Después de verificar los supuestos de normalidad y homogeneidad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar, en cada una de las fases de lamido, la hipótesis nula:

Ho: No existen diferencias significativas en el tiempo de lamido de pata de los ratones entre los tratamientos.

Ha: El tiempo de lamido de pata de los ratones es diferente entre tratamientos.

Se rechazó la Ho cuando $p < 0.05$, y en tal caso se realizó el test de comparaciones múltiples de Tukey para determinar si hubo diferencias significativas en el tiempo de lamido de pata de los biomodelos entre los tratamientos para las dos fases evaluadas.

5.1.8 Efectos del veneno entero sobre la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca en ratas

El efecto del veneno entero sobre variables de la presión arterial, y sobre la frecuencia cardíaca, se estudió de forma no invasiva en ratas Wistar macho ($n=7$, 200-220 g de peso corporal). Los animales fueron sedados con isoflurano en cámara cerrada y enseguida se anestesiaron con pentobarbital vía IP (45 mg/kg, Sigma, EE.UU.). Después de comprobar la anestesia, los animales se inmovilizaron en decúbito sobre una plataforma de acrílico

construida en nuestro laboratorio, se ajustaron electrodos en las extremidades para el registro de frecuencia cardíaca y un sensor de presión en cola para el registro de la presión sanguínea. Enseguida se administró vía IP el vehículo (500 µL de agua tipo I) y se hicieron los registros del tratamiento de control negativo del experimento (Fox, 2015).

Cinco días después, el experimento se repitió con cada uno de los animales, en las mismas condiciones descritas, pero empleando como tratamiento el veneno entero de *T. forcipula* (media DL₅₀=1.25mg/kg). Durante los experimentos se registraron las variables frecuencia cardíaca (FC), presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial media (PAM), en tanto que la presión arterial diastólica (PAD) y la presión de pulso (PP) se calcularon utilizando las siguientes expresiones (Geddes, 1979; Infante-Vásquez *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 2006):

$$PAD = \frac{3PAM - PAS}{2} \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$PP = PAS - PAD \quad \text{Ecuación (2)}$$

Los registros se hicieron mediante un equipo de tensión arterial no invasiva (IITC six channel NIBP, EE.UU.) consistente en un sensor de presión de cola por fotodetección, conectado a un transductor piezoeléctrico, dirigido a un amplificador de pulsos y un escáner. Los datos del amplificador fueron adquiridos y almacenados en un computador mediante un equipo de adquisición de datos (MP100 data Acquisition System-BIOPAC) y analizados con el software Acknowledge 4.1 BIOPAC.

Se utilizó un modelo lineal mixto generalizado (GLMM) de un factor para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las variables descritas. Cuando el valor de p fue menor que 0.05 se rechazó la hipótesis nula (no hay diferencia significativa en la media de las variables evaluadas entre los niveles de los factores). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software de libre distribución R 3.2.2 (R coreTeam 2013) empleando los paquetes Car e lme4. El registro de FC se obtuvo simultáneamente, mediante un convertidor analógico-digital basado en un circuito AD620, conectado al mismo sistema de adquisición de datos (MP100 data Acquisition System-BIOPAC).

5.1.9 Actividad enzimática in vitro

5.1.9.1 Actividad fosfolipasa sobre sustrato 4-NOBA

La actividad fosfolipasa del veneno entero se determinó mediante la prueba descrita por Cho y Kézdy, 1991, y Holzer y Mackessy, 1996, adaptada para registro en microplaca de 96 pozos. Se preparó una disolución del sustrato monodisperso cromogénico sintético 4-NOBA (4-nitro-3-octanoil oxi-ácido benzóico, cedido por el Dr. Eliécer Jiménez Charris) en acetonitrilo (1 mg/mL) y buffer NOBA (en M: 0.01 Tris-HCl, 0.01CaCl₂, 0.1 NaCl, pH 8.0). La mezcla de reacción se preparó en una microplaca de 96 pozos, con 200 µL de buffer NOBA, 25 µL de disolución del sustrato 4-NOBA y 25 µL de solución de veneno entero de *T. forcipula* para obtener concentraciones finales de veneno de 1, 2, 3, 4 y 5 mg/mL. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C por una hora en condiciones de oscuridad y se midió la absorbancia en modo single a 415 nm en un lector de microplacas (iMarkMicroplate Reader, Bio-Rad Laboratories, EE.UU.).

La reacción de ruptura del enlace éster en el sustrato 4-NOBA es catalizada por la enzima fosfolipasa 2 (PLA₂), y produce el compuesto coloreado ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzónico, que absorbe a 425/405 nm, según la siguiente reacción:

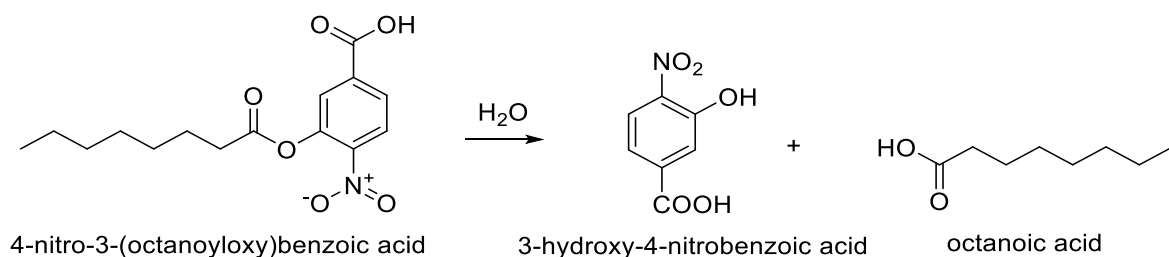


Figura 12. Reacción de hidrólisis del enlace éster en el sustrato 4-NOBA, catalizada por PLA₂.

El producto de la reacción se cuantificó a 415 nm y se expresó la actividad fosfolipasa como el cambio en absorbancia x 1000 (Jiménez-Charris *et al.*, 2016). La prueba se hizo por triplicado para cada concentración de veneno entero de *T. forcipula* (0.2 a 5 mg/mL) y para el blanco. Como control positivo se usó veneno del vipérido *Porthidium lansbergii* (cedido por el Dr. Eliécer Jiménez Charris).

5.1.9.2 Actividad proteolítica

Se evaluó la actividad proteolítica del veneno entero utilizando azoproteína como sustrato para determinar la presencia de metaloproteinasas, según el método propuesto por Wang y Huang, 2002, con algunas modificaciones. Cantidades variables de veneno (50 a 100 µg) se adicionan a 100 µL de azocaseína (Sigma-Aldrich, 10 mg/mL en 50 mM tris-HCl, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 8.0) y se incubaron por 90 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo por adición de 200 µL de ácido tricloroacético al 5%. Después de centrifugar a 1000 RPM por

cinco minutos, se removió el sobrenadante, se mezcló con 150 μ L de NaOH 0.5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (iMarkMicroplate Reader, Bio-Rad Laboratories, EE.UU.). Como blanco, se midió la absorbancia de azocaseína incubada con PBS (en mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na_2HPO_4 , 1.8 KH_2PO_4 , pH 7.4), valor que se sustrajo de todas las lecturas. Una unidad de actividad se definió como el aumento de 0.01 unidades de absorbancia (Bernardes *et al.*, 2008). Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.1.9.3 Actividad hialuronidasa

La actividad hialuronidasa del veneno entero se evaluó mediante el método de Di-Ferrante, descrito previamente por Pukrittayakamee *et al.*, 1988, con algunas modificaciones para determinación de la absorbancia con lector de microplacas (Venancio *et al.*, 2013; Sutti *et al.*, 2014). El método se basa en la capacidad de una solución de BCTA (Bromuro cetil trimetil amonio) al 2.5% en NaOH al 2.0% para producir turbidez homogénea al mezclarse con el ácido hialurónico (HA). La hidrólisis enzimática del sustrato HA por la enzima hialuronidasa disminuye la turbidez, y la reducción se toma como una medida de la actividad de la enzima.

La solución de trabajo se preparó con 110 μ L de buffer acetato de amonio 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 5.0 y 100 μ L del sustrato HA (1 mg/mL). Se adicionaron 40 μ L del veneno entero con concentraciones entre 0.2 y 5 mg/mL, excepto a las muestras que no llevan la enzima. Se incubó a 37°C durante 15 minutos y enseguida se agregó 1 mL de solución de BCTA al 2.5%. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y la turbidez remanente se midió a 415 nm en un lector de microplacas (iMarkMicroplate Reader, Bio-Rad Laboratories, EE.UU.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. La actividad enzimática se expresó como la media $\pm$ SEM (n=3) en unidades reductoras de la turbidez (UTR) por mg de veneno

(Venancio et al., 2013). Una unidad de actividad correspondió a la cantidad de enzima que redujo en 50% la turbidez causada por 0.1 mg de sustrato bajo las condiciones descritas arriba.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Colecta de escorpiones y obtención del veneno de *Tityus forcipula*

En los meses de diciembre 2015 y enero 2016 se colectaron 160 especímenes de *Tityus forcipula* en la localidad del Km 18, zona rural del municipio de Santiago de Cali. Los individuos se desvenenaron mediante estimulación eléctrica y se liberaron. Se sacrificaron tres especímenes para disecar las glándulas del veneno y extraer el RNA, y se guardaron especímenes en alcohol para efectos de identificación taxonómica. El veneno entero se resuspendió en agua destilada, se centrifugó y se recuperaron 47 mg de proteína soluble.

Una segunda colecta de 73 individuos se realizó en julio de 2018. Estos individuos fueron mantenidos en cautiverio, y se desvenenaron tres veces con intervalos de un mes entre desvenenamientos. La segunda colecta produjo 147.6 mg de proteína soluble. La extracción mediante estimulación eléctrica, produjo en promedio 4.87 mg de veneno por individuo (peso húmedo), con un contenido promedio de proteína soluble de 0.21 mg de proteína/g de veneno.

5.2.2 Determinación del contenido de proteína en el veneno entero

El contenido de proteína en una suspensión de 100 μ L de veneno fue de 1103 μ g/mL=1.103 mg/mL, determinado mediante la curva de calibración con BSA según el método de Lowry modificado para determinación en lector de microplacas (Figura 13).

La misma muestra cuantificada en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 mediante el protocolo Protein A260/A280, presentó una absorbancia de 1.085, que equivale a un contenido de proteína de $1.085 \text{ mg/mL} = 1085 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Considerando como valor real el que se determinó mediante el método estándar de Lowry, el error absoluto en la medición fue de $0.018 \text{ mg/mL} = 18 \text{ } \mu\text{g/mL}$, y el error relativo de 1.6%. No hubo diferencia significativa entre las medias de las mediciones obtenidas por los dos métodos (prueba t de Student).

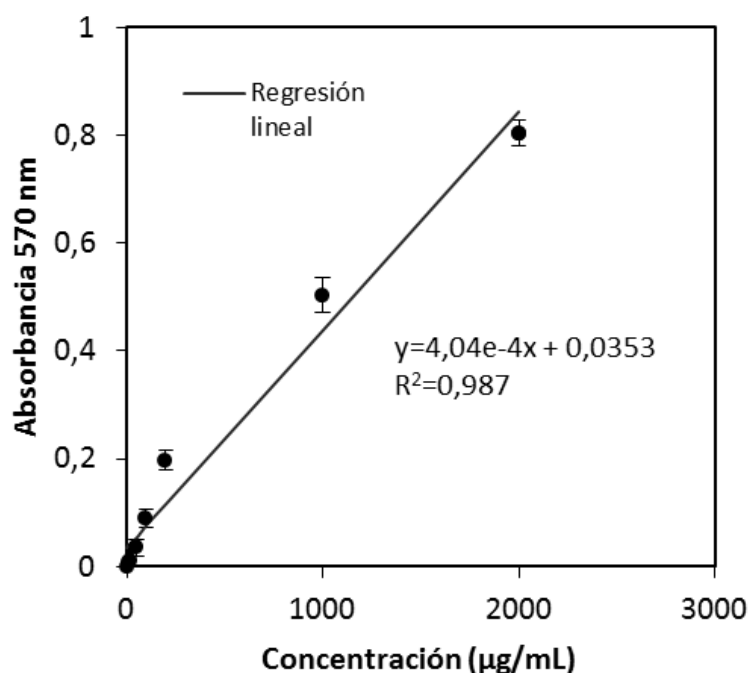


Figura 13. Curva de calibración por el método micro Lowry. Se prepararon muestras de BSA de concentración conocida y se determinó la concentración de proteína en una muestra de veneno entero de *T. forcipula*. La concentración de proteína en la muestra de veneno se determinó también mediante un NanoDrop 2000. El error porcentual con respecto al método estándar de Lowry es menor al 2%, justificando la adopción del NanoDrop 2000 como un método rápido y preciso para cuantificar el contenido de proteína.

5.2.3 Dosis letal 50 (DL₅₀) y neurotoxicidad del veneno entero en ratones

Se realizaron ensayos de toxicidad en ratones CD1 mediante inyección IP y se encontró que bajo las condiciones experimentales la dosis letal 50 (DL₅₀) fue de $47.86 \pm 1.01 \text{ } \mu\text{g}/20 \text{ g}$ ratón ($2.39 \pm 0.05 \text{ mg/kg}$ ratón), evaluada según el método “Up-and-Down” para pequeñas

muestras. La tabla 3 muestra los resultados de los nueve experimentos realizados (N'), de los cuales los últimos siete constituyeron el N nominal.

Dosis (D, µg/20 g ratón)	Log D	Resultados del ensayo			
50.1	1.70	X			
49.0	1.69	X		X	X
47.9	1.68	X	O	O	O
46.8	1.67		O		

Tabla 3. Resultados de DL50 por el método de Dixon, 1965. Se realizaron 9 experimentos (N') variando la dosis D de veneno entero hacia arriba y hacia abajo por un valor igual a antilog 0.01, según el resultado del ensayo previo. Las últimas siete corridas forman el N nominal usado para el cálculo de la DL_{50} . Los resultados de cada ensayo se representan con X=muerte, O=supervivencia.

La DL_{50} se estimó mediante $\sum \frac{X_i}{N} + \frac{d}{N}(A + C)$ y el error estándar medio como $\sigma\sqrt{2/N}$, donde $d=0.01$, fue la diferencia entre los niveles normalizados de cada ensayo ($\log D$), y A y C se tomaron de la tabla correspondiente para $N>6$.

La neurotoxicidad y los efectos sistémicos del veneno entero se evaluaron, mediante el test de Irwin en ratones albino suizo cepa CFW, y se observó alteración en 19 de los 33 parámetros evaluados, resultados que se resumen en la tabla 4. Se han destacado en negrita los parámetros que presentaron alteración observable en la mayoría de animales experimentales.

El primer signo de intoxicación observado fue la ataxia, manifestada como parálisis de las extremidades posteriores, que fue progresando durante el tiempo de observación. En los

primeros 5 min posinoculación del veneno, se observó también taquipnea, con piloerección, inquietud, salivación y lacrimación. Hacia los 15 minutos, los ratones se observaron pasivos, incrementándose la dificultad para caminar, y se observó ptosis palpebral. Hacia los 20 minutos se observó incremento de la frecuencia respiratoria, pasividad con cambio ocasional de posición, extremidades posteriores estiradas, actitud temerosa y aparición del signo de Straub (cola erecta).

-SNC	+SNC	Ojos	Orejas	Efectos generales	Efectos subjetivos
Ataxia	Temblores finos en el cuerpo	Enoftalmia	Palidez	Salivación	Agresión (excitación, aumento de actividad motora)
Analgesia	Temblores fuertes en el cuerpo	Exoftalmia	Hiperemia	Erección de la cola	Pasivo (Reducción de actividad motora)
Anestesia	Fasciculaciones	Ptosis palpebral	Cianosis	Piloerección	Temeroso
Parálisis de extremidades anteriores	Convulsiones	Tamaño de la pupila		Micción	Muerte necropsia
Parálisis de extremidades posteriores	Salto	Nistagmo		Diarrea	
Reacción de alarma (Inhibición)	Reacción de Alarma (Excitación)	Lacrimación		Priapismo	
				Movimientos circulares	
				Alteración de frecuencia respiratoria	

Tabla 4. Parámetros evaluados en el Test de Irwin. Se inyectaron ratones albino suizo cepa CFW con 500 µL de agua tipo I como tratamiento control, y volúmenes iguales de 0.5DL₅₀ y la DL₅₀ del veneno entero de *Tityus forcipula*, vía IP (n=6 para cada tratamiento, 20 g de peso corporal aproximadamente). Los ratones se dispusieron en cajas plásticas transparentes (20 x 30 x 25 cm) y se registraron los signos de intoxicación a los 15, 30 y 60 min, y a las 12 horas posinoculación, de acuerdo a los protocolos y la lista de chequeo del test de Irwin modificado. En negrita se han destacado los parámetros afectados por la inoculación con veneno entero de *T. forcipula* (-SNC=Inhibición de procesos centrales; +SNC=Excitación del sistema nervioso central).

Hacia los 30 minutos los animales se observaron pasivos, con la cola y extremidades posteriores estiradas, taquipnea y jadeo ocasional. Hacia los 35 minutos se observó piloerección generalizada, quietud, saltos con dificultad de movimiento y erección marcada de la cola. Las primeras convulsiones tónicas se observaron hacia los 40 minutos, con duración de 20 s aproximadamente, y regreso a la pasividad. Hacia los 43 minutos se observaron deposiciones semisólidas. Las convulsiones se incrementaron hacia los 45 minutos, y a los 60 minutos los animales 1 y 2 murieron, presentando intensa piloerección, quietud entre las fases convulsivas, extremidades posteriores completamente estiradas hacia atrás, taquipnea y respiración con jadeo.

5.2.4 Efectos del veneno entero sobre los parámetros hematológicos en ratones

En la tabla 5 se presentan los resultados del análisis de las variables hematológicas en ratones albino suizo, una hora post-inyección de veneno entero vía IP. Las variables del leucograma, eritrograma, extendido y glicemia que presentaron diferencias significativas entre control y veneno ($p < 0.05$) fueron: Recuento de células blancas (WBC), recuento absoluto y relativo de linfocitos (LYM, LY%), recuento absoluto de granulocitos (GRA), recuento absoluto de plaquetas (PLT), Anisocitosis plaquetaria (PDWc), neutrófilo relativo, neutrófilo absoluto y glicemia.

LEUCOGRAMA	t	df	p
WBC	2,8610	16	0,0113
LYM	4,8082	16	0,0002
MID	1,4502	16	0,1663
GRA	-2,6819	16	0,0164
LY%	2,6663	16	0,0169
MI%	0,4940	16	0,6280
GR%	-0,9101	16	0,3763
ERITROGRAMA			
RBC	-1,0381	16	0,3147
HGB	-1,1542	16	0,2654
HCT	-1,5152	16	0,1492
MCV	-0,4398	16	0,6660
MCH	-0,7568	16	0,4602
MCHC	0,2880	16	0,7770
RDWCs	-1,6959	16	0,1093
PERFIL PLAQUETARIO			
PLT	2,1404	16	0,0481
PCT	1,3396	16	0,1991
MVP	-0,9202	16	0,3711
PDWc	4,1657	16	0,0007
HEMOGRAMA			
NEUTROFILOS REL	4,1657	16	0,0007
NEUTROFILOS ABS	-2,6730	16	0,0167
CAYADOS			
LINFOCITOS REL	1,2521	16	0,2285
LINFOCITOS ABS	-0,9821	16	0,3407
MONOCITOS REL	-0,5466	16	0,5922
MONOCITOS ABS	-0,9590	16	0,3518
EOSINÓFILOS REL	-0,9590	16	0,3518
EOSINÓFILOS ABS	-0,9590	16	0,3518
BASÓFILOS			
LINFOCITOS REACTIVOS	-0,2134	16	0,8337
GLICEMIA	3,5390	16	0,0027

Tabla 5. Resultados del análisis estadístico (t de Student), para las variables de la química sanguínea en ratones albino suizo (n=9, machos, 25 g) tratados con veneno entero de *T. forcipula* vs ratones inyectados con solución control. Hay diferencia significativa si $p < 0.05$.

5.2.5 Ensayos de nocicepción mediante la prueba de lamido de pata

Se encontró un incremento significativo en el tiempo de lamido de la pata en ratones albino suizo, al inyectar el espacio subplantar de la pata trasera de los ratones con veneno entero de *T. forcipula*, en comparación con la misma respuesta ocasionada por los tratamientos de control positivo (formalina) y negativo (agua tipo I, n=5 ratones por tratamiento). La tabla 6 resume los resultados de las pruebas de nocicepción.

En promedio la respuesta de lamido de pata de los ratones duró casi 8 minutos después de la inyección con 20 μ L de suspensión de veneno entero, mientras que la inyección de 20 μ L de formalina provocó la respuesta de lamido durante 2 min y la inyección de 20 μ L de agua tipo I ocasionó el lamido durante 2 s. Los animales se lamieron constantemente durante los primeros 5 minutos, fase que se asocia con los síntomas del dolor agudo o epicrítico. El lamido disminuyó al terminar esta fase, y se incrementó de nuevo entre los 20 a 25 minutos posteriores a la inyección, período que corresponde con la aparición de dolor inflamatorio (Fischer *et al.*, 2014).

Tratamiento	Tiempo de lamido (s) (Fase 0-5 min)	Tiempo de lamido (s) (Fase 20-25 min)
Agua MiliQ	2 $\pm$ 0.70	1 $\pm$ 0.70
Formalina	59.6 $\pm$ 8.96	5.80 $\pm$ 3.03
Veneno 1/3DL50	176.62 $\pm$ 19.24	66.6 $\pm$ 10.07

Tabla 6. Ensayo de nocicepción. Tiempo de lamido de pata (s) de ratones albino suizo (n=5 ratones por tratamiento) después de la inyección intraplantar de 20 μ L de agua tipo I, formalina y veneno entero de *T. forcipula* (1/3 de la DL₅₀). La respuesta se midió durante la fase de dolor agudo (0-5 min) y durante la fase de dolor inflamatorio (20-25 min). Se muestran los resultados como valor medio $\pm$ DE.

El ANOVA de una vía entre los tres tratamientos en las dos fases del dolor, arrojó un p-valor de 0.007366 para la fase de dolor agudo, y un p-valor de 0.000897 para la fase de dolor

inflamatorio, por lo que en ambos casos se rechazó la hipótesis nula (H_0 : No existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos). Las comparaciones múltiples mediante la prueba post ANOVA de Tukey, entre tratamientos y entre fases, mostraron p -valor < 0.05 para todas las comparaciones, indicando que hay diferencias significativas entre el tratamiento con veneno y los controles positivo y negativo.

5.2.6 Medición no invasiva de la frecuencia cardíaca y variables de la presión arterial

El efecto del veneno de *T. forcipula* sobre la frecuencia cardíaca y sobre la presión arterial, se estudió de forma no invasiva en ratas Wistar macho ($n=7$, 200-220 g de peso corporal) después de la inyección vía IP de 500 μ L de suspensión del veneno entero. Los resultados de los experimentos se analizaron mediante un modelo lineal mixto generalizado (Lazcano-Ponce *et al.*, 2004; Seoane, 2014). En la tabla 7 se presenta el resumen de los resultados.

Tratamiento	Frecuencia cardíaca (FC, bpm)	Presión arterial sistólica (PAS, mmHg)	Presión arterial media (PAM, mmHg)	Presión arterial diastólica (PAD, mmHg)	Presión de pulso (PP, mmHg)
Control	356 $\pm$ 5.77	113 $\pm$ 2.49	99 $\pm$ 2.14	92 $\pm$ 2.03	22 $\pm$ 1.115
Veneno	335 $\pm$ 5.23	101 $\pm$ 3.64	89 $\pm$ 1.97	82 $\pm$ 2.09	20 $\pm$ 1.02

Tabla 7. Efecto del veneno entero de *T. forcipula* sobre la frecuencia cardíaca y sobre variables de la presión sanguínea en ratas. Se inyectaron ratas Wistar macho ($n=7$) con 500 μ L de suspensión de veneno vía IP. Se midió la frecuencia cardíaca (BPM) mediante electrodos aplicados en las extremidades, y variables de la presión sanguínea (PAM y PAS, mmHg) mediante un sensor de cola. La PAD y la PS se estimaron mediante las ecuaciones 2 y 3. Como control se inyectaron 500 μ L de agua tipo I. El veneno entero de *T. forcipula* ocasionó disminución significativa del valor medio de todas las variables estudiadas, excepto la presión de pulso.

La media de la frecuencia cardíaca en ratas Wistar disminuyó significativamente durante el tratamiento con veneno entero, en comparación con el tratamiento control (332.5 $\pm$ 5.2 bpm contra 355.7 $\pm$ 6.8 bpm). Los resultados de la prueba se muestran en la figura 14. La presión

arterial media (PAM) y la sistólica (PAS), se evaluaron directamente en el experimento mediante un sensor de cola. El veneno entero ocasionó disminución significativa de la PAM promedio cuando se comparó con el tratamiento control (99 ± 2 mmHg contra 89 ± 2 mmHg) y de la PAS promedio con respecto al tratamiento control (113 ± 2 mmHg vs 101 ± 4 mmHg). Las variables de presión arterial diastólica (PAD) y presión de pulso (PP) se estimaron mediante las ecuaciones 1 y 2. Los resultados mostraron disminución significativa de la PAD promedio entre el tratamiento con veneno y el control (92 ± 2 y 82 ± 2 mmHg respectivamente). No se observó diferencia significativa en la media de la PP entre el control y el tratamiento con veneno (22 ± 1 mmHg vs 20 ± 1 mmHg).

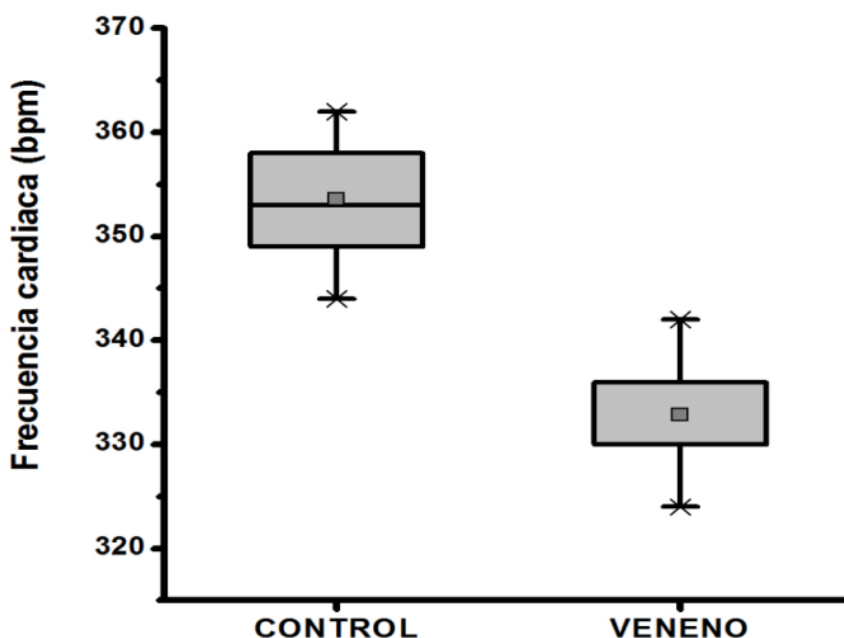


Figura 14. Frecuencia cardíaca en ratas Wistar bajo tratamiento con veneno de *T. forcipula* y control. Se inocularon ratas Wistar vía IP con veneno entero de *T. forcipula* ($n=7$, 200-220 g de peso corporal, 1.25 mg/kg en un volumen de 500 μ L), y con vehículo ($n=7$, 200-220 g de peso corporal, 500 μ L agua tipo I, control). La frecuencia cardíaca disminuyó significativamente entre el tratamiento con veneno y el control (332.5 ± 5.2 y 355.7 ± 6.8 bpm, respectivamente).

5.2.7 Actividad enzimática in vitro

5.2.7.1 Actividad fosfolipasa (PLA2) sobre sustrato 4-NOBA

La actividad PLA2 del veneno entero se determinó mediante la reacción de ruptura del enlace éster del sustrato 4-NOBA, produciendo un compuesto coloreado que absorbe a 405/425 nm. La prueba se realizó por triplicado para concentraciones de veneno entero de 1, 2, 3, 4, y 5 mg/mL, así como para el blanco y el control positivo (veneno del vipérico *Porthidium lansbergii*). Los resultados de la prueba se muestran en la figura 15. La actividad PLA2 del veneno entero de *T. forcipula* fue de 39 UA a la longitud de onda del registro. A las mismas concentraciones, el veneno entero de *P. lansbergii* mostró una actividad PLA2 de 72 UA. La actividad se expresó como el cambio en la absorbancia (pendiente de la curva normalizada) x 1000.

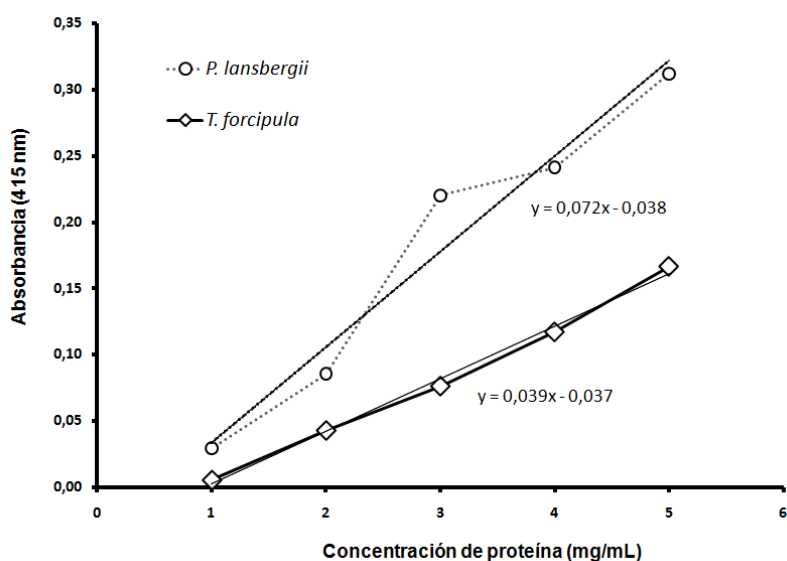


Figura 15. Resultados de la determinación de actividad fosfolipasa del veneno de *T. forcipula* sobre el sustrato cromógeno 4-NOBA. La hidrólisis del sustrato por la fosfolipasa genera un compuesto que absorbe a 405/425 nm. Veneno entero del vipérico *P. lansbergii* se usó como control positivo. La regresión lineal y su ecuación correspondiente, mostrada junto a cada gráfica, se usó para expresar la actividad PLA2 como el cambio en absorbancia x 1000.

5.2.7.2 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica del veneno se evaluó usando azocaseína como sustrato. El veneno entero mostró una actividad proteolítica de 20.25 unidades/mg de proteína (veneno entero), donde una unidad de actividad se define como el aumento de 0.01 unidades de absorbancia (UA). En la figura 16 se muestra la gráfica de absorbancia medida para diferentes concentraciones de veneno entero.

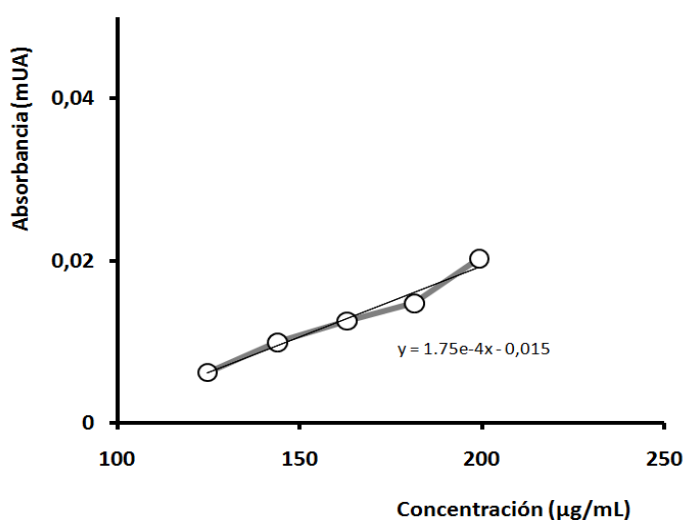


Figura 16. Resultados de la determinación de actividad proteolítica del veneno de *T. forcipula* sobre el sustrato azocaseína. La hidrólisis del sustrato por las metaloproteinasas genera un compuesto que absorbe a 450 nm. Una unidad de actividad se define como el aumento de 0.01 unidades de absorbancia (UA).

5.2.7.3 Actividad hialuronidasa

La actividad hialuronidasa del veneno entero se evaluó mediante el método de Di-Ferrante, con algunas modificaciones para determinar la absorbancia con lector de microplacas. La actividad reductora de la turbidez se expresó como porcentaje de HA remanente, relativo a la absorbancia del pozo en el que no se adicionó veneno y los resultados se expresaron en unidades reductoras de la turbidez (UTR) por mg de veneno, resultando en una actividad

hialuronidasa de 16 UTR/mg de veneno. La figura 17 muestra la disminución porcentual de la turbidez con el incremento de la cantidad de enzima (veneno entero).

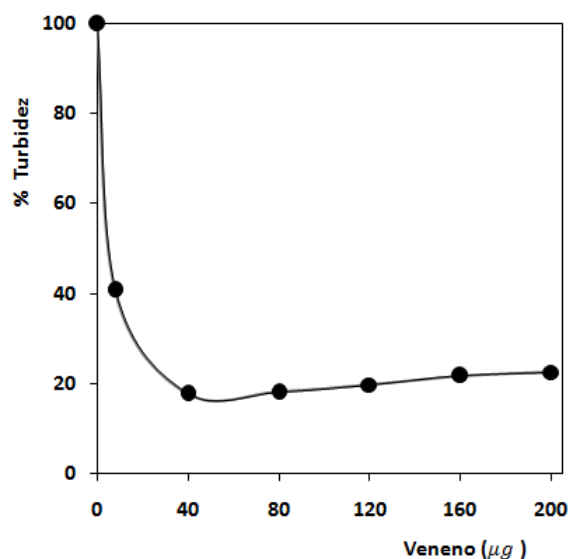


Figura 17. Resultados de la determinación de actividad hialuronidasa del veneno entero de *T. forcipula*. La actividad hialuronidasa se expresa en unidades reductoras de la turbidez (UTR) por mg de proteína (veneno entero).

5.3 DISCUSIÓN

La cantidad promedio de veneno obtenida por estimulación eléctrica del telson fue de 4.87 mg por individuo (peso húmedo) con un contenido de proteína soluble de 0.21 mg/g de veneno. Dado que el desvenenamiento por estimulación eléctrica es una situación extrema, se asume que en la situación natural el escorpión inyecta una cantidad menor de veneno en el curso de una picadura (Riaño-Umbarilla *et al.*, 2017). Sin embargo, este resultado permite estimar en 1.02 mg = 1020 μg de proteína soluble (veneno entero), la productividad de veneno promedio (Pc) de *T. forcipula*, y la cantidad máxima de veneno que potencialmente inyecta esta especie en el curso de una sola picadura.

Aunque la estimulación eléctrica del telson arroja mayor producción de veneno que otros métodos de desvenenamiento, la secreción obtenida incluye mayor contenido de mucoproteínas y componentes no tóxicos del veneno. Así, Barona, Otero y Núñez, 2004, reportaron la obtención de 0.68 ± 0.2 mg de veneno de *T. Pachyurus*, por estimulación manual del telson, en tanto que D'Suze, Sevcik y Brazón, 2011, reportaron la Pc para varias especies de bñtidos de Venezuela mediante desvenenamiento por estimulación eléctrica y encontraron que varía entre 0.12 mg para *T. clathratus* y 2.95 mg para *T. zulianus*. Es destacable que la Pc de *T. forcipula* es similar a la de *T. discrepans* (0.812 mg), reconocido como causante de envenenamiento severo en humanos (D'Suze *et al.*, 2009) y para el cual Borges, Arantes y Giglio, 1990, reportaron un veneno menos potente (DL_{50} de 8.8 mg/kg de ratón).

Para todos los propósitos experimentales, el contenido de proteína en el veneno entero de *T. forcipula* y fracciones purificadas, se determinó mediante mediciones con el espectrofotómetro NanoDrop 2000. Las mediciones con este método presentaron un error absoluto de 0.018 mg/ml=18 µg/mL y un error relativo de 1.6% con respecto al método estándar de curva de calibración con BSA según el método de Lowry modificado para determinación en lector de microplacas. Con base en este resultado, se utilizó el NanoDrop 2000 para todas las subsiguientes determinaciones de contenido de proteína, considerando que ofrece las ventajas de rapidez y pequeña cantidad requerida de analito (<5 µL), asumiendo que una solución de proteína al 0.1% (1 mg/mL) produce una absorbancia de 1.0 UA a 280 nm cuando la longitud de la celda es de 10 mm (Protein Measurements, T032 Technical Bulletin, ThermoScientific). Esta aproximación es válida para proteínas que contienen Trp, Tyr o enlaces Cys-Cys, grupos cromóforos que absorben a 280 nm (Grimsley y Pace, 2003).

La DL_{50} evaluada mediante el método "arriba y abajo" (Up-and-Down) para pequeñas muestras, se estimó en $47.86 \pm 1.01 \mu\text{g}/20 \text{ g ratón}$ ($2.39 \pm 0.05 \text{ mg/kg ratón}$). Hasta el presente se había reportado que en Colombia *T. fuhrmanni* (DL_{50} de 3.9 mg/kg de ratón) era causante de los accidentes escorpiónicos más graves (Gómez et al., 2002), junto con *T. pachyurus* (DL_{50} de 4.8 mg/kg , Barona et al., 2004) y *T. asthenes* (6.1 mg/kg , Gómez et al., 2010). El resultado obtenido en el presente estudio, sugiere que el envenenamiento causado por la picadura de *T. forcipula* puede llegar a ser de consideración médica, si se tiene en cuenta que su toxicidad es comparable con la de *T. fasciolatus* ($2.984 \text{ mg/kg ratón}$, Méndes et al., 2015), escorpión endémico en la región central de Brasil, que ha sido clasificado como muy tóxico (Nishikawa et al., 1994; Méndes et al., 2015) y que la cantidad de veneno inoculado puede ser comparable con la *T. discrepans*, responsable de escorpionismo severo en Venezuela, y con menor potencia según la DL_{50} reportada. En la tabla 8 se resumen los valores de DL_{50} reportados en diversos estudios, para varias especies de bûtidos de América. El grupo de Possani en México revisó recientemente la DL_{50} para varias especies de escorpiones mexicanos y utilizó en todos los casos la metodología de Dixon (Riaño-Umbarilla et al., 2017).

Aunque la estimación de la DL_{50} ha sido considerada tradicionalmente como el mejor indicador de la capacidad tóxica de una sustancia, su valor y significación han disminuido (Repetto y Repetto, 2009). Además, comparar la potencia de los venenos mediante la DL_{50} exige que ésta se haya estimado mediante el mismo método, lo que involucra mismo tiempo de observación, modo de inoculación, concentración de veneno y cepa de ratones. Finalmente, la DL_{50} no es el único factor a considerar cuando se estudia la gravedad del emponzoñamiento escorpiónico, sino que se deben tener en cuenta factores del animal como agresividad (las

hembras suelen ser más agresivas y producir múltiples piquetes), capacidad de producción de veneno (estimada mediante la P_c , como se señaló atrás), edad y tamaño del espécimen (escorpiones adultos y más grandes producen accidentes más graves), estado del aparato inoculador, y si el escorpión inyecta veneno durante la picadura, y en tal caso la cantidad inyectada (D'Suze, Sevcik y Brazón, 2011). Las características del sujeto inyectado como la edad, estado general de salud y peso, son también determinantes de la gravedad del accidente (Chávez-Haro y Ortiz, 2015).

Especie	Localidad	DL ₅₀ (mg/kg ratón)	Referencia
<i>T. stigmurus</i>	Brasil	0.773	Nishikawa et al., 1994
<i>T. bahiensis</i>	Brasil	1.062	Nishikawa et al., 1994
<i>T. serrulatus</i>	Brasil	0.99	Santos da Silva et al., 2017
<i>T. costatus</i>	Brasil	1.59	Nishikawa et al., 1994
<i>T. fasciolatus</i>	Brasil	2.984	Méndez et al., 2014
<i>T. obscurus</i> sin. <i>T. cambridgei</i>	Brasil	3.13	Santos da Silva et al., 2017
<i>C. noxius</i>	México	0.125	Riaño-Umbarilla et al., 2017
<i>C. tecomanus</i>	México	0.51	Riaño-Umbarilla et al., 2017
<i>C. sculpturatus</i>	México	1.135	Riaño-Umbarilla et al., 2017
<i>C. infamatus infamatus</i>	México	0.48	Riaño-Umbarilla et al., 2017
<i>C. limpidus</i>	México	0.75	Riaño-Umbarilla et al., 2017
<i>T. caripitensis</i>	Venezuela	5	De Souza et al., 2009
<i>T. discrepans</i>	Venezuela	8.8	Borges et al., 1990
<i>Rhopalurus laticauda</i>	Venezuela	30	De Souza et al., 2009
<i>T. gonzalespongai</i>	Venezuela	11.91	De Souza et al., 2009
<i>T. zulianus</i>	Venezuela	1.6	Borges et al. 2002
<i>T. forcipula</i>	Cali, Valle del Cauca	2.39	(a) Este estudio
<i>T. asthenes</i>	Mutató Ant.	6.1	Gómez et al., 2010
<i>C. margaritatus</i>	Antioquia	5	Gómez et al., 2002
<i>T. fuhrmani</i>	Antioquia	3.9	Gómez et al., 2002
<i>T. Pachyurus</i>	Tolima, Col.	4.8	Barona et al., 2004

Tabla 8. DL₅₀ reportada para diversas especies de escorpiones de la familia Buthidae en Colombia y América. El veneno de *T. forcipula* es el más tóxico reportado hasta ahora en Colombia, aunque de toxicidad moderada en comparación con las especies más peligrosas de América, que se encuentran en México y Brasil. (a) El reporte para *T. forcipula* se hace por primera vez, en el presente estudio, según la metodología Up-and-Down propuesta por Dixon, 1965.

Los resultados anteriores permiten postular que el veneno de *T. forcipula* presenta toxicidad moderada en comparación con las especies más peligrosas para humanos en

América, pero hasta el momento es el de mayor toxicidad reportado en Colombia, con una productividad de veneno mayor que la encontrada para otras especies colombianas, y similar a la de especies potencialmente riesgosas en las regiones vecinas. Sin embargo, se desconocen a la fecha reportes de accidentes fatales por picadura de *T. forcipula*, lo que podría explicarse por el hábito ecológico y baja agresividad de esta especie, que habita bosques templados montanos entre los 1500 y los 2000 msnm. Aunque se han registrado casos de invasión y picaduras dentro de viviendas, la mayor parte de accidentes con *T. forcipula* referidos por los pobladores, se han presentado durante el desarrollo de labores de campo (Observaciones no publicadas). Esta sería una importante diferencia con especies como *T. fuhrmanni* en Colombia, que suele infestar áreas pobladas y viviendas (Gómez et al., 2002) y *T. serrulatus* en Brasil, que se ha adaptado muy bien a ambientes urbanos, invadiendo las viviendas humanas con el consiguiente incremento en el número de accidentes y el mayor riesgo pediátrico, ya que es esta la población con mayor incidencia de accidentes fatales (Bordon et al., 2015).

En la tabla 5 se presentan los resultados del análisis de las variables hematológicas de ratones albino suizo, una hora post-inyección de dosis sub-letal de veneno entero. Las variables de la composición y química sanguínea que presentaron diferencias significativas entre control y veneno fueron: recuento de células blancas (WBC), recuento absoluto de linfocitos (LYM), recuento absoluto de granulocitos (GRA), recuento relativo de linfocitos (LY%), recuento absoluto de plaquetas (PLT), ancho de distribución de las plaquetas, neutrófilo relativo, neutrófilo absoluto y glicemia.

Se acepta actualmente que la falla orgánica múltiple se debe en buena parte a la prolongada y excesiva activación de vías inflamatorias, aunque los mecanismos por los cuales el veneno de escorpión induce la respuesta inmune no se conocen por completo (Petricevich, 2010). La activación y mediación de factores inflamatorios (citokinas, kininas, especies reactivas de oxígeno, eicosanoides y NO) está implicada en la génesis de las alteraciones cardiorrespiratorias que caracterizan el escorpionismo severo, con múltiples mecanismos causados por componentes del veneno de escorpión, que desencadenan las cascadas inflamatorias que terminan causando fallas sistémicas (Petricevich, 2010; Adi-Bessalem *et al.*, 2015). La desgranulación de células cebadas causada por acción directa del veneno, por kininas promovidas por el veneno, y por factores neuroendocrinos como la sustancia P (liberada por las fibras nerviosas activadas por el veneno), tiene un papel fundamental en el edema pulmonar y la respuesta nociceptiva. Al igual que las células cebadas, la eosinofilia se ha observado en envenenamiento experimental y accidental (Adi-Bessalem *et al.*, 2015).

El compromiso de la función pulmonar en el escorpionismo severo, es una de las consecuencias exacerbadas por la inflamación. La inoculación IM de veneno de *T. serrulatus* en ratones resultó en aumento de la densidad de células mononucleares y polimorfonucleares en pulmón, y alteración de la mecánica pulmonar por efecto inflamatorio (Paneque *et al.*, 2009). El veneno del búpido peruano *Hadruroides lunatus* indujo alteraciones histopatológicas significativas del tejido pulmonar, con hemorragia difusa (Costal-Oliveira *et al.*, 2017).

El estudio comparativo de cambios fisiopatológicos en las vías respiratorias de las ratas envenenadas con veneno *T. serrulatus* (Tsv) y *T. Bahiensis* (Tbv), mostró cambios significativos, asociados a hemorragia y extravasación de proteínas en los pulmones. Se

detectaron interleucinas en homogenizados pulmonares (IL-1b e IL-6), y aumento del número de células polimorfonucleares. El leucograma mostró valores aumentados de leucocitos, con la neutrofilia más alta en el caso del grupo envenenado con Tsv (Miyamoto *et al.*, 2018). En contraste, la inyección intraperitoneal de veneno del escorpión venezolano *T. discrepans* en ratones causó neutrofilia y linfopenia, sin cambios significativos en el conteo total de leucocitos, el número de plaquetas e índices hematimétricos (Rodríguez *et al.*, 2015).

Los resultados de este estudio muestran que el veneno de *T. forcipula* desencadena la respuesta inflamatoria típica del envenenamiento por bûtidos, con leucocitosis, linfocitosis y neutrofilia, con el perfil del hemograma más parecido al observado en envenenamiento por escorpiones *Tiyus* de regiones al sur de Colombia (*T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *H. lunatus*), y diferente al efecto del veneno de *T. discrepans*, distribuido en la costa norte de Venezuela. La exacerbada respuesta inflamatoria tiene un rol importante en la falla cardiorrespiratoria evidenciada durante el test de Irwin en los ratones envenenados. Las víctimas de escorpionismo que presentaron fallas orgánicas multisistémicas, se caracterizaron por cambios en el ambiente hormonal con liberación masiva de hormonas contrarreguladoras (catecolamina, glucagón, cortisol, angiotensina-II) y disminución de insulina plasmática, con el aumento concomitante de la glucemia (Petricevich, 2010). El efecto hiperglucemiante se observó en el envenenamiento experimental con veneno de *T. forcipula*.

El test de Irwin en ratones inyectados con veneno de *T. forcipula*, evidenció los signos característicos del envenenamiento causado por los venenos neurotóxicos de los bûtidos. Según Petricevich, 2010, los signos locales observados en las víctimas de escorpionismo y en envenenamiento experimental de roedores, pueden separarse en neurotóxicos y citotóxicos

locales. Los signos del sistema nervioso central son simpáticos (hipertermia, taquipnea, taquicardia, hipertensión, arritmias, edema, hiperglucemia, diaforesis, piloerección, hiperexcitabilidad, convulsiones), parasimpáticos (broncoconstricción, bradicardia, hipotensión, salivación, lacrimación, diarrea, orina, priapismo, disfagia, emesis gástrica), somáticos (incremento de reflejos tendinosos), craneales (ptosis, disfagia, pérdida del reflejo faríngeo) y del sistema nervioso periférico (parálisis, convulsiones). Los signos también se clasifican como no neurológicos (cardiovasculares, respiratorios, gastrointestinales, genitourinarios, hematológicos y metabólicos) y neurológicos (se deben a la liberación de catecolaminas de las glándulas suprarrenales y las terminales nerviosas, y la liberación de acetilcolina de neuronas parasimpáticas posganglionares) (Petricevich, 2010).

La inyección subplantar del veneno entero de *T. forcipula* incrementó significativamente el tiempo de lamido de la pata en ratones. Los animales se lamieron constantemente durante los primeros 5 minutos, el lamido disminuyó al terminar esta fase, y se incrementó de nuevo entre los 20-25 minutos posteriores a la inyección. La primera fase corresponde con la aparición de dolor agudo o epicrítico, y la segunda con el dolor inflamatorio (Fischer *et al.*, 2014). El veneno entero a 1/3 de la DL_{50} , incrementó tres veces el tiempo de lamido de pata en la fase aguda con respecto al test de formalina, y más de once veces el tiempo de lamido en la fase de dolor inflamatorio con respecto a la formalina.

Los reportes de investigación y las observaciones de campo indican que la picadura de escorpiones bítidos es mucho más dolorosa que la de otros escorpiones, pero hay pocos estudios con modelos murinos que cuantifiquen y comparen el dolor inducido por la picadura de escorpiones bítidos y no bítidos (Chen *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2008). Rowe *et al.*, 2011

realizaron ensayos de comportamiento con fracciones de veneno y péptidos purificados del veneno de bótidos del nuevo mundo, evaluando la capacidad de inducir dolor usando el ensayo de lamido de pata en ratones caseros. Encontraron que el veneno de *C. vittatus* y *C. exilicauda* incrementó significativamente el tiempo de lamido de pata en comparación con el veneno de escorpiones no bótidos, y la fracción CvIV4 del veneno de *C. vittatus* producía un efecto de lamido equivalente al veneno entero. Junto con la evidencia electrofisiológica del enlentecimiento de la inactivación rápida del canal $\text{Na}_V1.7$, expresado en nociceptores periféricos, postularon que el dolor inducido por el veneno de escorpiones bótidos se relaciona con la modulación de los canales Na_V expresados en nociceptores (Rowe et al, 2011).

El dolor asociado al escorpionismo es probablemente importante como parte del mecanismo de defensa contra predadores potenciales. Aminas bioactivas como histamina y serotonina son componentes comunes del veneno de los escorpiones, aunque están presentes en bajas concentraciones. La histamina produce dolor en el sitio de la inyección (ventaja defensiva), y se asocia por tanto al dolor epicrítico (Bordon *et al.*, 2015). La activación por toxinas específicas, de canales $\text{Na}_V1.7$, presentes en terminales nerviosas de nociceptores, también se asocia a la percepción del dolor agudo (Rowe *et al*, 2011). La descripción del dolor como sensación de quemadura, probablemente está asociada también a la activación de canales catiónicos de la familia TRPV, involucrados en la nocicepción. El desencadenamiento de procesos inflamatorios por proteasas del veneno y la acción directa de toxinas específicas sobre canales Na_V de mastocitos, y sobre terminaciones nerviosas en el sitio de la picadura, ocasiona liberación de histamina por las células cebadas, con aumento de permeabilidad vascular y activación de cascadas inflamatorias que contribuyen al dolor observado en la

segunda fase (Petricevich *et al.*, 2010; Bordon *et al.*, 2015). Finalmente, la actividad PLA2 puede contribuir al dolor inflamatorio mediante la generación de derivados del ácido araquidónico a partir de la catálisis glicerofosfolípidos de membrana (Venancio *et al.*, 2013).

En el presente estudio se utilizó un fototransductor adaptado para la cola de roedores, que permite mediciones mínimamente invasivas, disminuyendo el sufrimiento de los animales experimentales y logrando registros efectivos para la medición de variables de presión sanguínea (Geddes 1979; Infante *et al.* 1997; Kubota *et al.*, 2006). La frecuencia cardíaca (FC) se registró mediante electrodos en las extremidades del animal. La media de la frecuencia cardíaca en ratas Wistar disminuyó significativamente durante el tratamiento con veneno entero, en comparación con el tratamiento control. Se observó disminución significativa de la PAM promedio, de la PAS y la PAD, respecto al control. No fue significativa la diferencia en la PP entre el tratamiento con veneno y el control.

Abdel-Rahman *et al.*, 2015, investigaron los efectos del veneno del búpido egipcio *Androctonus bicolor*, utilizando un enfoque *in vitro*, y encontraron alteración de la actividad eléctrica del corazón por acción sobre receptores β -adrenérgicos. La aplicación directa de veneno de escorpión (0.5g/ml) en el corazón aislado de sapo, indujo bradicardia notable, concomitante con una disminución del intervalo PR (disminución del tiempo de conducción atrio-ventricular) e incrementó la amplitud de la onda R (contracción ventricular) 5 minutos después de perfusión con veneno. También se registraron arritmias sinusales, latidos ectópicos y diferentes grados de bloqueo cardíaco.

Teixeira *et al.*, 2001, investigaron la acción directa del veneno de *T. serrulatus* en el corazón de rata aislado (Método de Langendorff). El veneno indujo bradicardia, que fue completamente bloqueada por atropina, antagonista del receptor muscarínico. El veneno tuvo efecto inotrópico positivo, que no se modificó por el bloqueo del adrenoceptor β_1 . Según estos resultados, los efectos cronotrópicos de *T. serrulatus* dependen de la liberación de neurotransmisores, pero los efectos inotrópicos no, sugiriendo que el aumento de la contractilidad independiente de neurotransmisor, parece ser una acción directa del veneno sobre los canales iónicos de los cardiomiocitos, que lleva a incremento del calcio citosólico. Los autores sugieren que el efecto directo del veneno sobre las fibras cardíacas puede desempeñar un papel en el desarrollo de arritmias cardíacas y las alteraciones de la contractilidad después del envenenamiento con veneno de *T. serrulatus*.

En contraste con los resultados antes descritos, el veneno del búpido peruano *Hadruroides lunatus* causó aumento de la frecuencia cardíaca en ratas Wistar macho envenenadas experimentalmente. Como en los casos antes citados, también se registraron arritmias (Costal-Oliveira *et al.*, 2017). Esto muestra que los efectos cronotrópicos del veneno de escorpión, al estar mediados por neurotransmisores, son complejos.

En pacientes envenenados, el veneno de escorpión de *T. serrulatus* evoca cambios en el segmento ST del electrocardiograma, semejantes a los observados en infartos de miocardio (Bucarechi *et al.*, 2014). La patogenia de estas alteraciones podría atribuirse principalmente a los efectos adrenérgicos del veneno, que conducen a hipoxia miocárdica al aumentar el consumo de oxígeno por el efecto inotrópico positivo.

El veneno entero de *T. forcipula* causó un significativo efecto cronotrópico negativo en ratas Wistar envenenadas experimentalmente, y se postula con base en los resultados de este estudio, que la disminución en las variables de la presión sanguínea (PAM, PAS y PAD) podría ser una consecuencia principalmente de la bradicardia, dado que los resultados del análisis transcriptómico (ver adelante), no muestran la presencia de péptidos putativos con efecto hipotensivo (por ejemplo, potenciadores de bradicinina). Por otra parte, los resultados de este estudio son congruentes con las manifestaciones sistémicas observadas en el escorpionismo de clase III, en el cual se observa arritmia ventricular, hipotensión, bradicardia, edema pulmonar, convulsiones, compromiso neuromuscular, compromiso neurológico y coma (Revisado en Guerrero-Vargas *et al.*, 2015). También corresponden con lo observado en el envenenamiento por otros escorpiones del género *Tityus* del Nuevo Mundo, como en el caso antes citado, del niño de 12 años picado por *T. Pachyurus*, que requirió tratamiento con antiveneno debido a las complicaciones cardiovasculares y hemodinámicas que progresaron a falla cardíaca (Izquierdo y Rodríguez, 2012).

El veneno entero de *T. forcipula* evaluado mediante el sustrato 4-NOBA, presentó actividad PLA2 importante, cercana a la mitad de la actividad del veneno entero del vipérido *P. lansbergii* a las mismas concentraciones. La actividad proteolítica del veneno se evaluó usando azocaseína como sustrato, y el veneno entero mostró una actividad proteolítica de 20.25 unidades/mg de proteína (veneno entero), donde una unidad de actividad se define como el aumento de 0.01 unidades de absorbancia (UA). Mediante método turbidimétrico, se evaluó la actividad hialuronidasa (HYAL) del veneno, y se encontró una actividad de 16 UTR/mg de veneno, donde la actividad se expresa en unidades reductoras de la turbidez (UTR) por mg de veneno.

La actividad fosfolipasa A2 (PLA2) es comúnmente detectable en venenos de escorpiones y se han aislado enzimas con actividad PLA2 a partir de veneno de escorpiones no bítidos (Krayem *et al.*, 2018; Estrada-Gómez, Vargas, Saldarriaga-Córdoba y Quintana, 2016), pero es poco común o no detectable en bítidos. Se han descrito transcritos putativos de fosfolipasas A2 en el transcriptoma de *T. serrulatus*, *T. bahiensis* y *T. stigmurus*, aunque no se ha detectado actividad PLA2 en el veneno (Possani *et al.*, 1999; Venancio *et al.*, 2013). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos de membrana y contribuyen a la respuesta inflamatoria por generación de derivados del ácido araquidónico, y se han asociado a venenos con acción histolítica y necrótica en escorpiones no bítidos (Estrada-Gómez, Vargas, Saldarriaga-Córdoba y Quintana, 2016). La actividad proteolítica se ha detectado en algunos géneros de escorpiones, aunque su función en los venenos es todavía desconocida. Es probable que las proteasas participen en el procesamiento y activación de las toxinas, faciliten la difusión de los componentes tóxicos al degradar componentes de la matriz intersticial y contribuyan a la respuesta inflamatoria activando el sistema del complemento (Revisado en Bordon *et al.*, 2015).

En el proteoma de la fracción I del veneno de *T. serrulatus* se han identificado numerosas enzimas. La fracción I de la cromatografía en carboximetilcelulosa-52 del veneno, exhibió actividad proteolítica y fue capaz de inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y resultó estar conformada por neurotoxinas (48%), metaloproteinasas (21%), péptidos hipotensivos (11%), proteínas del veneno ricas en cisteína (9%), péptidos antimicrobianos (AMP), fosfolipasas y otras enzimas (quimotripsina y lisozimas) (3%) y fosfodiesterasas (2%) (Amorim *et al.*, 2019). La presencia de estas proteasas en el veneno de *T. serrulatus* había sido informada a partir de estudios ómicos (De Oliveira *et al.*, 2018). Estas

enzimas clivan proteínas en sitios específicos de la secuencia aminoacídica, y son importantes en el metabolismo celular, participando en múltiples procesos, como la eliminación postraducciona de péptidos señal (Bordon *et al.*, 2015). La metaloproteinasa “antareasa” de *T. serrulatus*, mostró capacidad de penetrar tejidos intactos y escindió proteínas de membrana asociadas a vesículas (SNARE), por lo que se postuló que podría participar en la alteración de los mecanismos de secreción y transporte vesicular involucrados entre otras cosas, en la pancreatitis aguda observada en el escorpionismo por *T. serrulatus* (Fletcher, 2010). Diez nuevas secuencias de metaloproteinasas denominadas metaloserrulasas, fueron predichas a partir del análisis del transcriptoma de la glándula de veneno de *T. serrulatus* (Carmo *et al.*, 2014).

Las hialuronidasas (HYAL) son enzimas ubicuas en los venenos de diversos animales y parecen estar relacionadas con la propagación del veneno. Estas enzimas clivan el hialurano, principal glucosaminoglucano de la matriz extracelular, siendo responsables de la difusión de los componentes tóxicos del veneno a través de los tejidos de la presa o víctima (Revisado en Bordon *et al.*, 2015). Se ha reportado que la actividad HYAL de *T. serrulatus* es similar a la determinada para algunos venenos botrópicos (Venancio *et al.*, 2013), de modo que la actividad de HYAL podría ser importante en el envenenamiento por los escorpiones del género *Tityus*. La actividad de HYAL también fue detectada mediante inmuno ensayos y Western blot, en venenos de *T. bahiensis*, *T. stigmurus* y *T. obscurus*, aunque con una reacción más débil en este último (Guerra-Duarte *et al.*, 2019). Desde el punto de vista terapéutico, la administración de inhibidores de HYAL se ha considerado como un componente importante de la terapia antiveneno, junto con la administración de sueros, al limitar la disolución tisular de las toxinas.

Los resultados del presente estudio indican que el veneno de *T. forcipula* incluye componentes con actividad proteasa e HYAL, bien caracterizados en los venenos de bñtidos de regiones vecinas, y muestra de forma atípica importante actividad PLA2, que debe investigarse adicionalmente. Estos resultados corresponden con lo encontrado en el análisis del transcriptoma, que se presenta en la sección siguiente, y que permitió identificar péptidos putativos de varios tipos de enzimas. La actividad enzimática parece ser un componente importante de la respuesta inflamatoria observada en ratones, y parece que contribuye a la rápida difusión y letalidad del veneno.

La Guía para el Manejo de Emergencias Toxicológicas del Ministerio de Salud de Colombia incluyó el escorpionismo como emergencia (MinSalud, 2008). En la Guía se enlistan las especies involucradas en accidentes de consideración (*T. asthenes*, *T. fuhrmanni* y *T. pachyurus*), se hacen recomendaciones al personal sanitario para el manejo del accidente escorpiónico (medidas para controlar los síntomas, monitoreo permanente, y en los casos más graves, realizar soporte ventilatorio y hemodinámico, y administrar terapia con suero). La Guía indica factores pronósticos de la severidad del accidente escorpiónico: la edad del paciente (los casos graves y fallecimientos se han observado principalmente en niños), la especie y el tamaño del escorpión (los géneros *Centruroides* y *Tityus* se relacionan frecuentemente con efectos sistémicos y muerte, los animales más grandes podrían inocular mayor cantidad de veneno), el tiempo transcurrido para acceder a atención hospitalaria, los síntomas observados (el vómito en las primeras dos horas parece ser un dato premonitorio de gravedad) y la letalidad del veneno. Los resultados sugieren que *T. forcipula* debería incluirse en la lista de especies potencialmente peligrosas en Colombia, dado que hasta el momento es el de mayor toxicidad reportado en el país, con una productividad de veneno promedio mayor

que la encontrada para otras especies colombianas y similar a la de especies peligrosas para los humanos en las regiones vecinas. En casos de escorpionismo por *T. forcipula* que involucren niños, es recomendable la atención médica, y no debe descartarse el monitoreo de secuelas como lesión miocárdica, pancreatitis y diabetes, en casos de escorpionismo severo.

6. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LA GLÁNDULA DEL VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus forcípula*

6.1 METODOLOGÍA

6.1.1 Extracción del RNA de las glándulas de veneno y secuenciación total

Tres especímenes machos de *T. forcípula* colectados en la localidad del Km 18 Vía al Mar, se transportaron al laboratorio y se desvenenaron mediante estimulación eléctrica como se describió atrás. Dos días (48 horas) después del desvenenamiento, los especímenes se anestesiaron por exposición a CO₂ en receptáculo cerrado. Bajo microscopía estereoscópica y condiciones estériles, se abrió el telson usando una hoja microquirúrgica y se removieron las glándulas productoras de veneno usando pinzas quirúrgicas. El tejido se llevó a solución preservante de ARN (RNAlater, Quiagen, EE. UU.) y se extrajo el ARN utilizando el minikit RNAeasy (Quiagen, EE. UU.), que incluye columnas minispin para la extracción del ARN, tubos de eppendorf para centrifuga, búfers de lisis (RLT) y lavado (RPE), y agua libre de ARNasa (RNAasa free).

La extracción se efectuó siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se limpiaron con H₂O₂ las superficies de trabajo e instrumentos. El material quirúrgico se lavó con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1% y se esterilizó. Se pesaron 30 mg del tejido glandular disectado. Se llevó el material a un mortero de porcelana, se congeló con N₂ líquido y se maceró. El macerado se llevó a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se le adicionaron 300 µL de buffer de lisis RLT y se maceró nuevamente el tejido manteniéndolo sumergido en N₂ líquido. Se centrifugó el material durante 3 minutos a 1300 rpm, se removió el sobrenadante con micropipeta, se

transfirió a un nuevo eppendorf, se adicionó un volumen de etanol al 70% y se homogenizó pipeteando. Se transfirieron 700 μ L de la suspensión a la columna minispin dispuesta en un tubo de centrífuga de 2 mL, se centrifugó durante un minuto a 10000 rpm y se descartó el filtrado. Se realizaron tres lavados sucesivos a la columna minispin con buffer RPE (700, 500 y 500 μ L respectivamente), seguidos de centrifugado (10000 rpm durante 15 s para el primer y segundo lavado y 10000 rpm durante dos minutos para el tercer lavado), descartando en cada paso el filtrado.

Finalmente se llevó la columna minispin a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 30 μ L de agua libre de ARNasa y se centrifugó durante un minuto a 1000 rpm. El ARN se liberó de la columna minispin y se obtuvo suspendido en agua libre de ARNasa durante esta última centrifugación. El procedimiento se realizó bajo cabina de flujo laminar. El ARN obtenido se cuantificó (NanoDrop 2000) y se almacenó a -70°C. El ARN se envió al laboratorio Omega Bioservices (Georgia, USA) donde fue secuenciado mediante la plataforma HiSeq2500 (Illumina), que realizó la secuenciación PE (“pairedend”) utilizando el kit TruSeqmRNA (Illumina). Los datos de secuenciación se almacenaron como archivos FASTA en la plataforma Illumina BaseSpace.

6.1.2 Análisis bioinformático de secuencias nucleotídicas

Las secuencias crudas (reads) se subieron al sitio web de Galaxy. Los análisis que se describen a continuación se realizaron utilizando herramientas informáticas alojadas en el sitio web de Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) y en el sitio web de NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Inicialmente se realizó

el análisis de calidad con la herramienta FastQC. Ante la carencia de un genoma de referencia para escorpiones, se hizo el ensamblaje *de novo* del transcriptoma mediante el algoritmo Trinity y se evaluó la calidad del ensamblaje mediante la herramienta QUAST (Trapnell et al., 2012; Haas et al., 2013).

Utilizando el algoritmo HISAT2, los “reads” se alinearon contra las secuencias ensambladas (contigs) del genoma *de novo*, que en este caso se usó como genoma de referencia. Mediante la herramienta htseq-count se hizo el conteo de “reads” alineados (formato BAM) que traslaparon con rasgos del genoma ensamblado (formato GFF). Como archivo de salida, htseq-count generó una tabla de conteo de los traslapamientos para cada rasgo, que se utilizó como índice de expresión diferencial (King, Langmead y Salzberg, 2015). Los archivos se manipularon mediante Excell y Notepad++. Cuando fue necesario, la conversión de formatos se hizo mediante herramientas como FASTQGROOMER, Tabular-to-FASTA y FASTA-to-Tabular.

Asumiendo que la expresión de un gen es proporcional al número de conteos, se seleccionaron los transcritos con mayor conteo, que son por tanto los que presentan mayor expresión diferencial en el transcriptoma (Anders, Pyl y Huber, 2014). Se efectuó la búsqueda de secuencias homólogas con los transcritos más representados, contra la base de datos no redundante (nr) de escorpiones (taxid: 6855) empleando el algoritmo BLASTX con $e\text{-value} < 10^{-5}$, y contra la base de datos de *Tityus* (taxid: 6886) mediante el algoritmo BLASTN con $e\text{-value} < 10^{-5}$, realizando ambos en línea en el sitio web de NCBI. Para describir la función putativa, se seleccionaron secuencias altamente similares ($e\text{-value} < 10^{-5}$) a las

reportadas por otros autores, con evidencia funcional (Haas *et al.*, 2013). Previamente se identificaron las secuencias del péptido señal para no incluirlas en la búsqueda. Mediante la herramienta SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) se hizo la predicción del péptidoseñal, y mediante SpiderP (<http://www.arachnoserver.org/spiderP.html>), se predijo el corte del propéptido, siguiendo la metodología discutida por Petersen, Brunak, von Heijne y Nielsen, 2011.

Los transcritos que presentaron similitud con secuencias previamente reportadas en dichas bases de datos, se analizaron manualmente y se tradujeron a secuencias de aminoácidos determinando los marcos de lectura abiertos (ORFs) mediante el algoritmo orffinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Los alineamientos de múltiples secuencias se realizaron con MUSCLE en el software MEGA 7 y se editaron con Jalview (<http://www.jalview.org/>) (Waterhouse, Procter, Martin, Clamp, & Barton, 2009) y Adobe Illustrator CC 2018.

En la sección correspondiente al análisis del proteoma del veneno de *T. forcipula* (ver más adelante), se presenta la metodología y resultados de la secuenciación parcial o total, mediante degradación automatizada de Edman, de seis péptidos aislados a partir del veneno. Para identificar los transcritos putativos codificantes de estos seis péptidos, se ejecutó un análisis de BLASTP con el programa Geneious Prime 2019 (<https://www.geneious.com>), utilizando como base de datos el conjunto de transcritos anotados de *T. forcipula*. El flujograma de la figura 18 resume la secuencia de procedimientos realizados en desarrollo del análisis del transcriptoma de la glándula del veneno de *T. forcipula*.

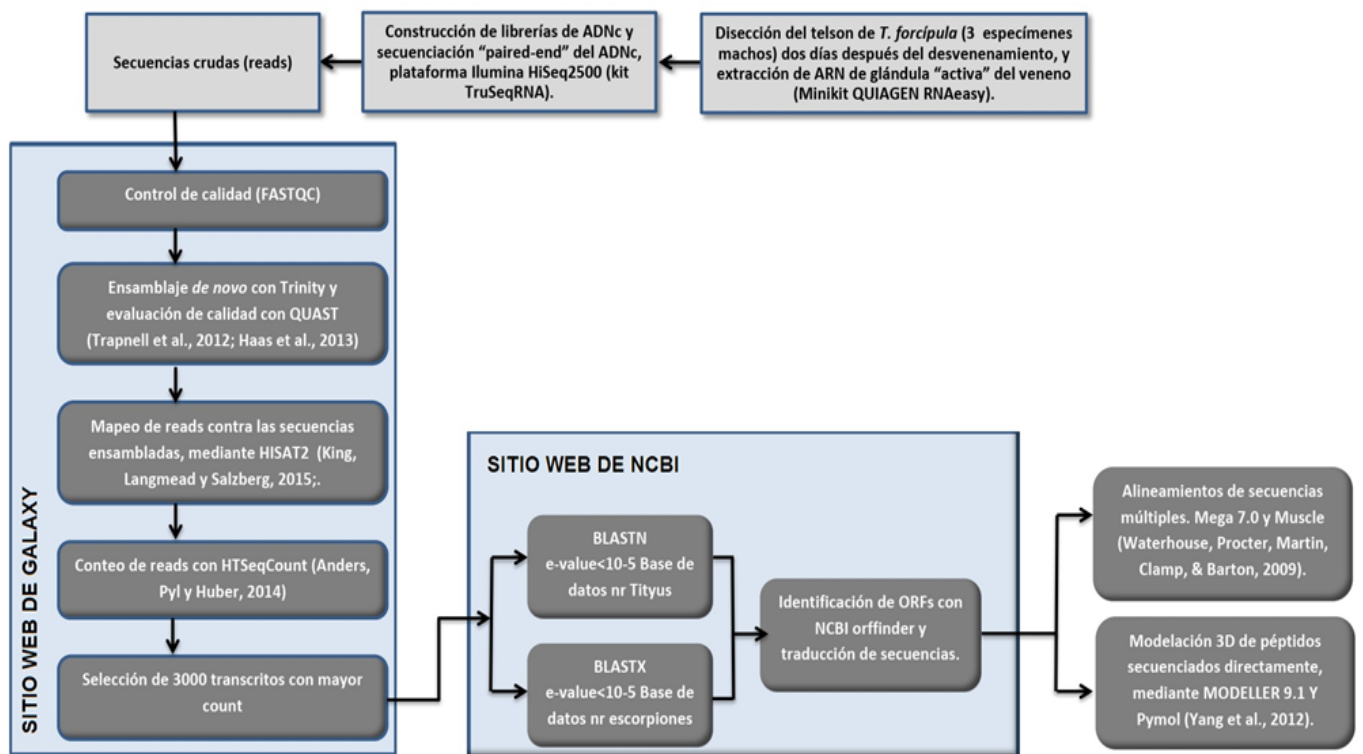


Figura 18. Flujograma del análisis del transcriptoma de *T. forcipula*.

6.1.3 Predicción de estructuras terciarias

Tres de los péptidos secuenciados por degradación de Edman se modelaron por homología con péptidos reportados en Protein Data Bank (PDB), mediante el programa MODELLER 9.1 en el software USFC Chimera (Yang *et al.*, 2012). Los modelos generados se validaron en el servidor SAVES v5.0 obteniendo diagramas de optimización de Ramachandran (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>), y se visualizaron mediante PyMOL.

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Extracción del ARN de las glándulas de veneno

Utilizando el minikit RNAeasy (Quiagen, EE. UU.), se extrajo el ARN de la glándula productora de veneno de *T. forcipula* y se obtuvieron 20 µL de suspensión de ARN (concentración de 130.8 ng/µL, cociente 260/280 nm de 2.09).

6.2.2 Resultados globales del análisis transcriptómico

La secuenciación del ARN de la glándula de veneno de *T. forcipula* generó 25 258 187 fragmentos crudos (“reads”). El ensamblaje *de novo* de los “reads” produjo 44605 secuencias ensambladas (“contigs”) con longitud media de 867 pares de bases (pb). Los reads se alinearon contra el genoma *de novo* y se obtuvieron 21 758 431 parejas de reads alineadas, con una tasa de mapeo global de 93.64%. La tabla 9 resume la estadística de los datos crudos, el ensamblaje y el alineamiento.

Ítem	Número	Rango de longitud (pb)	Longitud promedio (pb)
Secuencias crudas (reads)	25258117	[35 - 101]	
Secuencias ensambladas	44605	[201 - 17328]	867
Reads mapeados	21758431		

Tabla 9. Estadística global del transcriptoma de *T. forcipula*. El ensamblaje *de novo* se hizo mediante el programa Trinity, y el alineamiento de secuencias crudas contra el genoma *de novo*, con la herramienta HISAT2, en Galaxy.

6.2.3 Perfil del transcriptoma de la glándula del veneno

De los 3000 transcritos con mayor representatividad en el genoma, 2891 mostraron homología con secuencias previamente reportadas en la base de datos no redundante (nr) de escorpiones de NCBI, y 114 no tuvieron coincidencias. Entre los transcritos con homología, 2341 transcritos correspondieron a proteínas relacionadas con procesos celulares y 218 a componentes putativos del veneno (Figura 19A). El resto de los transcritos incluye 260 proteínas no caracterizadas y 67 proteínas hipotéticas.

En las figuras 19 B y 20 se grafica la distribución de los 218 transcritos que codifican proteínas y péptidos putativos del veneno, correspondiendo principalmente con enzimas, de las cuales las metaloproteasas forman el grupo principal. El siguiente grupo de componentes lo forman transcritos que codifican las toxinas putativas que modifican específicamente la permeabilidad de los canales de sodio (NaScTxS) y de potasio (KScTxS). Se encontraron proporciones menores de transcritos codificantes para péptidos antimicrobianos, inhibidores de proteasa y componentes heterogéneos como alérgenos, proteínas ricas en cisteína y otros péptidos y proteínas.

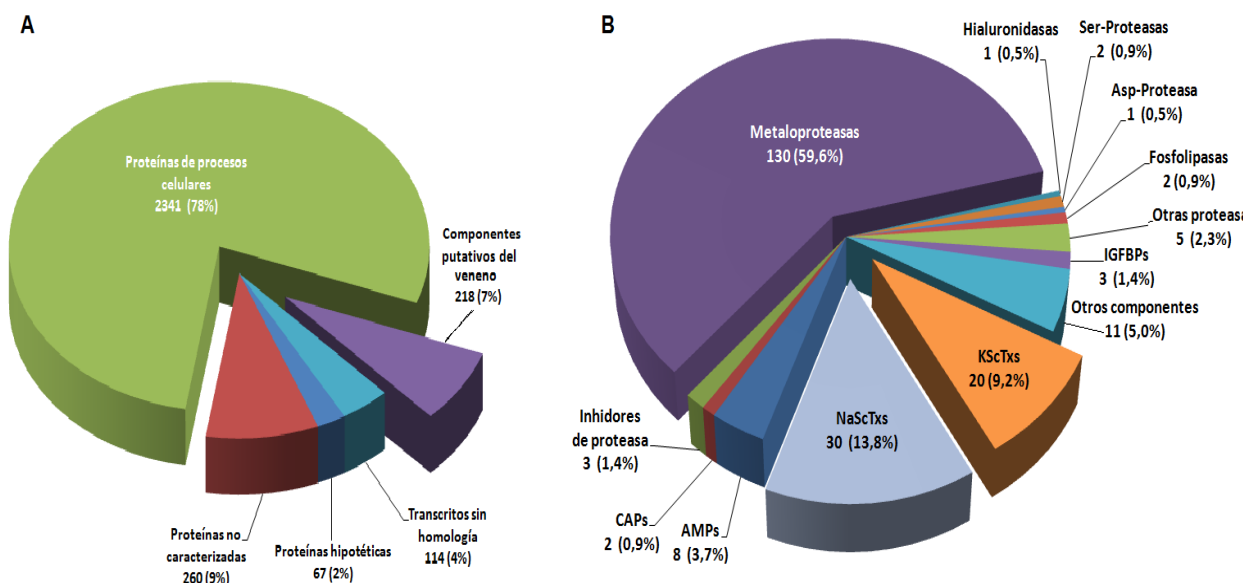


Figura 19. Resultados globales del análisis transcriptómico de la glándula del veneno del escorpión *Tityus forcipula*. A) Distribución de los transcritos de la glándula del veneno. B) Distribución de los componentes putativos del veneno. CAPs, proteínas ricas en cisteína. AMPs, péptidos antimicrobianos. NaScTxS, Toxinas específicas para canales de sodio. KScTxS, toxinas específicas para canales de potasio. IGFBPs, proteínas de unión a factores de crecimiento tipo insulina.

Los 218 péptidos y proteínas putativos del veneno de *T. forcipula* presentan mayor identidad con componentes del veneno de *T. serrulatus* y del búfido *Centruroides sculpturatus*, junto con *T. pachyurus*, *T. obscurus*, *T. discrepans*, *T. trivitattus*, *T. costatus* y

T. stigmurus. Las NaTx putativas del veneno de *T. forcipula* presentaron mayor similitud con toxinas reportadas para *T. pachyurus* y *T. obscurus*. Las KTx presentaron identidad principalmente con toxinas reportadas para *T. discrepans*, *T. serrulatus*, *T. costatus* y *T. stigmurus*. Los transcritos que codifican enzimas putativas presentaron identidad con enzimas de *T. serrulatus*, *C. sculpturatus* y *T. trivittatus* principalmente. Los péptidos antimicrobianos (PAM), fueron un grupo pequeño de componentes en el veneno de *T. forcipula*, con identidad a péptidos reportados previamente para *T. obscurus*, *T. costatus* y el bótido del Viejo Mundo *Mesobuthus eupeus*.

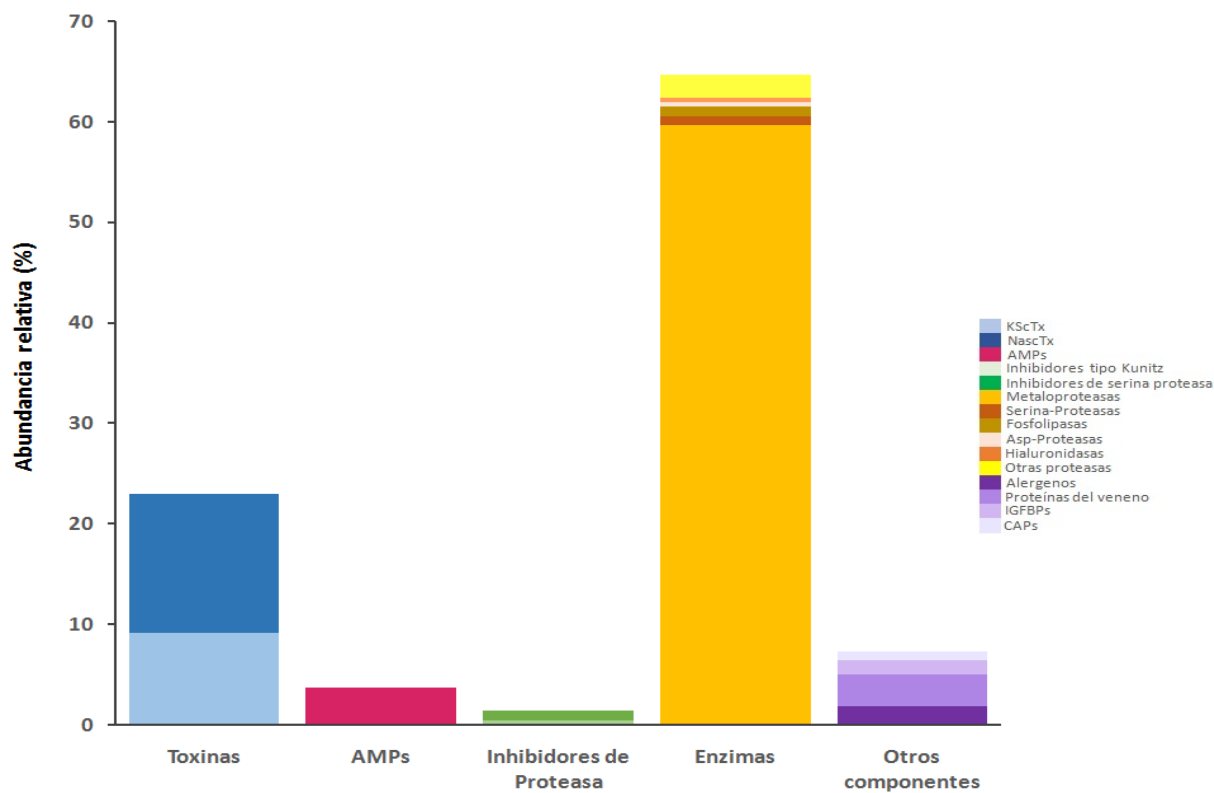


Figura 20. Distribución de los transcritos manualmente anotados según familias y sub-familias de proteínas. KScTxs, toxinas específicas para canales de potasio. NaScTxs, Toxinas específicas para canales de sodio. AMPs, péptidos antimicrobianos. NaScTxs, Toxinas específicas para canales de sodio. KScTxs, toxinas específicas para canales de potasio. IGFBPs, proteínas de unión a factores de crecimiento tipo insulina. CAPs, proteínas ricas en cisteína.

6.2.4 Componentes del veneno

6.2.4.1 Toxinas específicas para canales de sodio

En las tablas 10 a 13 se presentan las secuencias y características principales de los péptidos putativos identificados como toxinas específicamente activas sobre canales Na_v (NaScTx). En esta investigación se asignaron nombres triviales a las NaScTx que fueron identificadas en el transcriptoma de la glándula del veneno de *T. forcipula*. Los nombres triviales se formaron con el nombre genérico TfpNaTx, seguido de una etiqueta de la familia o grupo, asignado según la identidad en el resultado del BLAST (Alp para α y Bet para β), y un número serial correspondiente al orden de salida del análisis BLAST.

PÉPTIDO PUTATIVO	SECUENCIA DE AA PREDICHA
TfpNaTxAlp01	<u>MMVSFLYLLLLTLMCCNTNPNCNMGSLDGDGDFPRKNNGHLYVCKSNCEVSICQEHGMKKEAKCCYGNCFESLHGKQIRKQTLN</u>
TfpNaTxAlp02	<u>MNYCILIAVACLLTAGTDSKKDAYPAQDNGCGYVPCGAFCDYDHDYCDKLCCKEKKADSGYCYAGRIICYGLPDNEPE</u>
TfpNaTxAlp03	<u>MNYCILIAVACLLTAGTDSKKDAYPAKYDGCYVPCGAFCDYDHDYCDKLCCKEKKADSGYCYAGRIICYGLPDNEPE</u>
TfpNaTxAlp04	<u>MPPPPAHSHRIGKMSIFPIALALLLIGLEEGEAARDGYPISKNNNCKIYCPDTKVCKETCKKRASAPDGECDGWNLCYCFKVPDNIPVWGDPTPPC</u>
TfpNaTxAlp05	<u>MPPPPAHSHRIGKMSIFPIALALLLIGLEEGEAARDGYPISKNNNCPYCPDVTCKWTKERAKAPNGEGRSKLCYCFDVPDEIKLYGDPDTKSCRK</u>
TfpNaTxAlp06	<u>MPPPPAHSHRIGKMSIFPIALALLLIGLEEGEAARDGYPISKNNNCPYCPDVTCKWTKERAKAPNGEGRSKLCYCFDVPDDIKLYGDPDTKSCRK</u>
TfpNaTxAlp07	<u>MPPPPAHSHRIGKMSIFPIALALLLIGLEEGEAARDGYPISKNNNCKIYCPDTKVCK</u>
TfpNaTxAlp08	<u>MPPPPAHSHRIGKMSIFPIALALLLIGLEEGEAARDGYPISKNNNCPYCPDVTCKWTKERAKAPNGEGRSKLCYCFDVPDEIKLYGDPDTKSCRK</u>
TfpNaTxAlp09	<u>LIGLEEGEAARDGYPISKNNNCKIYCPDTKVCKETCKKRASAPDGECDGWNLCYCFKVPDNIPVWGDPTPPCMT</u>
TfpNaTxAlp10	<u>RDGYPISKNNNCKIHCPTDVTCKWTKERAKAPNGEGRSKLCYCFQVDPDHIPVWGDPTKPC</u>
TfpNaTxAlp11	<u>MNYFVLIAVACLLTAGTESKKDGYPLEYDNCAYDCLGYDNAKCDKLCCKEKKADSGYCYWAHILCYGLPDNEPTKTNGRCRPGKK</u>
TfpNaTxAlp12	<u>MNYFVLIAVACLLTAGTESKKDGYPAKDTNCGYTCGLGYDNAKCDKLCCKEKKADSGYCYWAHILCYGLPDNEPTKTNGRCRPGKK</u>
TfpNaTxAlp13	<u>MSMLAILALLFIGTKGNEVRNGYPILKDGCKYTCSPLETGPRCSKICKEKAGSWYGYCYMWACYCTDVSKKTVLFGDSGAPECFVTIK</u>

Tabla 10. Secuencias de la α -NaTx putativas del veneno de *T. forcipula*. El ensamblaje *de novo* se hizo mediante el programa Trinity y el alineamiento de secuencias crudas contra el genoma *de novo*, con la herramienta HISAT2, en Galaxy. El péptido señal se predijo con SignalP y el corte del propéptido con SpiderP. El péptido señal se muestra subrayado y el péptido maduro en negrita.

En la tabla 10 se presentan las secuencias de los precursores (pro-péptidos) de los 13 péptidos putativos identificados como α -NaTx. En cada caso el péptido señal se ha subrayado y el péptido maduro se ha destacado en negrita (según la predicción con SignalP y SpiderP, cuando se ha obtenido la predicción). La tabla 11 resume las principales características de los

precursores y los péptidos maduros de las α -NaTx putativas según los resultados del BLASTX y el BLASTN con $e\text{-value} < 10^{-5}$, y el análisis mediante Expassy, de la siguiente forma: Longitud (número de aminoácidos) y peso molecular (pm, Da) tanto para el precursor como para el péptido maduro, y punto isoelectrico (PI) del péptido maduro.

RESULTADOS DEL TRANSCRIPTOMA						RESULTADOS DEL BLAST			
PÉPTIDO PUTATIVO	PRECURSOR		PÉPTIDO MADURO			ID DE LA SECUENCIA	DESCRIPCIÓN	ESPECIE	% IDENTIDAD
	LONG. (aa)	PM (Da)	LONG. (aa)	PI	PM (Da)				
TfpNaTxAlp01	84	9564.22	65	8.48	7325.36	ADY39581	U1-buthitoxin-Hj1b	<i>Hottentotta judaicus</i>	59.016
TfpNaTxAlp02	79	8689.89	60	4.79	6735.55	H1ZZH8	Precursor Toxin To9; AltName: T-alpha* NaTx3.8	<i>Tityus obscurus</i>	68.421
TfpNaTxAlp03	79	8739.01	60	5.11	6784.66	H1ZZH8	Precursor Toxin To9; AltName: T-alpha* NaTx3.8	<i>Tityus obscurus</i>	69.737
TfpNaTxAlp04	99	10805.56	66	7.71	7316.37	H1ZZI6	Precursor Toxin Tpa5; AltName: T-alpha* NaTx7.2	<i>Tityus pachyurus</i>	96.512
TfpNaTxAlp05	98	10962.72	65	8.17	7473.52	H1ZZI6	Precursor Toxin Tpa5; AltName: T-alpha* NaTx7.2	<i>Tityus pachyurus</i>	77.381
TfpNaTxAlp06	98	10861.57	65	8.45	7372.37	H1ZZI6	Precursor Toxin Tpa5; AltName: T-alpha* NaTx7.2	<i>Tityus pachyurus</i>	78.571
TfpNaTxAlp07	57	6269.42	24	8.97	2780.23	H1ZZI6	Precursor Toxin Tpa5; AltName: T-alpha* NaTx7.2	<i>Tityus pachyurus</i>	97.727
TfpNaTxAlp08	98	10875.6	65	8.45	7386.40	H1ZZI6	Precursor Toxin Tpa5; AltName: T-alpha* NaTx7.2	<i>Tityus pachyurus</i>	78.571
TfpNaTxAlp09	75	8277.45	64	6.25	7138.17	H1ZZI6	Precursor Toxin Tpa5; AltName: T-alpha* NaTx7.2	<i>Tityus pachyurus</i>	97.333
TfpNaTxAlp10	63	7131.05	NA	NA	NA	H1ZZI7	Precursor Toxin Tpa6; AltName: T-alpha* NaTx7.4	<i>Tityus pachyurus</i>	82.54
TfpNaTxAlp11	86	9697.11	67	8.13	7698.72	H1ZZI5.1	Precursor Toxin Tpa4; AltName: T-alpha* NaTx3.4	<i>Tityus pachyurus</i>	95.35
TfpNaTxAlp12	86	9564	67	8.78	7565.62	H1ZZI5.1	Precursor Toxin Tpa4; AltName: T-alpha* NaTx3.4	<i>Tityus pachyurus</i>	88.4
TfpNaTxAlp13	89	9839.62	72	8.44	8065.33	P63019.1	alpha-toxin Cn12	<i>Centruroides noxius</i>	57

Tabla 11. Alpha-NaTx putativas del veneno de *T. forcipula* y sus ortólogos con mayor porcentaje de identidad. Mediante los algoritmos BLAST-X y BLAST-N en el sitio de NCBI (BD nr de proteínas, Scorpiones taxid: 9855) se identificaron ortólogos con mayor porcentaje de identidad para cada toxina putativa. Las propiedades de las toxinas putativas se predijeron con Expassy (Expassy.org). Se han encerrado los precursores que presentaron mayor identidad con las toxinas secuenciadas por degradación de Edman.

Se presentan también las características principales de los ortólogos con mayor homología a cada uno de los precursores, así: ID de la secuencia, esto es, el número de acceso en la base de datos de proteínas de NCBI, la descripción del BLAST, la especie de escorpión para la

cual se hizo el reporte, y el porcentaje de identidad. Se muestran encerrados en recuadros, los precursores que presentaron mayor identidad con las toxinas secuenciadas por degradación de Edman.

La información se presenta organizada de la misma forma en las tablas 12 y 13, para las secuencias aminoacídicas y las propiedades de los 17 precursores clasificados como β -sodio toxinas y sus ortólogos con mayor porcentaje de identidad en la base nr de proteínas de NCBI, según los resultados del BLAST-P y el análisis mediante Expassy.

NOMBRE DEL PÉPTIDO	SECUENCIA DE AA PREDICHA
TfpNaTxBet01	<u>MNNVKLLIYYITVMNMINLAMMDRIETDWYPVNDVTGYYYLCHHKEEENRCMEICKRSDRGQNRNVNKGFLCTLTCYCFDA</u>
TfpNaTxBet02	<u>MNNVKLLIYYMNMINLAMMDRIETDWYPVNDVTGYYYLCHHKEEENRCMEICKRSDRGQNRNVNKGFLCTLTCYCFDA</u>
TfpNaTxBet03	<u>MKALILFISGFLIGVIVA</u> KEGYPMDEHGCKFSCFIRPAGFCDWYCKAHLDAGSGYCAWPACYCYGVPNDRKVDYATNKCCKG
TfpNaTxBet04	MIRFVLFI SCFFVIGKLSIHCIIFVWRIKHFEEQREEHFNFQLVSYFAGMVVECKEGYLLGPDGCKVS
TfpNaTxBet05	<u>MHYTFVCLFVLLTIISDA</u> GGTREGYILDRNHCKIKCLVLGANSMECTMCRGLGATAGYCNHWACFCVNLDDDEVKIFGDAVRCKY
TfpNaTxBet06	<u>MKALILFISGFLIGVIVA</u> KEGYPMDEHGCKFSCFIRPAGFCERYCKTNLSASTGYCAWPACYCYGVPNDRKVDYATNKCCKG
TfpNaTxBet07	<u>MKGLILFISGFLMIGVIVA</u> KEGYPMDEHGCKFSCFIRPAGFCDWYCKAHLDAGSGYCAWPACYCYGVPNDRKVDYATNKCCKG
TfpNaTxBet08	<u>MKALILFISGFLMIGVIVA</u> KEGYPMDEHGCKFSCFIRPAGFCERYCKTNLSASTGYCAWPACYCYGVPNDRKVDYATNKCCKG
TfpNaTxBet09	<u>MKGMILLISCLMLIEVVVE</u> CKEGYPLDTLNGCKVGCFFGSNSWCNDKCKSKAEKGYCAWPSCYCYGFTDDKNIWDLKKNKC
TfpNaTxBet10	<u>MVKSEMKLVI FSLFLLIGVES</u> LKNGYPVIEGGGSPDYGGSAECGSEDSNSADNFCNDICTNVGGKSGDCCLGSCFCFDLPDEQKTVEVMDRTKKY
TfpNaTxBet11	<u>MIRFVLFI SCFLIGMVVE</u> CKEGYLLGPDGCKVSCFIRPAGYCGSECSVLKGNKYCAWPACYCYSMPNWAKTWDSSKNRCGKCKG
TfpNaTxBet12	<u>MIRFVLFI SCFFVIGMVVE</u> CKEGYLLGPDGCKVSCFIRPAGYCGSECSVLKGNKYCAWPACYCYSMPNWAKTWDSSKNRCGKCKG
TfpNaTxBet13	<u>MKNLLAIVAMFSVFYVYVKGTEDGDGYPVNRWNCTYPCYGGDDVEKRLLCVKTGADYGYCHWYACYCENLPD NAKRIKEQGVFGCSQGW</u> <u>EVSTTTPKP</u>
TfpNaTxBet14	<u>MRSMPVPLFILITVLLKNANVE</u> SDVSGGFPVNSNNCIYPCYATPDEIQCEFLKLNIGRYCKRDACFCEHLPESVKQIHNTTFDCSNGPWL <u>STV</u>
TfpNaTxBet15	MDYEGCKLSCFIRPSGYCGRECALKKGSDGYCAWPACYCYKLPNNVKVWEYATNRCCKG
TfpNaTxBet16	<u>MKGILFI SCALIGVVE</u> CKGYLMDYEGCKLSCFIRPSGYCGRECALKKGSDGYCAWPACYCYKLPNNVKVWEYATNRCCKG
TfpNaTxBet17	<u>MKTLNFCLVFAISSITVCIFCLTDRFLKMEGKHVMCLYINKTFVDCKRLCKENMKASDGFRCRQPHCFCTDVPKEK</u>

Tabla 12. Secuencias de la β -NaTx putativas del veneno de *T. forcipula*. El ensamblaje *de novo* se hizo mediante el programa Trinity y el alineamiento de secuencias crudas contra el genoma *de novo*, con la herramienta HISAT2, en Galaxy. El péptido señal se predijo con SignalP y el corte del propéptido con SpiderP. El péptido señal se muestra subrayado y el péptido maduro en negrita.

La figura 21 muestra los alineamientos múltiples y los porcentajes de identidad de las secuencias primarias de las de las α -NaTx putativas de *T. forcipula* con similitud a toxinas

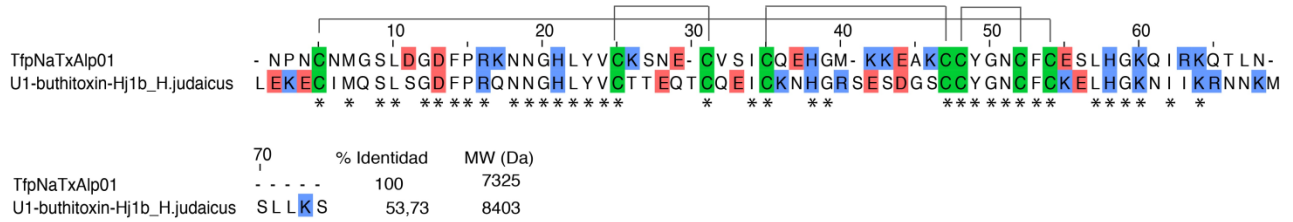
específicas para canales Na_v previamente reportadas, distribuidas en tres grupos (A, B y C), según similitud de los patrones altamente conservados de residuos Cys.

RESULTADOS DEL TRANSCRIPTOMA						RESULTADOS DEL BLAST			
PÉPTIDO PUTATIVO	PRECURSOR		PÉPTIDO MADURO			ID DE LA SECUENCIA	DESCRIPCIÓN	ESPECIE	% IDENTIDAD
	LONG. (aa)	PM (Da)	LONG. (aa)	PI	PM (Da)				
TfpNaTxBet01	81	9719.28	59	5.54	7102.97	ADT64283	sodium channel toxin 18, partial	<i>Mesobuthus eupeus</i>	41.935
TfpNaTxBet02	78	9405.89	59	5.54	7102.97	ADT64283	Precursor sodium channel toxin 18, partial	<i>Mesobuthus eupeus</i>	42.623
TfpNaTxBet03	83	9285.88	64	7.69	7285.28	C0HJM9	Toxin Tf2, Precursor	<i>Tityus fasciolatus</i>	84.848
TfpNaTxBet04	71	8376.97	NA	NA	NA	C9X4J8	Precursor Toxin TdNa7; AltName: PT-beta* NaTx13.8	<i>Tityus discrepans</i>	38.028
TfpNaTxBet05	84	9363.98	66	7.71	7295.46	E7BLC7	Toxin Acra3; Precursor	<i>Androctonus crassicauda</i>	36.486
TfpNaTxBet06	83	9292.91	64	8.45	7292.31	H1ZZI1	Precursor Toxin To12; AltName: T-beta* NaTx5.5	<i>Tityus obscurus</i>	87.879
TfpNaTxBet07	84	9418.06	65	8.16	7413.45	H1ZZI1	Precursor Toxin To12; AltName: T-beta* NaTx5.5	<i>Tityus obscurus</i>	80.952
TfpNaTxBet08	83	9310.94	64	8.45	7292.31	H1ZZI1	Precursor Toxin To12; AltName: T-beta* NaTx5.5	<i>Tityus obscurus</i>	86.747
TfpNaTxBet09	82	9311.01	62	8.64	7091.10	H1ZZI8	Precursor Toxin Tpa7; AltName: T-beta* NaTx1.3	<i>Tityus pachyurus</i>	93.506
TfpNaTxBet10	101	10887.3	79	4.08	8408.18	H1ZZI9	Precursor Toxin Tpa8; AltName: T NaTx9.1	<i>Tityus pachyurus</i>	98.02
TfpNaTxBet11	85	9441.21	65	8.98	7125.23	Q2NME3	Precursor Beta-toxin Tz1; AltName: PT-beta NaTx14.1	<i>Tityus zulianus</i>	74.39
TfpNaTxBet12	85	9461.2	65	8.98	7125.23	Q2NME3	Precursor Beta-toxin Tz1; AltName: PT-beta NaTx14.1	<i>Tityus zulianus</i>	74.39
TfpNaTxBet13	101	11643.26	81	4.90	9367.42	XP_023209523	toxin Acra I-2-like	<i>Centruroides sculpturatus</i>	47.475
TfpNaTxBet14	99	11049.66	75	4.78	8422.42	XP_023209523	toxin Acra I-2-like	<i>Centruroides sculpturatus</i>	54.545
TfpNaTxBet15	58	6601.64	NA	NA	NA	PODMM8	Precursor Beta-mammal Tt1g; AltName: T.trivittatus toxin 1	<i>Tityus trivittatus</i>	87.654
TfpNaTxBet16	82	9196.89	63	8.65	7192.32	PODMM8	Precursor Beta-mammal Tt1g; AltName: T.trivittatus toxin 1	<i>Tityus trivittatus</i>	87.952
TfpNaTxBet17	76	8836.67	54	8.84	6387.59	AGT39262	Meutoxin-1 precursor	<i>Mesobuthus eupeus</i>	49.333

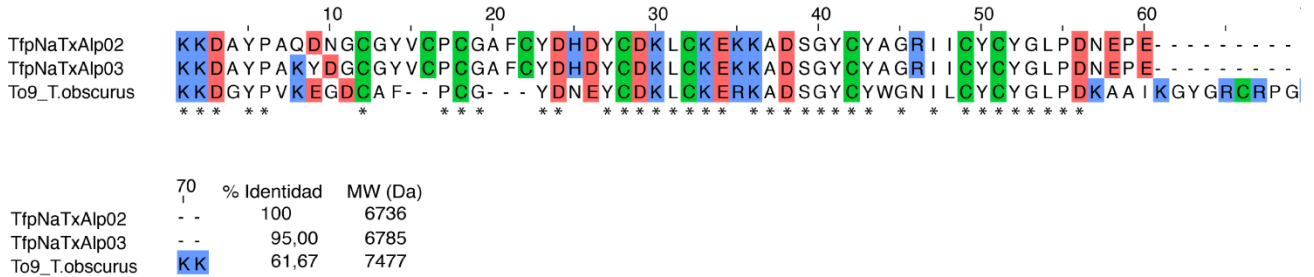
Tabla 13. Lista de β -NaTx putativas del veneno de *T. forcipula* y sus ortólogos con mayor porcentaje de identidad. Mediante los algoritmos BLASTX y BLASTN, en el sitio de NCBI (BD nr de proteínas, Scorpiones taxid: 9855), se identificaron ortólogos con mayor porcentaje de identidad para cada toxina putativa. Las propiedades de las toxinas putativas se predijeron con Expassy (Expassy.org). Se han encerrado los precursores que presentaron mayor identidad con las toxinas secuenciadas por degradación de Edman.

De la misma forma, en la figura 22 se muestran los alineamientos múltiples y porcentajes de identidad de las β -NaTx putativas de *T. forcipula* con similitud a toxinas específicas para canales Na_v previamente reportadas, distribuidas en cinco grupos (A hasta E), según los patrones altamente conservados de residuos Cys. Se muestran encerrados en recuadros, los precursores que presentaron mayor identidad con las toxinas secuenciadas por degradación de Edman.

A)



B)



C)

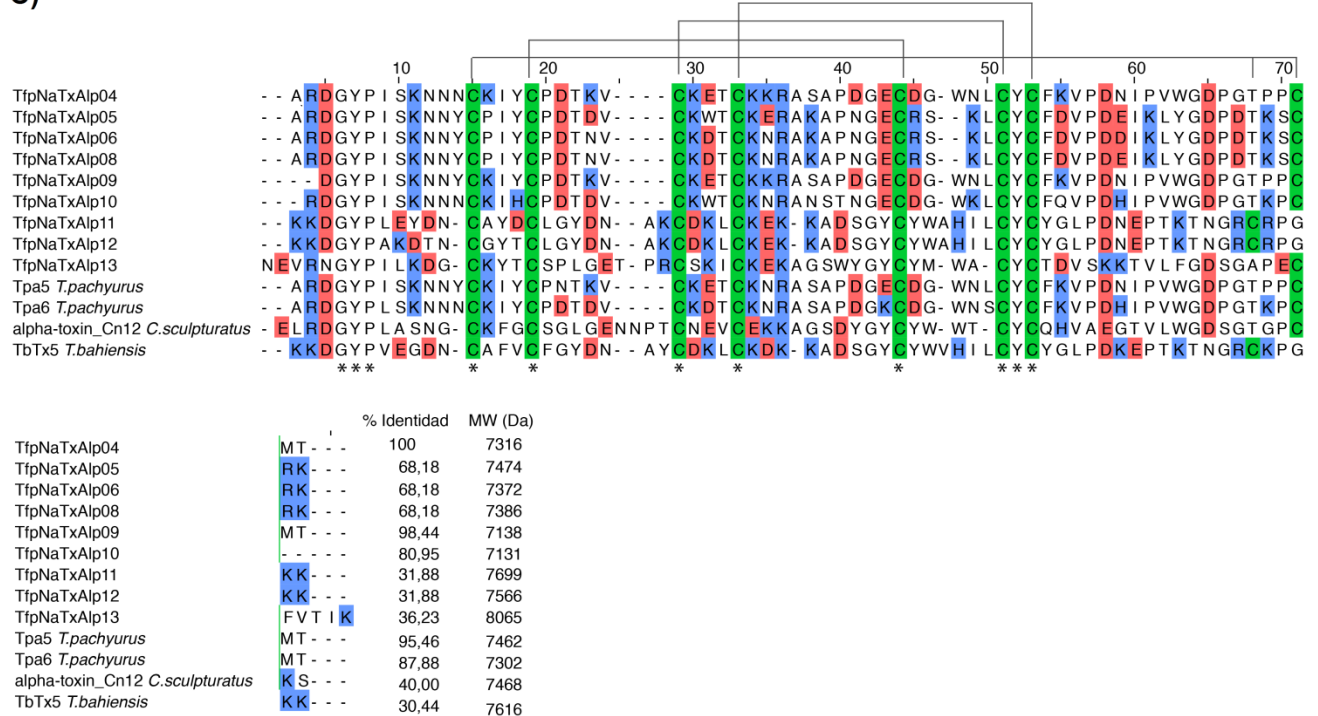
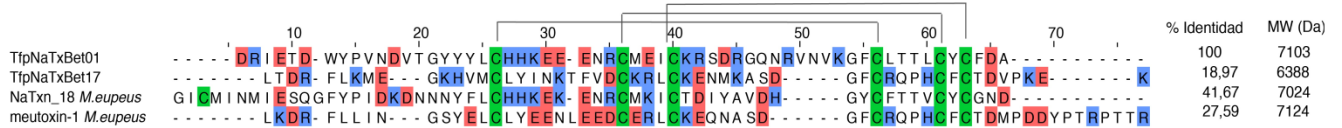
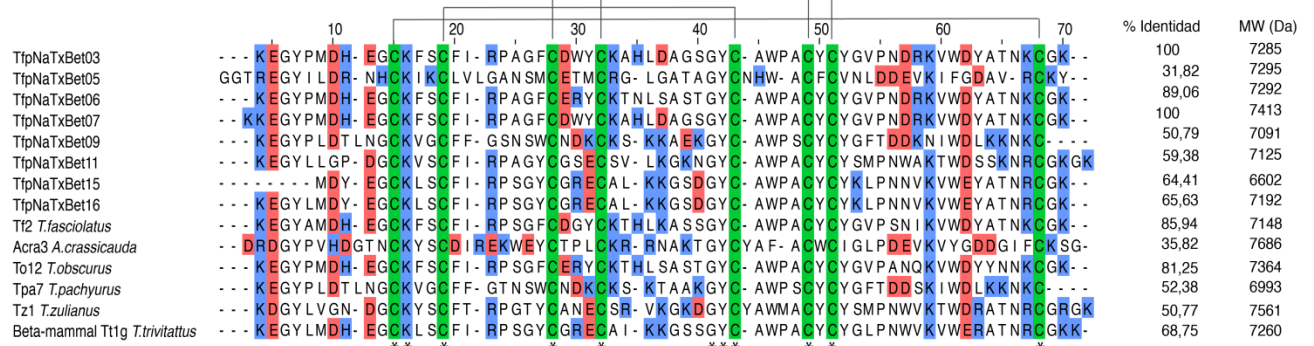


Figura 21. Alpha-Toxinas específicas para canales de sodio. Alineamiento múltiple de secuencias de péptidos putativos de *T. forcipula* con similitud a toxinas específicas para canales Na_v , previamente reportadas. A) Precursor TfpNaTxAlp01; U1-buthitoxina-Hj1b de *H. judaicus*. B) Precursores TfpNaTxAlp02 y TfpNaTxAlp03; To9_ *T. obscurus*. C) Precursores TfpNaTxAlp04, TfpNaTxAlp05, TfpNaTxAlp06, TfpNaTxAlp08, TfpNaTxAlp09, TfpNaTxAlp10, TfpNaTxAlp11, TfpNaTxAlp12 y TfpNaTxAlp13; Tpa5 y Tpa6 de *T. pachyurus*; alpha-toxin_Cn12 *C. sculpturatus*; TbTx5 de *T. bahiensis*. Las alpha-NaTxS putativas agrupadas en A, B y C, así como las secuencias similares correspondientes, difieren en el patrón de los residuos altamente conservados de Cys. En verde se resaltan los residuos de Cys. En azul se resaltan los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos.

A)



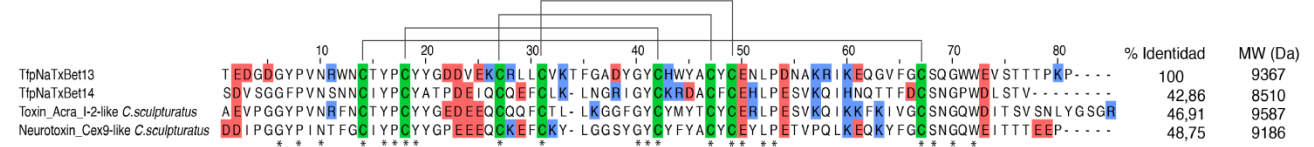
B)



C)



D)



E)

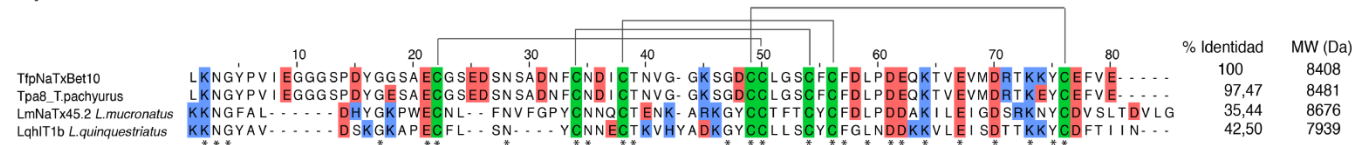


Figura 22. Beta-Toxinas específicas para canales de sodio. Alineamiento múltiple de secuencias de péptidos putativos de *T. forcipula* con alta similitud a toxinas específicas para canales Nav, previamente reportadas. A) Precursor TfpNaTxBet01; TfpNaTxBet17; NaTxn_18 y neutotoxin-1 de *M. eupeus*. B) Precusores TfpNaTxBet03, TfpNaTxBet05, TfpNaTxBet06, TfpNaTxBet07, TfpNaTxBet09, TfpNaTxBet11; TfpNaTxBet15; TfpNaTxBet16; Tf2 de *T. fasciolatus*; Acr3 de *A. crassicauda*; To12 de *T. obscurus*; Tpa7 de *T. pachyurus*; Tz1 de *T. zulianus*. C) Precursor TfpNaTxBet04; TdNa7 de *T. discrepans*; To8 de *T. obscurus*. D) Precusores TfpNaTxBet13, TfpNaTxBet14; Toxin_Acra_1-22-like de *C. sculpturatus*; neurotoxin_Ce9-like de *C. sculpturatus*. E) Precursor TfpNaTxBet10; Tpa8 de *T. pachyurus*; LmNaTx45.2 de *L. mucronatus*; LqhiT1b de *L. quinquestriatus*. Las alpha-NaTxs putativas agrupadas en A, B y C, con las secuencias similares correspondientes, difieren en el patrón de los residuos altamente conservados de Cys. En verde se resaltan los residuos de Cys. En azul se resaltan los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos.

6.2.4.2 Toxinas específicas para canales de potasio

Para efectos de este análisis, los 20 transcritos que codifican péptidos putativos específicamente activos sobre canales K_v , se nombraron con el nombre trivial TfpKTx, seguido de una etiqueta de familia o grupo asignada según la identidad en el resultado del BLAST (Alp para α , Bet para β y Eps para ϵ), y un número de secuencia según el orden de salida del BLAST.

PÉPTIDO PUTATIVO	SECUENCIA DE AA PREDICHA
TfpKTxAlp01	<u>MKLLFTLLLLGFIQAMINLAAAS</u> NGVSGKCNSPGGCSNYCRDNSNAMGHCKKSKCYCSKYSQTRLISLPLNITLQLLQKFLSPANPRN
TfpKTxAlp02	<u>MKLLFTLLLLGFIQAMINLTVAS</u> TGVTGKCNTPGGCSNYCRDNSNAMGHCKKSKCYCSKYSQTRLISLPLNITLQLLQKFLSPANPRN
TfpKTxAlp03	<u>MKVFCGILLIFTLCSMIYLSE</u> QCSTCLDIVCGASRECYDPCYKAFGRAHGKCMNNRCRCYT
TfpKTxAlp04	<u>MHFSGIVFILISMTLIDSFEMKVEAT</u> GPQTVCEASICEAACKQMGKSMESCQGDACKCKA
TfpKTxAlp05	<u>MKVVVYVILMVFILCSMIDLSQQ</u> TVINVKCRTSPQCLQPCKEAFGKARGKCMNGKCKCY
TfpKTxAlp06	<u>MKVVVYVILMVFILCSMIDLSQQ</u> GFILYKCKVTSDCLPACKKATGIGQGKCSFHCLCLP
TfpKTxAlp07	<u>MKVVVYVILMVFILCSMIDLSQQ</u> VFIDYKCSVSKECWSACKAAVGTDRGKCMGGKCKCYPT
TfpKTxAlp08	<u>MKVFGILVIFILCSIFNLSQEVII</u> GQRCYRAPDCFSCKIAVGKPTGKCTNGRCDC
TfpKTxAlp09	<u>MKAIFYGVLMIFILCSMCYIPVDS</u> QKDLVDKICITGDDCLQPCIDAIGSTKSKCINDKCTCYP
TfpKTxAlp10	<u>MKAIFYGVLMIFILCSMCYIPVDS</u> QITINVKCTGSHQCRKPCIDRHNTSGSKCINGKCNCP
TfpKTxAlp11	<u>MKAIFYGVLMIFILCSMCYIPVDS</u> QFTLVNKCSTGSHQCRK
TfpKTxAlp12	<u>MKAIFYGVLMIFILCSMCYILVDS</u> QVTLVDKCNLSHQCRQPCINQGTAGSKCMNGKCKCYP
TfpKTxAlp13	<u>MKVVVYVILVVFILCSMIDLSQQ</u> TVINVKCKTSPQCLQPCKEAFG
TfpKTxAlp14	MIDLSQQTVINVKCRTSPQCLQPCKEAFGKARGKCMNGKCKCY
TfpKTxAlp15	<u>MKVVVYVILVVFILCSMIDLSQQ</u> TVINVKCRTSPQCLQPCKEAFG
TfpKTxBet01	<u>MSVRPRSNKRDGRPNSTLFSVG</u> SEMVAATNRSCVFALLVALLIHLAEAGKGKEILGKIKDKIVEVKEKVKAGWDKLTSSSEYACPVIEKFCEDHCAA KKALGKCEDTKCQCVKL
TfpKTxBet02	<u>MERKLALLLLGMITLASC</u> GLREKHVQKLVALIPNDQLRAILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCMNHCQDIERHDGLCHGFKCKCEKS
TfpKtxEps01	<u>MKLSCGFLVLLVLTVMIA</u> TFSEVEAECSGCRHLCKGRGRCVNNKCTCRSGRSDFNEDFEKYQ
TfpKtxEps02	<u>MKLSCGFLVLLVLTVMIA</u> TFSEVEAACGSCRKKCKGSGKCINGRCKCYGRSDFNEAFEKYQ
TfpKtxEps03	<u>MKLSCGFLVLLVLTVMIA</u> TFSEVEAACG

Tabla 14. Secuencias de las KTx putativas del veneno de *T. forcipula*. El ensamblaje *de novo* se hizo mediante el programa Trinity y el alineamiento de secuencias crudas contra el genoma *de novo*, con la herramienta HISAT2, en Galaxy. El péptido señal se predijo con SignalP y el corte del propéptido con SpiderP. El péptido señal se muestra subrayado y el péptido maduro en negrita.

En la tabla 14 se presentan las secuencias de los precursores (pro-péptidos) de las KTx putativas identificadas en la glándula del veneno de *T. forcipula*. El péptido señal se muestra subrayado y el péptido maduro destacado en negrita, según la predicción realizada con SignalP. De los 20 transcritos identificados, 15 presentan alta similitud con péptidos

previamente reportadas como α -KTx, dos son similares a β -KTx y tres presentan similitud con un grupo de KTx que se ha denominado ε -toxinas.

RESULTADOS DEL TRANSCRIPTOMA						RESULTADOS DEL BLAST			
PÉPTIDO PUTATIVO	PRECURSOR		PÉPTIDO MADURO			ID DE LA SECUENCIA	DESCRIPCIÓN	ESPECIE	% IDENTIDAD
	LONG. (aa)	PM (Da)	LONG. (aa)	PI	PM (Da)				
TfpKTxAlp01	90	9827.59	67	9.54	7326.38	AMX81439	potassium channel toxin meuK1	<i>Mesobuthus eupeus</i>	55,26
TfpKTxAlp02	90	9900.73	67	9.54	7341.43	AMX81439	potassium channel toxin meuK1	<i>Mesobuthus eupeus</i>	52,00
TfpKTxAlp03	61	6935.26	41	8.23	4657.34	P0C168	Potassium channel toxin alpha-KTx 12.2	<i>Tityus trivittatus</i>	89,19
TfpKTxAlp04	61	6586.77	35	5.92	3598.16	P0C1X6	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 18.3	<i>Tityus discrepans</i>	59,02
TfpKTxAlp05	59	6714.23	37	9.42	4157.99	P0DPT4	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 4.7	<i>Tityus stigmurus</i>	72,41
TfpKTxAlp06	59	6504.06	37	8.89	3947.82	P0DPT4	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 4.7	<i>Tityus stigmurus</i>	54,24
TfpKTxAlp07	60	6681.11	38	8.85	4124.87	P0DPT4	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 4.7	<i>Tityus stigmurus</i>	64,41
TfpKTxAlp08	57	6311.56	31	8.92	3368.90	P56219	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 4.2	<i>Tityus serrulatus</i>	80,70
TfpKTxAlp09	61	6764.06	38	4.78	4136.77	P84777	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 15.6	<i>Tityus discrepans</i>	60,66
TfpKTxAlp10	61	6836.14	38	9.13	4208.85	P84777	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 15.6	<i>Tityus discrepans</i>	73,77
TfpKTxAlp11	39	4463.41	16	9.50	1836.12	P84777	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 15.6	<i>Tityus discrepans</i>	74,36
TfpKTxAlp12	61	6746.07	38	8.90	4102.74	P84777	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 15.6	<i>Tityus discrepans</i>	62,30
TfpKTxAlp13	44	4919.02	22	8.63	2394.85	Q5G8B6	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 4.5	<i>Tityus costatus</i>	63,64
TfpKTxAlp14	44	4973.93	NA	NA	NA	Q5G8B6	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 4.5	<i>Tityus costatus</i>	77,27
TfpKTxAlp15	44	4947.04	22	8.65	2422.86	Q5G8B6	Precursor potassium channel toxin alpha-KTx 4.5	<i>Tityus costatus</i>	65,91
TfpKTxBet01	116	12682.92	66	8.76	7287.61	Q0GY43	Precursor potassium channel toxin TdiKIK	<i>Tityus discrepans</i>	86,52
TfpKTxBet02	87	9779.7	68	8.83	7708.03	Q0GY44	Precursor potassium channel toxin Tdi-beta-KTx	<i>Tityus discrepans</i>	89,66
TfpKtxEps01	63	7084.26	37	8.67	4287.78	P0C175	Precursor potassium channel toxin epsilon-KTx1.2	<i>Tityus serrulatus</i>	60,87
TfpKtxEps02	62	6837.13	36	9.24	4026.63	P0C175	Precursor potassium channel toxin epsilon-KTx1.2	<i>Tityus serrulatus</i>	60,29
TfpKtxEps03	29	3045.76	NA	NA	NA	P0C175	Precursor potassium channel toxin epsilon-KTx1.2	<i>Tityus serrulatus</i>	76,92

Tabla 15. Lista de KTx putativas del veneno de *T. forcipula* y sus ortólogos con mayor porcentaje de identidad. Mediante los algoritmos BLASTX y BLASTN, en el sitio de NCBI (BD nr de proteínas, Scorpiones taxid: 9855), se identificaron ortólogos con mayor porcentaje de identidad para cada toxina putativa. Las propiedades de las toxinas putativas se predijeron con Expassy (Expassy.org). Se han encerrado los precursores que presentaron mayor identidad con la KTx secuenciadas por degradación de Edman.

La tabla 15 resume las principales características de los precursores y los péptidos maduros de las KTx putativas según los resultados del BLASTX y el BLASTN ($e\text{-value} < 10^{-5}$), y el análisis mediante Expassy, de la siguiente forma: Longitud (número de aminoácidos) y peso molecular (pm, Da) tanto para el precursor como para el péptido maduro, punto isoeléctrico (PI) del péptido maduro. Se presentan también las características principales de los ortólogos con mayor homología a cada uno de los precursores, así: ID de la secuencia, esto es, el número de acceso en la base de datos de proteínas de NCBI, la descripción del BLAST, la especie de escorpión para la cual se hizo el reporte, y el porcentaje de identidad. Se muestra encerrado en un recuadro el precursor TfpAlpKTx04, que presentó 100% de identidad con una de las toxinas aisladas del veneno y secuenciadas por degradación de Edman. Este precursor presenta 60% de homología con la KTx AlpKTx18.3 previamente reportada para el búfido venezolano *T. discrepans*.

La figura 23 muestra los alineamientos múltiples y los porcentajes de identidad de las secuencias primarias de las α -KTx putativas de *T. forcipula* con similitud a toxinas específicas para canales K_V previamente reportadas, distribuidas en dos grupos (A y B), según patrones altamente conservados de residuos Cys. Similarmente, la figura 24 muestra los alineamientos múltiples y porcentajes de identidad de las ε -KTx putativas de *T. forcipula*, agrupadas en un único clúster.

6.2.4.3 Otros componentes del veneno

La mayor parte de los precursores del veneno de *T. forcipula* encontrados en este estudio se identificaron como componentes no neurotóxicos, de los cuales 130 son homólogos con enzimas, que presentaron mayor porcentaje de identidad con diversas metaloproteasas. Se encontraron entre los más abundantes, precursores con alta identidad con metaloserrulasas previamente reportadas como componentes putativos del veneno de *T. serrulatus*, y metaloproteasas tipo antareasa, con alto grado de identidad con proteínas reportadas para *C. sculpturatus*, *T. trivittatus* y *T. pachyurus*.

También se encontraron precursores putativos de otros tipos de enzimas como proteasas tipo ECA (enzima convertidora de angiotensina), proteínas convertidoras de endotelina, metionina aminopeptidasas, carboxipeptidasa E, serina proteasas, aspártico proteasa, hialuronidasa y fosfolipasas tipo 2 (PLA2).

Otros componentes putativos incluyeron péptidos antimicrobianos (PAM), inhibidores de Ser-proteasa y péptidos ricos en cisteína. Finalmente, se encontraron precursores con identidad a péptidos de unión a factores de crecimiento tipo insulínico (IGFBPs), alérgenos y precursores con identidad a proteínas diversas de bñtidos del Viejo Mundo. En el material suplementario se presenta la lista completa de las enzimas putativas y otros componentes del veneno de *T. forcipula*, con las correspondientes secuencias aminoacídicas, la descripción del análisis BLAST, los ortólogos y sus números de acceso.

6.2.5 Determinación de la identidad de los péptidos secuenciados con los precursores putativos del veneno de *T. forcipula* y modelamiento mediante homología de la estructura terciaria de péptidos secuenciados

Como ya se mencionó, seis péptidos aislados del veneno de *T. forcipula* se secuenciaron total o parcialmente, resultados que se muestran y analizan en detalle en la sección siguiente. Las secuencias obtenidas se alinearon mediante el algoritmo BLAST-P de Geneious, contra una base de datos creada localmente con los componentes putativos del transcriptoma del veneno, buscando establecer las mejores correspondencias entre las toxinas aisladas y secuenciadas (análisis del proteoma), y los péptidos putativos encontrados (análisis del transcriptoma). Los péptidos secuenciados se identificaron con un nombre trivial compuesto del número de la fracción de la cual se aislaron, y el tiempo de retención (tr, en min). En la tabla 16 se presentan los resultados del BLAST-P. Junto al nombre trivial de la toxina secuenciada y su pm (Da), se incluye el correspondiente péptido putativo, con la longitud del péptido precursor (número de aminoácidos), su pm (Da) y el porcentaje de identidad.

Péptido lanzado (Blast Query)	PM (Da)	Péptido putativo (BLAST Hit)	Longitud precursor (# aa)	PM del precursor (Da)	Sitios idénticos %	Bit- Score	e-value	Identidad %	Query start	Query end	Query cover %	Hit start	Hit end
Frac_25(tr 35.61)	3591	TfpKTxnAlp04	61	6586.77	100.0	72.02	1.32e-23	100.0	1	35	100.0	27	61
Frac_37(tr 42.29)	6932	TfpNaxnBet11	85	9441.21	91.3	44.28	6.18E-11	68.6	1	23	95.83	21	43
Frac_37(tr 42.29)	6932	TfpNaxnBet12	85	9461.2	91.3	44.28	2.87e-12	68.6	1	23	95.83	21	43
Frac_39(tr 43.29)	7082	TfpNaTxnBet09	82	9311.01	90.2	78.57	2.00e-25	93.8	1	41	97.62	21	61
Frac_32(tr 40.08)	7296	TfpNaTxAlp6	98	1081.57	84.0	53.53	1.36e-15	67.0	1	31	100.0	34	64
Frac_32(tr 40.08)	7296	TfpNaTxAlp8	98	10875.6	84.0	53.53	1.36e-15	67.0	1	31	100.0	34	64
Frac_33(tr 40.81)	7313	TfpNaTxnAlp02	79	8689.89	68.8	26.56	2.35e-05	40.1	1	16	61.54	20	35
Frac_36(tr42.01)	7357	TfpNaTxnAlp11	47	9697.11	85.1	82.42	7.84e-27	91.5	1	47	97.92	20	66

Tabla 16. Péptidos secuenciados por degradación de Edman y los correspondientes precursores putativos según los resultados del BLAST-P con Geneious. Se resalta en gris el péptido completamente secuenciado Frac_25(tr35.61), pm 3591 Da, que presenta 100% de sitios idénticos y 100% de similitud con el transcrito TfpKTxnAlp04. También se resalta el péptido más tóxico en mamífero, Frac_36(tr42.01), pm 7357 Da, que presenta 85% de sitios idénticos y 91.5% de similitud con el transcrito TfpNaTxnAlp11. Las secuencias aminoacídicas de los péptidos putativos se presentan en las tablas 10, 12 y 14, en tanto que las secuencias obtenidas por degradación de Edman se presentan en la tabla 21.

En la tabla 16 se destacan con sombreado las toxinas secuenciadas Frac_25(tr 35.61) y Frac_36(tr 42.01), que presentaron los mayores porcentajes de identidad en este análisis. La toxina secuenciada Frac_25(tr35.61) con pm de 3591 Da según la determinación por ESI-MS, presentó en el BLAST 100% de identidad con el péptido maduro de la α -potasio toxina putativa TfpKTxAlp04. En las figuras 25 y 26 se muestra el alineamiento múltiple de la toxina Frac_25 (tr35.61) con el péptido putativo TfpKTxAlp04 identificado en el transcriptoma de *T. forcipula* y con los ortólogos del péptido secuenciado.

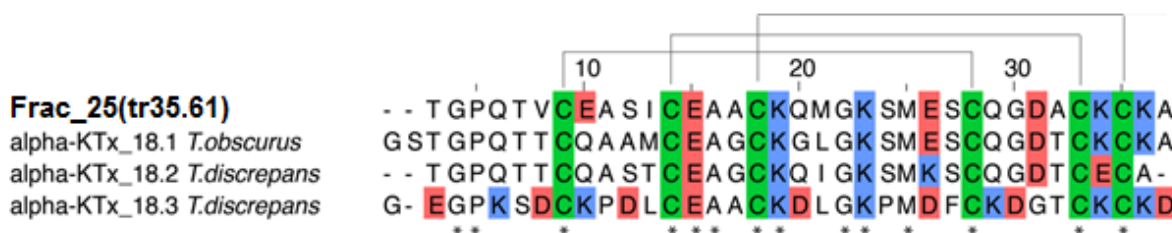


Figura 25. Toxina Frac_25(tr35.61) específica para canales de potasio, secuenciada mediante degradación de Edman. Alineamiento múltiple de secuencias entre el péptido Frac_25(tr35.61), secuenciado mediante degradación automatizada de Edman, con alta similitud a toxinas específicas para canales Kv previamente reportadas. Frac_25(tr35.61); alpha-KTx_18.1 de *T. obscurus*; alpha-KTx_18.2 de *T. discrepans*; alpha-KTx_18.3 de *T. discrepans*. Se omite el péptido señal. En verde se resaltan los residuos de cisteína. En azul se resaltan los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos. También se indican los puentes S-S.

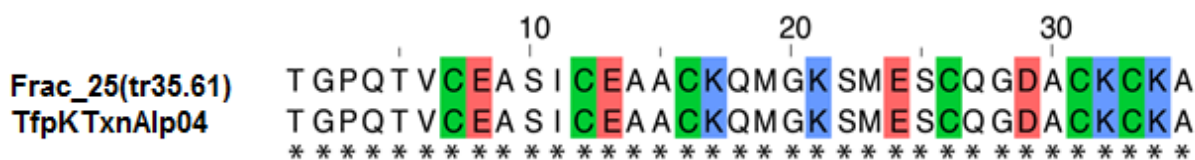


Figura 26. Toxina Frac_25(tr35.61) específica para canales de potasio, secuenciada mediante degradación de Edman. Alineamiento de la secuencia del péptido Frac_25(tr35.61), secuenciado mediante degradación automatizada de Edman, y la toxina putativa TfpKTxnAlp04 del transcriptoma de *T. forcipula*, mostrando que hay 100% de identidad entre las secuencias de los péptidos maduros. Se omite el péptido señal de la toxina putativa. En verde se resaltan los residuos de cisteína. En azul se resaltan los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos.

La figura 27 muestra el modelamiento de la toxina Frac_25 (tr35.61), por homología con la toxina alpha-KTx 18.1 (PDB: 2JP6), usada como molde por su mayor porcentaje de similitud entre las estructuras depositadas en el PDB.

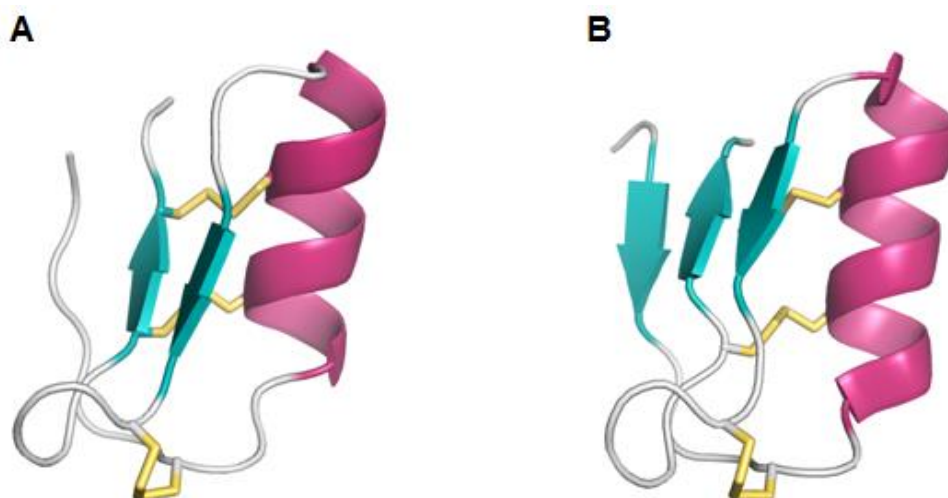


Figura 27. Modelamiento por homología de la estructura terciaria de Frac_25(tr35.61), probable KScTx secuenciada mediante degradación de Edman. A) Estructura 3D de Frac_25 (tr35.61) y B) Estructura 3D de la toxina alpha-KTx 18.1 (PDB: 2JP6), usada como modelo. En amarillo se indican los puentes disulfuro.

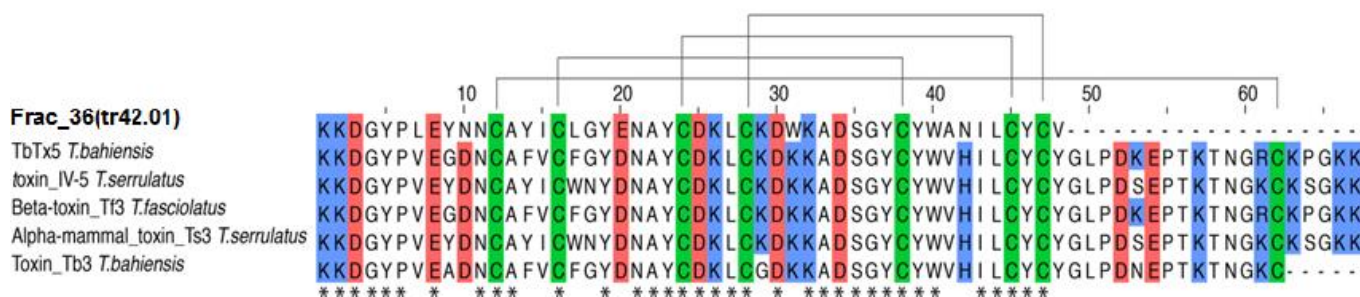


Figura 28. Toxina Frac_36(tr42.01) con pm de 7357 Da secuenciada mediante degradación de Edman. Alineamiento múltiple de secuencias entre el péptido Frac_36 (tr42.01), secuenciado mediante degradación automatizada de Edman, con alta similitud a toxinas específicas para canales Na_v previamente reportadas. En ensayos de toxicidad en ratón, Frac_36 (tr42.01) mostró la máxima letalidad.

La toxina secuenciada Frac_36 (tr 42.01), también destacada con sombreado en la tabla 16, mostró ser el componente más letal del veneno de *T. forcipula* en los ensayos de toxicidad en ratón. En el análisis BLAST, la secuencia obtenida para Frac_36 (tr 42.01) mostró 91.5% de

identidad con el péptido maduro de la α -sodio toxina putativa TfpNaTxAlp11. La figura 28 muestra el alineamiento múltiple de Frac_36(tr42.01) con el péptido putativo TfpNaTxAlp11 identificado en el transcriptoma de *T. forcipula*, y con los ortólogos del péptido putativo.

La figura 29 muestra el modelamiento de la toxina Frac_36(tr42.01) por homología con la toxina Ts3 de *T. serrulatus* (PDB: 5CY0) que se ha usado como molde.

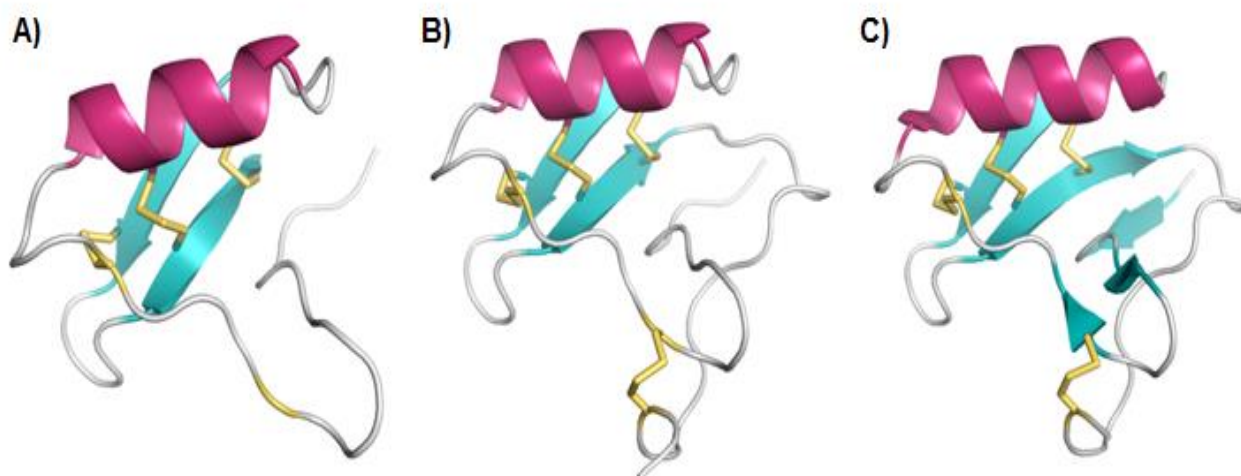


Figura 29. Modelamiento por homología de la estructura terciaria de la toxina Frac_36(tr42.01), pm 7357 Da, secuenciada mediante degradación de Edman. Esta toxina mostró la máxima letalidad en los ensayos de toxicidad en ratón. A) Estructura 3D del fragmento secuenciado B) Estructura 3D del péptido putativo TfpNaTxAlp21, que presenta 85.1% de sitios idénticos con el fragmento secuenciado. C) Estructura 3D de la toxina Ts3 de *T. serrulatus* (PDB: 5CY0) usada como modelo. En amarillo se indican los puentes disulfuro. Modelamiento realizado con la interface Modeller en Chimera. Estadísticos del modelo A: E-value=4.079e-22, 81.2%de identidad, GA341=1, zDOPE= -0.67, RMSD=1.

La toxina secuenciada Frac_39(tr43.29), pm de 7082 Da, afectó de forma aguda el control motor central en ratón. Se secuenció parcialmente y la secuencia presentó alta homología con el péptido maduro de la β -sodio toxina putativa TfpNaTxBet09.

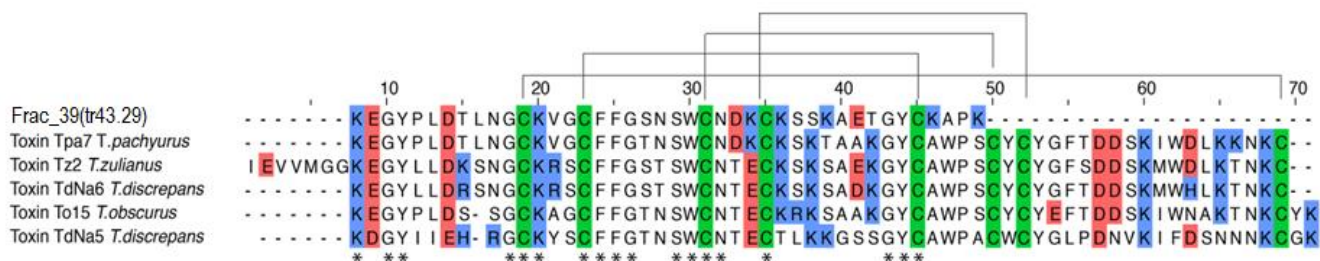


Figura 30. Toxina específica para canales de sodio parcialmente secuenciada. Alineamiento múltiple de secuencias entre el péptido Frac_39(tr43.29), pm 7296 Da, parcialmente secuenciado mediante degradación automatizada de Edman, con alta similitud a toxinas específicas para canales Nav previamente reportadas. Frac_39(tr43.29); Tpa5 de *T. pachyurus*; Tpa6 de *T. pachyurus*; Toxina To6 de *T. obscurus*; Toxina TdNa10 de *T. discrepans*; Precursor de neurotoxina Na9 de *T. discrepans*. Se omite el péptido señal que no se conoce para la toxina secuenciada. En verde se resaltan los residuos de cisteína. En azul se resaltan los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos.

En la figura 30 se presentan los resultados del alineamiento múltiple de Frac_39(tr43.29), con sus ortólogos. La figura 31 muestra el modelamiento de la toxina por homología con la toxina Ts1 de *T. serrulatus* (PDB: 1B7D) usada como modelo.

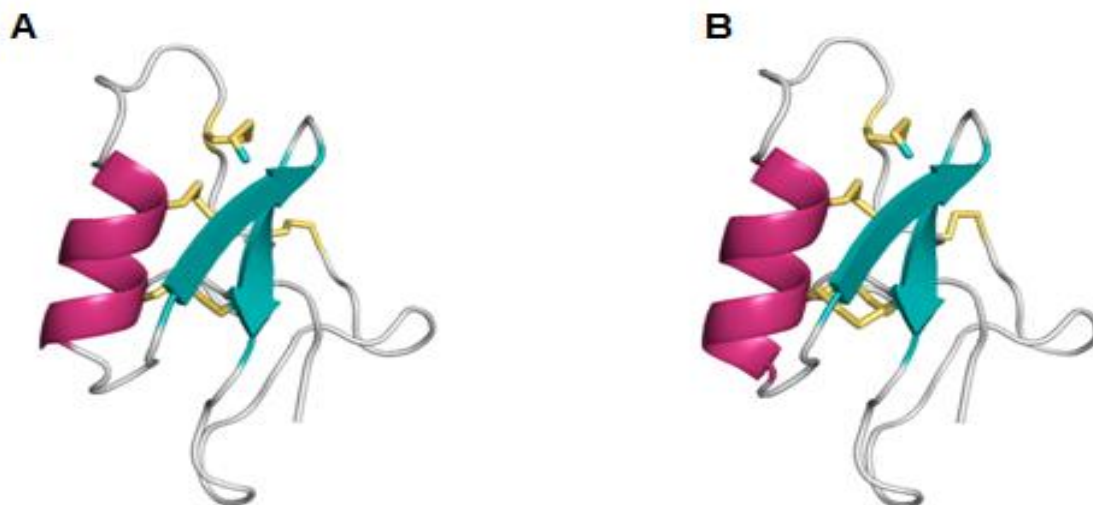


Figura 31. Modelamiento por homología de la estructura terciaria de la toxina Frac_39(tr43.29), pm 7082 Da, parcialmente secuenciada mediante degradación de Edman. A) Estructura 3D de Frac_39(tr43.29) y B) Estructura 3D de la toxina Ts1 de *T. serrulatus* (PDB: 1B7D) usada como modelo. En amarillo se indican los puentes disulfuro. Modelamiento realizado con la interface Modeller en Chimera. Estadísticos del modelo: E-value=3.24e-15, 49.2% de identidad, GA341=1, zDOPE=-0.62, RMSD=2.605.

La toxina Frac_37 (tr42.29), pm 6932 Da, se secuenció parcialmente y la secuencia obtenida, alineó con los péptidos maduros de los dos precursores putativos de β -sodio toxinas

TfpKTxBet11 y TfpKTxBet12. La figura 32 muestra el alineamiento de Frac_37 (tr42.29) y sus ortólogos.

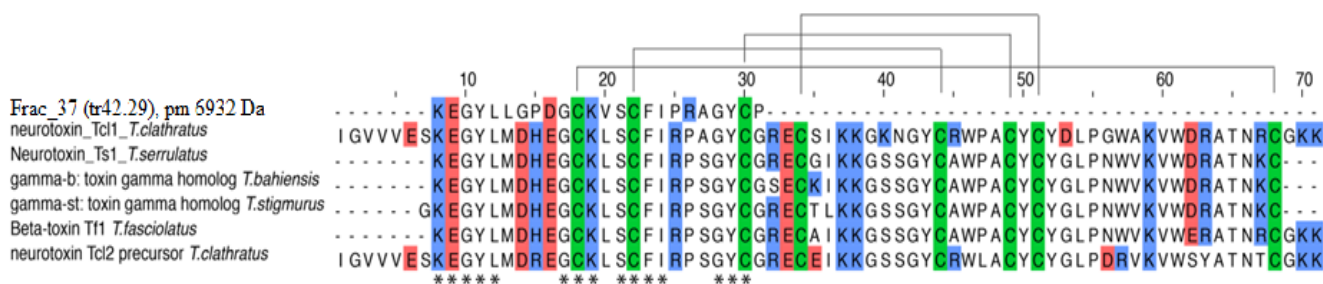


Figura 32. Toxina específica para canales de sodio parcialmente secuenciada. Alineamiento múltiple de secuencias entre el péptido Frac_37(tr42.29), pm 7313 Da, parcialmente secuenciado mediante degradación automatizada de Edman, con alta similitud a toxinas específicas para canales Nav previamente reportadas. Frac_37(tr42.29); Tc1 de *T. clathratus*; Ts1 de *T. serrulatus*; gamma toxina b de *T. bahiensis*; gamma toxina de *T. stigmurus*; beta toxina 11 de *T. fasciolatus*; precursor Tc2 de *T. clathratus*. Se omite el péptido señal que no se conoce para la toxina secuenciada. En verde se resaltan los residuos de cisteína. En azul se resaltan los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos.

Similarmente, la toxina secuenciada parcialmente Frac_32(tr40.08), con pm de 7296 Da, mostró mayor identidad con las toxinas putativas TfpNaTxAlp06 y TfpNaTxAlp08, y el alineamiento se muestra en la figura 33, donde se incluyen también los ortólogos.

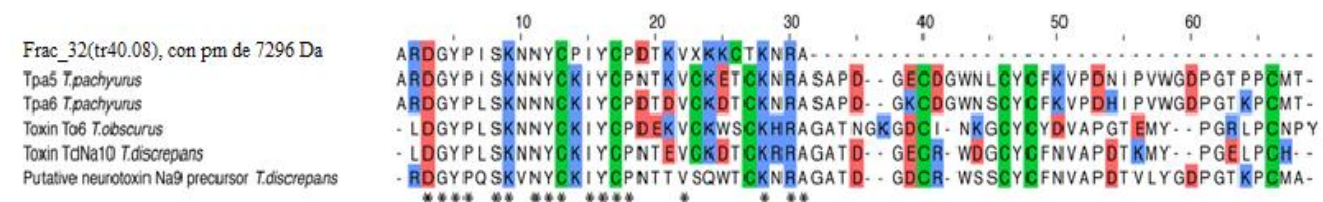


Figura 33. Toxina específica para canales de sodio parcialmente secuenciada. Alineamiento múltiple de secuencias entre el péptido Frac_32(tr40.08), pm 7296 Da, parcialmente secuenciado mediante degradación automatizada de Edman, con alta similitud a toxinas específicas para canales Nav previamente reportadas. Frac_32(tr40.08) pm 7296 Da; Tpa5 de *T. pachyurus*; Tpa6 de *T. pachyurus*; Toxina To6 de *T. obscurus*; Toxina TdNa10 de *T. discrepans*; Precursor de neurotoxina Na9 de *T. discrepans*. Se omite el péptido señal que no se conoce para la toxina secuenciada. En verde se resaltan los residuos de cisteína. En azul se resaltan los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos.

Finalmente, la toxina parcialmente secuenciada Frac_33(tr40.81), con pm de 7313.95 Da, presentó alta identidad con la α -toxina putativa TfpNaTxAlp02 y el alineamiento se muestra en la figura 34, donde se incluyen también los ortólogos.

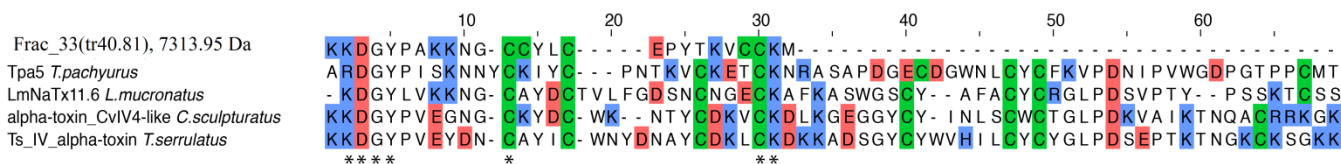


Figura 34. Toxina específica para canales de sodio parcialmente secuenciada. Alineamiento múltiple de secuencias entre el péptido Frac_33(tr40.81), con pm de 7313.95, parcialmente secuenciado mediante degradación automatizada de Edman, con alta similitud a toxinas específicas para canales Nav previamente reportadas. Frac_33(tr40.81), con pm de 7313.95; Tpa5 de *T. pachyurus*; LmNaTx11.6 de *L. mucronatus*; α -toxina_CvIV4-like de *C. sculpturatus*; Ts_IV_alpha-toxin de *T.serrulatus*. Se omite el péptido señal que no se conoce para la toxina secuenciada. En verde se resaltan los residuos de cisteína. En azul se resaltan los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos.

6.3 DISCUSIÓN

Los escorpiones son un grupo muy antiguo y bien adaptado a ambientes extremos, y un factor clave de su éxito adaptativo ha sido la habilidad de producir y liberar veneno. Las secuencias de ARNm que codifican todos los péptidos y proteínas del veneno se transcriben en las glándulas del telson, donde se almacena el veneno producido hasta su utilización. El análisis del transcriptoma ha permitido una mejor comprensión de los procesos biológicos de las glándulas del veneno, y de su diversidad, y ha facilitado la identificación de péptidos nuevos con actividad biológica (Abdel-Rahman et al., 2015). En este estudio se extrajo el ARN de la glándula “activa”, dos días después del desvenenamiento, enfoque que permite enriquecer los transcritos relacionados con el veneno (Abdel-Rahman et al., 2015; Rendón-Anaya et al., 2015), y se secuenció el transcriptoma mediante la plataforma Illumina, que hace parte de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS).

La mayoría de estudios del transcriptoma de la glándula productora del veneno de los escorpiones, reportados en la literatura, se ha realizado mediante el protocolo clásico de construcción de librerías de ADNc y secuenciación del ADN (Revisado en Rendón-Anaya et

al., 2015). La técnica de tamizaje de librerías de ADNc por métodos tradicionales, implica la transformación, mediante un vector, de colonias bacterianas que se amplifican mediante PCR de colonias, secuenciando aleatoriamente los genes. Los primeros reportes de librerías de ADNc de escorpión fueron tamizados mediante hibridación de colonias, con sondas de oligonucleótidos diseñadas a partir de secuencias peptídicas conocidas, de las toxinas maduras.

Otra estrategia es la secuenciación de clonas seleccionados de forma más o menos aleatoria, llamados ESTs (Expressed Sequence Tags), obtenidos a partir de colonias bacterianas transformadas (revisado en Rendón-Anaya *et al.*, 2015). Cebadores específicos de vectores flanqueantes se usan para la amplificación mediante PCR de colonias, y mediante electroforesis en gel se analizan los productos de PCR y se seleccionan las clonas a secuenciar. Con base en el tamaño del producto, se escogen grupos heterogéneos de colonias para purificar el vector y secuenciar el ADN clonado. Como no se usan cebadores específicos, los resultados corresponden con el rango de tamaño de ADNc seleccionado para la secuenciación (Rendón-Anaya *et al.*, 2015).

Recientemente se han empezado a utilizar las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) o de alto rendimiento (high through-output), que posibilitan la secuenciación masiva de las librerías de ADNc, creando fragmentos de ADNc a partir del ARNm. Los fragmentos se secuencian a partir de adaptadores, generando gran cantidad de “reads” cortos (300-700 nt de longitud, dependiendo de la plataforma utilizada), que se alinean con un genoma de referencia, o con un genoma ensamblado *de novo* cuando no se dispone del genoma de referencia, para producir un mapa con todos los transcritos y sus

frecuencias de expresión (revisado en Rendón-Anaya *et al.*, 2015). Mediante la plataforma de pirosecuenciación 454, que también hace parte de las técnicas de NGS, se ha explorado el transcriptoma de las glándulas de escorpión para las especies *Pandinus imperator* (Roeding *et al.*, 2009) y *C. noxius* (Rendón-Anaya *et al.*, 2012). La mayoría de análisis de transcriptoma de la glándula del veneno de escorpiones se ha efectuado a partir de la glándula “activa”, obteniendo el tejido para la extracción del ARN entre 2 y 5 días después extraer el veneno, con lo cual la maquinaria transcripcional se activa y se involucra en el proceso de producción del veneno.

Los análisis bioinformáticos del presente estudio se realizaron en su mayor parte en la plataforma Galaxy (análisis de calidad de transcritos, ensamblaje *de novo*, mapeo de secuencias contra el genoma *de novo* y análisis de expresión diferencial), y en el sitio web de NCBI (BLASTN y BLASTX). Galaxy es una plataforma basada en la web (página de inicio <https://galaxyproject.org>, principal servidor <https://usegalaxy.org>), utilizada por miles de investigadores para el análisis de grandes conjuntos de datos biomédicos. El proyecto Galaxy inició en 2005, y se ha enfocado en tres desafíos clave de las ciencias biomédicas basadas en datos: 1) Hacer asequibles los análisis, para investigadores sin experticia en bioinformática y programación, o sin acceso a los potentes recursos de cómputo requeridos, 2) garantizar la reproducibilidad de los análisis, y 3) simplificar la comunicación de resultados, para facilitar su reutilización y extensión (Afgan *et al.*, 2018).

El equipo de Galaxy y la comunidad de código abierto alrededor del proyecto, han realizado mejoras sustanciales en el marco central de trabajo, la interfaz de usuario, las herramientas y los tutoriales de utilización, permitiendo la disponibilidad de más de 5500

herramientas, que se han usado en miles de análisis (Afgan *et al.*, 2016; Afgan *et al.*, 2018). Galaxy se ha utilizado en más de 5700 publicaciones científicas y ha proporcionado un marco de trabajo accesible y reproducible para el análisis de datos (Goecks *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014; Afgan *et al.*, 2018). En entornos de investigación, se han propuesto y utilizado flujogramas para el análisis bioinformático de datos de secuenciación de ARN aprovechando las características de Galaxy (facilidad de acceso y uso, interfaz intuitiva), y su flexibilidad (edición de los pasos del flujograma, sustitución de herramientas con funcionalidad similar y ajuste de los parámetros para cada herramienta) (Trapnell *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2018; Giardine *et al.*, 2019).

Durante la secuenciación del ARN de la glándula productora de veneno de *T. forcipula* se generaron 25 258 187 fragmentos crudos (reads). La comprobación de la calidad de los datos crudos de secuenciación se hizo con FastQC, herramienta de código abierto basada en Java. El análisis de calidad con FastTQC arrojó cero secuencias etiquetadas como de pobre calidad, 39.5% de contenido GC y secuencias sobre-representadas no significativas, por lo que se consideró innecesario depurar los “reads” crudos. El ensamblaje *de novo* con la herramienta Trinity, produjo 44605 secuencias ensambladas con longitud media de 867 pb. El ensamblaje *de novo* es el protocolo de rigor cuando se carece de un genoma de referencia, como ocurre en el caso de los escorpiones, dado que no han sido considerados como organismos modelo. El software Trinity, desarrollado por el Broad Institute y la Universidad Hebrea de Jerusalén, combina tres módulos independientes: Inchworm, Chrysalis y Butterfly, aplicados secuencialmente para procesar grandes volúmenes de “reads” (Haas *et al.*, 2013).

Los “reads” se alinearon contra el genoma *de novo* mediante la herramienta de mapeo HISAT2, y se obtuvieron 21 758 431 parejas de “reads” alineadas (86.14%), con 16 137 507 parejas que alinearon exactamente una vez (63.8%), y 5 620 924 que alinearon más de una vez (22.25%), con una tasa de mapeo global de 93.64%. HISAT (Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts) es una herramienta para mapear o alinear “reads” provenientes de experimentos de secuenciación de ARN, basado en la transformación de Burrows-Wheeler y el índice FM de Ferragina-Manzini (King, Langmead y Salzberg, 2015). Si bien los resultados del alineamiento no constituyen información relevante para el presente estudio, a partir del mapeo se realizó el análisis de expresión diferencial. Mediante el script htseqcount, que forma parte del módulo HTSeq de python, se obtuvo una tabla de conteo para el análisis de expresión diferencial, a partir de un archivo de alineación en formato SAM y un archivo de rasgos en formato GFF, y se calculó el número de “reads” asignados a cada rasgo (Anders, Pyl y Huber, 2014).

Con el propósito de facilitar el procesamiento bioinformático *on line*, se seleccionaron para los análisis posteriores, los 3000 transcritos con mayor nivel de expresión según los resultados del análisis con htseqcount. Es posible que de esta forma se hayan excluido del análisis algunos componentes con niveles menores de expresión. Sin embargo, dado que el presente estudio se centra en los componentes del veneno, y que la obtención del ARN a partir de la glándula “activa” permite incrementar los niveles de expresión de los péptidos y proteínas que conforman el veneno, se espera minimizar el impacto de la exclusión de transcritos con menor nivel de expresión (Quintero-Hernández *et al.*, 2011; Abdel-Rahman *et al.*, 2015; Rendón-Anaya *et al.*, 2015).

Se espera que la mayoría de transcritos ensamblados a partir de datos de secuenciación de ARN derivados de ARN poliadenilado, codifiquen para proteínas. Para identificar transcritos probablemente codificantes y predecir sus funciones, se hace una búsqueda de homología de secuencias con algoritmos como BLASTX, contra secuencias de una especie bien anotada y filogenéticamente relacionada, según se discute en Haas *et al.*, 2013. En el presente estudio se combinaron las búsquedas de BLASTX contra la base de datos no redundante (nr) de escorpiones (taxid: 6855), y de BLASTN contra la base de datos de *Tityus* (taxid: 6886). El 96.4% de los 3000 transcritos analizados mostró homología con secuencias previamente reportadas en las bases de datos de NCBI, en tanto que el 3.6% no tuvo coincidencias, por lo que pueden representar nuevos péptidos o proteínas. El 78% de los transcritos con homología (2341 transcritos), correspondió a proteínas relacionadas con procesos celulares, y el 7% (218 transcritos) a componentes putativos del veneno (Figura 25A). El resto de los transcritos incluye proteínas no caracterizadas (260 transcritos, 9%), y proteínas hipotéticas (67 transcritos, 2%).

Los 218 transcritos que codifican proteínas y péptidos putativos del veneno, correspondieron principalmente con enzimas, de las cuales las metaloproteasas forman el grupo principal (130 transcritos, el 59.6%), con cantidades menores de fosfolipasas, serina proteasas, hilauronidasas, aspártico proteasas y otras proteasas diversas. El siguiente grupo de componentes lo forman transcritos que codifican las toxinas putativas que modifican específicamente la permeabilidad de los canales de sodio (NaScTxS, 13.8% con 30 transcritos) y de potasio (KScTxS, 9.2% con 20 transcritos). También se encontraron ocho transcritos codificantes para péptidos antimicrobianos (PAM, 3.7%), tres para inhibidores de proteasa (1.4%) y un grupo heterogéneo de componentes que incluye alérgenos (4 transcritos,

1.8%), proteínas ricas en cisteína (CAPs, 2 transcritos, 1%), péptidos que se unen a factores de crecimiento tipo insulina (IGFBPs, 3 transcritos, 1.4%) y otras proteínas del veneno (7 transcritos, 3.2%). El resto de los transcritos incluye proteínas no caracterizadas (260 transcritos, 9%), y proteínas hipotéticas (67 transcritos, 2%).

En los estudios clásicos de transcriptómica, el perfil transcriptómico de la glándula del veneno “activa” ha arrojado altos porcentajes de ESTs correspondientes a secuencias tipo toxina (entre el 50 y 78% para bítidos y el 30-44% para no bítidos). Además de los péptidos similares a neurotoxinas, se han encontrado moléculas del veneno como los péptidos antimicrobianos, PLA2, Ser-proteasas, metaloproteasas y péptidos activadores de lipólisis. Por el contrario, reportes que describen el transcriptoma de la glándula de veneno en “reposo”, evidenciaron perfiles de expresión diferentes, con mayor abundancia de péptidos antimicrobianos y transcritos de proteasa, y baja abundancia de transcritos de toxinas (Quintero-Hernández *et al.*, 2011).

Usando protocolos muy similares a los del presente estudio (secuenciación de ARN mediante la plataforma Illumina, VMF mediante LC-MS/MS), recientemente se reportó el estudio del transcriptoma de la glándula del veneno y del proteoma del veneno, del bítido *C. limpidus*, especie altamente venenosa del centro de México (Cid-Urbe, Meneses, Batista, Ortiz y Possani, 2019). Los autores reportaron aproximadamente 80 millones de “reads” ensamblados en 198 662 transcritos putativos, de los cuales 11 058 (el 5.5%) fueron anotados por similitud con secuencias disponibles en bases de datos, y se identificaron 192 secuencias relacionadas con el veneno (el 1.7%), incluyendo NaTx (59 transcritos, el 30.7%), KTx (26 transcritos, el 13.5%), enzimas, péptidos de defensa y otros componentes. Se destaca que este

es el número más grande de secuencias de NaTx reportadas a la fecha para cualquier especie de escorpión. El VMF corroboró que las NaTx son los componentes más abundantes del veneno, y 46 de los péptidos correspondieron con toxinas putativas del transcriptoma, confirmando su expresión en el veneno. Por otra parte, el número de transcritos asignados en estudios de transcriptoma mediante técnicas de secuenciación tradicionales, presentó un rango muy amplio, desde 101 para *Scorpio maurus palmatus*, hasta 1629 para *T. serrulatus* (Rendón-Anaya *et al.*, 2015).

Los resultados citados son comparables con los obtenidos para el transcriptoma de *T. forcipula*: el 78% de los 3000 transcritos analizados correspondió a proteínas de procesos celulares y el 7% (218 transcritos) a transcritos relacionados con componentes del veneno. Además, en el presente estudio los transcritos codificantes para enzimas constituyen más del 60% de los 218 componentes del veneno, y los péptidos putativos tipo neurotoxina fueron el 23% (13.8% de NaTx y 9.2% de KTx), contra el 44.2% en el caso de *C. limpidius* (30.7% de NaTx y 13.5% de KTx). Este resultado podría explicar la significativa actividad enzimática del veneno entero, discutida en el capítulo anterior.

En cuanto a similitud de secuencias de los 218 péptidos y proteínas putativos del veneno de *T. forcipula* con los de otras especies de escorpiones previamente reportados, se encontró que 204 de ellos (93.5%) presentan mayor identidad con componentes del veneno de escorpiones del Nuevo Mundo, principalmente *T. serrulatus* de Brasil (102 componentes, el 46.8%) y el búpido *Centruroides sculpturatus* (51 transcritos, 23.8%), junto con *T. pachyurus* (11 transcritos, 5%), *T. obscurus* (11 componentes, el 5%), *T. discrepans* (8 transcritos, el 3.7%), *T. trivitatus* (7 transcritos, 3.2%), *T. costatus* (6 transcritos, 2.8%) y *T. stigmurus* (3

transcritos, 1.4%). Similitud menor al 1% se encontró con otros escorpiones del género como *C. noxius*, *T. fasciolatus* y *T. zulianus*. Con bítidos del Viejo Mundo se encontró 6.5% de similitud, principalmente con componentes del veneno de *Mesobuthus eupeus* (9 transcritos, 4.1%) y en menor grado con *Lychas mucronatus*, *Hottentota judaicus* y *Androctonus crassicauda*.

Las NaTx putativas del veneno de *T. forcipula* presentaron mayor similitud con toxinas reportadas para escorpiones del Nuevo Mundo, como *T. pachyurus* (37%, 11 transcritos) y *T. obscurus* (16.7%, 5 transcritos). Con *C. sculpturatus*, *T. trivittatus* y *T. zulianus* se observó igual grado de similitud (6.7%, 2 toxinas en cada caso) y fue menor el porcentaje de identidad con toxinas de *T. discrepans*, *T. fasciolatus* y *C. noxius* (3.3%, un transcrito). También hubo homología con péptidos reportados para los escorpiones del Viejo Mundo *Mesobuthus eupeus* (tres toxinas), *Hottentota judaicus* (una toxina) y *Androctonus crassicauda* (una toxina).

Las KTx también presentaron mayor porcentaje de identidad con toxinas reportadas para las especies de Sur América, como *T. discrepans* (35%, 7 transcritos), *T. serrulatus* (20%, 4 transcritos), *T. costatus* y *T. stigmurus* (15%, 3 transcritos para ambas especies), y en menor grado con *T. trivittatus* (una toxina). También se encontró homología con péptidos reportados para el escorpión asiático *Mesobuthus eupeus* (dos toxinas). El 72.3% de los transcritos que codifican enzimas putativas (94 transcritos) presenta alta similitud con enzimas de *T. serrulatus*, el 23.1% con *C. sculpturatus* (30 transcritos, principalmente metaloproteasas), el 3.1% con *T. trivittatus* (43 transcritos, principalmente metaloproteasas), y finalmente menos de 1% con *T. pachyurus*. En cuanto a los péptidos antimicrobianos (PAM) en el transcriptoma de *T. forcipula*, el 62.5% (5 transcritos) presentó identidad con péptidos reportados

previamente para *T. obscurus*, un transcrito presentó similitud con PAM de *T. costatus* y dos transcritos fueron similares a otros tantos reportados para el búpido del Viejo Mundo *Mesobuthus eupeus*. Como en el caso de *T. forcipula*, en el transcriptoma de *C. limpidus* se identificaron secuencias putativas con homología a secuencias reportadas para escorpiones del Viejo Mundo (géneros *Isometrus*, *Lychas* y *Parabuthus*) (Cid-Urbe *et al*, 2019).

Guerrero-Vargas *et al.*, 2012, realizaron el análisis filogenético de las NaTx de varias especies de escorpiones *Tityus*, y encontraron una fuerte separación entre las especies que habitan al norte de la cuenca amazónica (*T. pachyurus*, *T. obscurus*, *T. discrepans* y *T. zulianus*), y las que habitan al sur (*T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. costatus* y *T. fasciolatus*). Entre las primeras, solamente *T. obscurus* se distribuye en la amazonia, y las demás se localizan en la región montañosa de los Andes. Las diferencias se observan también en los síntomas presentados en eventos de envenenamiento (principalmente neurotoxicidad central en las especies al norte de la cuenca, y manifestaciones autónomas con poco o ningún efecto central al sur). El veneno de *T. forcipula* presenta NaTx putativas similares a las de *T. pachyurus*, *T. zulianus* y *T. obscurus* (el 54% de los transcritos), y los síntomas observados en ratones envenenados experimentalmente, evidencian neurotoxicidad central (aunque también hay evidentes síntomas autonómicos), lo que que apoya la hipótesis de los autores sobre las relaciones filogenéticas de los escorpiones *Tityus*.

Según la descripción del BLAST, los 30 precursores putativos de péptidos con homología a péptidos previamente reportados en las bases de datos como toxinas específicas para canales Na_v, incluyeron α -NaTx (13 péptidos putativos) y β -NaTx (17 transcritos). Se asignaron los nombres triviales TfpNaTxAlp01 hasta TfpNaTxAlp13 a las α -NaTx, y TfpNaTxBet01 hasta

TfpNaTxBet17 a las β -NaTx. El análisis de filogenia mediante “Neighbor-joining” mostró al menos tres grupos (clústeres) bien definidos (Datos no mostrados), los dos mayores formados por nueve α -NaTx y once β -NaTx respectivamente.

Este resultado es comparable con estudios previos del transcriptoma de los búlidos *Tityus bahiensis*, *Centruroides hentzi* y *C. noxius*, realizados mediante secuenciación de alto rendimiento, que reportaron 27 a 38 transcritos potencialmente codificantes para NaTx (De Oliveira *et al.*, 2015; Rendón *et al.*, 2012; Ward, Elsworth y Rokita, 2018). Además, la mayor proporción de β -NaTx putativas en comparación con las α -NaTx, es consistente con los hallazgos previos en el veneno de búlidos del Nuevo Mundo, y en particular de los escorpiones *Tityus*. Así, la toxina Ts1, la más letal y mejor caracterizada en el veneno de *T. serrulatus*, es una β -NaTx típica. Se ha propuesto una secuencia evolutiva de las NaScTx, según la cual la β -toxina ancestral habría dado origen a las α -toxinas antes de la separación de África y Suramérica, lo que explicaría el predominio de α -toxinas en los búlidos del Viejo Mundo, mientras que en el Nuevo Mundo la β -toxina ancestral dio origen a las β -toxinas existentes, que predominan en los venenos de los búlidos suramericanos, lo que a su vez explicaría la existencia de algunas α -toxinas en los búlidos suramericanos (Cn2, Css II, Ts1) (Gurevitz, *et al.*, 2015).

Las β -NaTx se unen al sitio receptor 4 en el canal Na_v , y se caracterizan por su capacidad de modificar la dependencia del voltaje de activación del canal, hacia potenciales de membrana más negativos. Sin embargo, varían mucho en secuencias, selectividad, y en los síntomas que producen en animales envenenados experimentalmente (Gurevitz *et al.*, 2015). La mayoría de β -NaTx que afectan los canales Na_v de mamíferos, modifican la activación de

rNav_v1.2 de cerebro de rata, y de rNav_v1.4 en músculo esquelético, pero no tienen efecto sobre el canal cardíaco hNav1.5 (Cestèle *et al.*, 1998).

La mayor parte de los precursores (pro-péptidos) de las α -NaTx de la glándula de veneno de *T. forcipula* tienen 75-99 aminoácidos de longitud, pm entre 8277.5 y 10805.6 Da, y los péptidos maduros 60-67 aminoácidos, pm entre 6735.55 y 7698.72 Da, y son predominantemente básicos según el punto isoelectrico (PI) predicho con la herramienta Expassy (Tabla 11). Cabe destacar que el precursor TfpNaTxAlp07 presenta en el péptido maduro solo 24 residuos y un pm estimado de 2780.2 Da, que no corresponde con la longitud media de las NaTx, por lo que se postula que TfpNaTxAlp07 podría ser el resultado de la fragmentación de uno de los transcritos con los que comparte el péptido señal. Seis de las trece α -NaTx presentaron identidad con el precursor Tpa5 reportado para *T. pachyurus* (T-alpha*NaTx7.2, ID H1ZZI6), especialmente TfpNaTxAlp08 (identidad de 97.3%) y TfpNaTxAlp09 (identidad de 96.5%), en tanto que TfpNaTxAlp10 presentó homología con la toxina Tpa6 también reportada para *T. pachyurus* (T-alpha*NaTx7.4, ID H1ZZI7).

Los precursores TfpNaTxAlp11 y TfpNaTxAlp12 también presentaron alta homología con el precursor Tpa5 igualmente reportado para *T. pachyurus* (T-alpha*NaTx3.4, ID H1ZZI5.1), y sus secuencias putativas presentaron 93% de identidad entre ellas, con diferencia en seis posiciones de los 86 residuos del péptido maduro (posiciones 16 a 19, 21 y 23), en tanto que el péptido señal es el mismo. Los precursores TfpNaTxAlp02 y TfpNaTxAlp03 fueron homólogos con la toxina To9 de *T. obscurus* (T-alpha*NaTx3.8, ID H1ZZH8). Las secuencias putativas de TfpNaTxAlp02 y TfpNaTxAlp03 difieren solamente en tres residuos

del péptido maduro (Q⁸-K⁸, D⁹-Y⁹, y N¹⁰-G¹⁰), y en 49 unidades de masa, presentando la misma longitud tanto del precursor como del péptido maduro.

Nueve de los péptidos, desde TfpNaTxAlp04 hasta TfpNaTxAlp13, forman un clúster bien definido con ocho residuos Cys altamente conservadas en la estructura del péptido maduro, formando cuatro enlaces disulfuro, probablemente entre Cys¹⁵-Cys⁷¹, Cys¹⁹-Cys⁴⁴, Cys²⁹-Cys⁵¹ y Cys³³-Cys⁵² (excepto TfpNaTxAlp11 y TfpNaTxAlp12 que presentan el primer enlace entre Cys¹⁵-Cys⁶⁸), estructura con alta identidad a Tpa5, Tpa6 y Tpa4 de *T. pachyurus*, y con la α -toxina Cn12 de *C. sculpturatus* (clúster C, figura 21). Dentro de este clúster, las secuencias putativas de TfpNaTxAlp05, TfpNaTxAlp06 y TfpNaTxAlp08, todas con 98 residuos y masas similares, difieren entre ellas en algunos residuos del péptido maduro. El precursor TfpNaTxAlp07 también comparte el péptido señal con estas secuencias, pero como se mencionó atrás, el péptido maduro con solo 24 residuos y un pm estimado de 2780.2 Da, no corresponde con el tamaño medio de las NaTx, por lo que se postula que un producto de fragmentación de cualquiera de los transcritos relacionados.

Adicionalmente, esta gran similitud de secuencias podría explicarse por el splicing alternativo del ARNm maduro, fenómeno que parece haber contribuido a la diversificación del venoma de los escorpiones (Zeng *et al.*, 2012). Por último, el precursor TfpNaTxAlp01 es atípico entre las α -toxinas putativas encontradas, compartiendo la estructura de 8 Cys conservadas, cuatro enlaces disulfuro e identidad de secuencias con la α -toxina Hj1b del búbido asiático *Hottentota judaicas*, lo cual sin embargo no es extraño en escorpiones, principalmente respecto del motivo estructural altamente conservado CS $\alpha\beta$ (Cid-Urbe *et al.*, 2019).

Las toxinas To9 de *T. obscurus* y TbTx5 de *T. bahiensis*, presentan el C-terminal amidado, modificación pos-transduccional conservada presente en muchas α -NaTx, que se infiere por la presencia de Gly seguido por aminoácidos básicos (secuencia terminal GKK), donde los residuos básicos son removidos por una carboxipeptidasa dejando el residuo terminal amidado (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Dicha secuencia terminal es compartida con TpNaTx11 y TpNaTx12, por lo que se postula que estas NaTx putativas presentan amidación en el C-terminal. Sin embargo TPa5 y Tpa6 no presentan esta secuencia terminal, y por el contrario comparten la secuencia CXX, presente en la mayor parte de los péptidos del clúster (TpNaTx04, TpNaTx0405, TpNaTx0406, TpNaTx0408, TpNaTx0410, y TpNaTx0411), y que por tanto no presentarían amidación pos-traducciona.

Los resultados del análisis BLAST local, mostraron que los precursores TfpNaTxAlp02, TfpNaTxAlp06, TfpNaTxAlp08, TfpNaTxAlp11 y TfpNaTxAlp12, presentan alta similitud con péptidos del veneno parcialmente secuenciados por degradación de Edman. En particular, TfpNaTxAlp11 presentó alta similitud con la toxina parcialmente secuenciada de pm 7357 Da, denominada con el nombre trivial Frac_36(tr42.01), que mostró la máxima letalidad en ensayos de toxicidad con ratón. Este resultado se discute en detalle en la sección siguiente (Tabla 21). Se postula en consecuencia, que el transcrito correspondiente con el péptido putativo TfpNaTxAlp11 (67 residuos para el péptido maduro, con pm estimado de 7698.72 Da, y 86 residuos para el precursor, con pm estimado de 9839.62 Da), probablemente codifica el péptido más tóxico Frac_36(tr42.01) aislado del veneno, con pm 7357 Da, longitud de 66-67 residuos estimados. Adicionalmente, se encontró que TfpNaTxAlp11 presenta 82.5% de identidad con el precursor de la α -toxina Tpa5 igualmente reportado para *T. pachyurus* (T-alpha*NaTx3.4, ID H1ZZI5.1), a partir del análisis transcriptómico de la glándula del veneno.

Las tablas 12 y 13 resumen las propiedades de los 17 precursores clasificados como β -toxinas y los ortólogos con mayor porcentaje de identidad en la base nr de proteínas de NCBI, identificados mediante los algoritmos BLAST-X y BLAST-N. Las β -toxinas putativas presentaron 71-101 residuos, pm entre 8377 y 10887 Da, y los péptidos maduros 54-81 residuos, con pm entre 6388 y 9367 Da. Cinco de ellos presentan carácter ácido según el PI estimado para el péptido maduro (Por ejemplo, PI de TfpNaTxBet10=4.08, Expassy.org), aunque la mayoría presentan carácter básico como se esperaría. Los precursores TfpNaTxBet03, TfpNaTxBet05, TfpNaTxBet06, TfpNaTxBet07, TfpNaTxBet09, TfpNaTxBet11, TfpNaTxBet12, TfpNaTxBet15 y TfpNaTxBet16, formaron un clúster bien definido con 8 residuos Cys en arreglo de cuatro enlaces disulfuro altamente conservado (Cys¹⁶-Cys⁶⁸, Cys²⁰-Cys⁴³, Cys²⁸-Cys⁴⁹ y Cys³²-Cys⁵¹), con alta identidad a los precursores Tf2 de *T. fasciolatus* y To12 de *T. obscurus*.

La gran mayoría de péptidos del veneno de escorpión caracterizados a la fecha, presentan gran cantidad de residuos básicos y son ricos en Cys, que forman 3 o 4 puentes disulfuro (motivo CS α β). Los puentes más conservados enlazan la secuencia consenso Cys_i...Cys_{i+4}, plegada en α -hélice, con el par Cys_j...Cys_{j+2}, de una hoja β extendida (Possani y Rodríguez de la Vega, 2006). Este arreglo estructural se puede predecir en la toxina secuenciada Frac_36(tr42.01), probable α -toxina, y el componente más letal del veneno de *T. forcipula* (Figuras 28 y 29). Aunque se requiere confirmación experimental, se puede predecir el motivo también en el clúster C de las α -NaTx putativas, que presentan las secuencias consenso Cys¹³...Cys¹⁷, junto con Cys⁴⁸...Cys⁵⁰, (Figura 21). Por el contrario, el arreglo no se observa en las β -NaTx ni en las KTx putativas (Figuras 22, 23 y 24).

Las secuencias putativas TfpNaTxBet11 y TfpNaTxBet12 del clúster principal, presentan 85 residuos en el precursor, identidad del 100% en el péptido maduro, con diferencia de 20 unidades de masa debida a dos sustituciones en la secuencia del péptido señal ($L^{11} \times F^{11}$ y $F^{13} \times V^{13}$) y el BLAST arroja 74.4% de identidad con el precursor Beta-toxina Tz1 de *T. zulianus* (ID Q2NME3). El alineamiento múltiple muestra alta similitud con la toxina de pm 6932 Da con nombre trivial Frac_37 (tr42.29), parcialmente secuenciada a partir del veneno de *T. forcipula* (Tabla 21). Puesto que el péptido maduro es idéntico entre TfpNaTxBet11 y TfpNaTxBet12 (65 residuos y pm estimado de 7125.23 Da), se postula que la expresión funcional de los transcritos de estos precursores podría corresponder con el péptido Frac_37 (tr42.29) aislado del veneno, con pm 6932 Da. Como se sugirió respecto de las α -NaTx (TfpNaTxAlp02, TfpNaTxAlp06, TfpNaTxAlp08, TfpNaTxAlp11 y TfpNaTxAlp12), esta similitud entre TfpNaTxBet11 y TfpNaTxBet12 podría deberse a mutaciones de unas pocas bases (en este caso en el péptido señal) o al splicing alternativo, contribuyendo a la diversidad observada en el venoma de los escorpiones (Zeng *et al.*, 2012).

El precursor TfpNaTxBet09 con 62 residuos para el péptido maduro (pm 7091 Da), presentó 93.7% de identidad con Tpa7 de *T. pachyurus* (T-beta*NaTx1.3, ID H1ZZI8) y presentó 90% de sitios idénticos y 94% de similitud con el péptido de pm 7082 Da con nombre trivial Frac_39 (tr43.29), parcialmente secuenciado (Tabla 21). En consecuencia, se postula que el transcrito correspondiente con el precursor TfpNaTxBet09, podría codificar la toxina Frac_39 (tr43.29).

Los precursores TfpNaTxBet13 y TfpNaTxBet14 (similar a la toxina Acra-I-2-like de *C. sculpturatus*) y TfpNaTxBet10 (homólogo con el precursor Tpa8 de *T. pachyurus*) también

presentan el motivo estructural típico de 4 puentes disulfuro y 8 residuos Cys, aunque en posiciones diferentes. Los péptidos putativos TfpNaTxBet01 (81 residuos) y TfpNaTxBet02 (78 residuos) presentan secuencias idénticas en el péptido maduro y se diferencian solamente por tres residuos que forman un “gap” en la secuencia del péptido señal de TfpNaTxBet02, pero a diferencia de los anteriores, la estructura de estos péptidos incluye 6 residuos Cys en arreglo de tres enlaces disulfuro, altamente compartido con toxinas de *T. discrepans* y *T. stigmurus*, y del búpido asiático *Mesobuthus eupeus*.

Se identificaron 20 transcritos como toxinas putativas específicas para canales de potasio en el transcriptoma de *T. forcipula*, que se denominaron TfpKTx. De ellos, 15 son homólogos con α -KTx previamente reportadas, dos son similares a β -KTx y tres presentan similitud con las que se han denominado ε -KTx. Las α -KTx presentan 22-67 residuos y pm entre 2423 y 7341 Da para el péptido maduro (44-90 residuos y pm entre 4947 y 9901 Da para el precursor), y son básicas según el PI estimado (Expassy), excepto TfpKTxAlp4 y TfpKTxAlp9. Las ocho α -toxinas TfpKTxAlp05 hasta TfpKTxAlp10, más TfpKTxAlp12 y TfpKTxAlp14, forman un clúster bien definido dentro de las KTx, presentando seis residuos Cys y tres enlaces disulfuro altamente conservados (Cys¹⁴- Cys³⁵, Cys²⁰- Cys⁴⁰ y Cys²⁴- Cys⁴²), con alta identidad con los precursores α -KTx4.7 de *T. stigmurus*, y α -KTx4.5 de *T. costatus*. Las α -KTx reportadas tienen 23-43 residuos de longitud, la mayoría con tres enlaces disulfuro, y algunas subfamilias con cuatro. Las α -KTx generalmente se conocen por bloquear el canal K_V tipo “Shaker” y los canales de potasio activados por calcio (Bartok **et al.**, 2015).

Las toxinas putativas TfpKTxAlp01 y TfpKTxAlp02 están entre las α -KTx más grandes reportadas en el presente estudio, con 67 residuos y pm de 7326.4 y 7341.4 Da

respectivamente para el péptido maduro (90 residuos en el precursor), difieren únicamente en las posiciones de cinco residuos (21, 22, 25, 28 y 33), y no se agrupan con el cluster principal. Presentan también seis Cys con tres enlaces disulfuro conservados, y alta identidad con meuK1 de *Mesobuthus eupeus*. El precursor TfpKTxAlp04 (alta identidad con α KT_x8 de *T. discrepans*) también presenta el arreglo de seis Cys con tres enlaces disulfuro, pero en posiciones distintas respecto al clúster principal, a diferencia de la TfpKTxAlp03, que presenta ocho Cys con cuatro enlaces disulfuro y alta identidad con una α -toxina de *T. trivittatus* y la α KT_x12.3 de *T. costatus*.

Las dos β -toxinas identificadas, TfpKTxBet01 y TfpKTxBet02 (pm de 7287 y 7708 Da, 66 y 68 residuos respectivamente en el péptido maduro, altamente básicas), presentan identidad mayor al 70% con β -toxinas de *T. discrepans* y *T. stigmurus*, y seis residuos Cys con tres enlaces disulfuro conservados (Cys³⁸ - Cys⁵⁹, Cys⁴⁵ - Cys⁶⁴ y Cys⁴⁹ - Cys⁶⁶).

Por último, se encontraron los péptido putativos TfpKTxEps01 y TfpKTxEps02, con 37 y 36 residuos en el péptido maduro y pm de 4287.8 y 4026.6 Da respectivamente, básicos, con PI cercano a 9, clasificados como ϵ -toxinas según la descripción del BLAST. El precursor TfpKTxEps03 podría ser un fragmento relacionado con las anteriores, pues el péptido maduro presenta solo tres residuos, pero se incluye en la lista porque presenta sustituciones en el péptido señal. Las ϵ -toxinas, encontradas inicialmente en el veneno de *T. serrulatus*, fueron propuestas recientemente como el sexto grupo de SckTx, y presentan rasgos únicos en su estructura, siendo péptidos cortos (29 residuos, 2900 a 3000 Da), con dos Cys vecinas (nudo de cisteínas, posiciones 11 y 12) y una estructura altamente constreñida estabilizada por cuatro enlaces disulfuro (Cremonez **et al.**, 2016). Los péptidos putativos TfpKTxEps01 y

TfpKTxEps02 presentan 61% de identidad con la ϵ Ktx1.2 de *T. serrulatus*, no presentan el característico nudo de Cys, mencionado por Cremonez *et al.*, y son un poco más largos. Provisionalmente se les clasifica como ϵ -toxinas atendiendo a la descripción del BLAST, pero se requiere investigación adicional al respecto.

El péptido maduro del precursor TfpKTxAlp04 (pm de 6506.77 Da, 61 residuos) presentó en el análisis BLAST, 100% de identidad y 100% de sitios idénticos con el péptido completamente secuenciado Frac_25(tr35.61), de pm 3591 Da (ambos por supuesto con 35 residuos y 3598.16 Da como masa estimada). Por tanto, se postula que el péptido Frac_25(tr35.61), de pm 3591 Da, completamente secuenciado en el presente trabajo por degradación automatizada de Edman, podría ser codificado por el transcrito del precursor TfpKTxAlp04. Este precursor a su vez presentó 59% de identidad con la alpha-KTx18.3 de *T. discrepans* (ID POC1X6).

La figura 27 muestra el modelamiento tridimensional de la toxina Frac_25(tr35.61), por homología con la toxina alpha-KTx 18.1 de *T. obscurus* (PDB: 2JP6), usada como molde por su mayor porcentaje de similitud entre las estructuras depositadas en el PDB. El alineamiento de secuencias entre Frac_25 con 35 residuos, y alpha-KTx 18.1 con 37 residuos (figura 25) muestra un porcentaje de identidad del 73%, con idéntico patrón de residuos Cys. A diferencia de alpha-KTx 18.1, la primera hoja β del extremo N-terminal falta en Frac_25(tr35.61), probablemente por la diferencia de dos residuos (G, S) entre las dos toxinas. El modelamiento también muestra la conservación de los enlaces disulfuro que se observa en el alineamiento.

Las enzimas son componentes esenciales de muchos venenos animales, y se han encontrado también en venenos de escorpiones (Ortiz *et al.*, 2015). Los estudios clásicos han mostrado que el veneno de escorpiones contiene proteasas, fosfolipasas e hialuronidasas (Almeida *et al.*, 2001). Los componentes no neurotóxicos del veneno de *T. forcipula* constituyen la mayor parte de los precursores encontrados en este estudio, de los cuales 130 se identificaron como enzimas con gran porcentaje de identidad con diversas metaloproteasas reportadas en el veneno de *T. serrulatus*. Estas enzimas putativas corresponden a proteínas de hasta 400 residuos (pm mayor a 40 kDa), aunque se incluyeron también transcritos más pequeños (menos de 100 residuos, pm hasta 3 kDa), que probablemente corresponden con secuencias parciales o productos de fragmentación de los precursores. El grupo más importante es el correspondiente a los precursores con alta identidad con metaloserrulasas previamente reportadas como componentes putativos del veneno de *T. serrulatus*, como metaloserrulasa 20 (44 precursores), metaloserrulasa 3 (20 precursores), metaloserrulasa 1 (12 precursores), metaloserrulasa 14 (4 precursores) y metaloserrulasas 2, 4, 5, 6, 8, 12, 14 y 18 (entre uno y dos precursores).

Un segundo grupo de enzimas putativas incluyó 19 precursores con alto grado de identidad con metaloproteasas tipo antareasa reportadas para *C. sculpturatus* (14 precursores), *T. trivittatus* (4 transcritos) y *T. pachyurus* (un transcrito). La antareasa, una metaloproteínasa caracterizada en el veneno de *T. serrulatus*, escinde proteínas SNARE, involucradas en la fusión de vesículas con las membranas celulares y participantes en el transporte selectivo entre compartimentos celulares (Fletcher *et al.*, 2010). En la glándula de veneno de *C. limpidus* se encontraron 49 secuencias putativas codificantes para enzimas (38 para proteasas, 7 para fosfolipasas y una HYAL), y las proteasas fueron principalmente metaloproteasas tipo

antareasa (24 de 38 transcritos). Las metaloproteasas tipo antareasa, reportadas en veneno de escorpiones *Tityus*, probablemente contribuyen al potente efecto secretagogo pancreático del veneno de estos escorpiones, y la pancreatitis aguda observada en envenenamiento severo (Cid-Urbe *et al.*, 2018). La fracción I de la cromatografía en carboximetilcelulosa-52 del veneno de *T. serrulatus*, exhibió actividad proteolítica, y resultó contener 48% de metaloproteinasas (Amorim *et al.*, 2019), y diez nuevas secuencias de metaloproteinasas putativas (metaloserrulasas) fueron identificadas en el transcriptoma de la glándula de veneno de *T. serrulatus* (Carmo *et al.*, 2014).

Otros transcritos identificados con enzimas según la descripción del BLAST, fueron proteasas tipo ECA (enzima convertidora de angiotensina, siete transcritos de 226 a 847 residuos), con identidad a proteínas putativas de *C. sculpturatus* y *T. serrulatus*; proteínas convertidoras de endotelina (tres precursores con identidad alta con componentes del veneno de *C. sculpturatus*), metionina aminopeptidasas (dos transcritos con homología a precursores de *T. serrulatus*) y carboxipeptidasa E (un transcrito, alto porcentaje de identidad con componente del veneno en *T. serrulatus*). También se incluyeron en este grupo dos transcritos que codifican serina proteasas putativas (TfpSerP01 y TfpSerP02, 269 residuos, pm aproximado de 30 kDa) con homología a precursores del veneno en *C. sculpturatus*. Una aspártico proteasa putativa (TfpAspP01, 92% de identidad con la enzima tipo proteína lisosomal de *C. sculpturatus*). La TfpHya01 (411 residuos, 47670 Da), se caracterizó con base en su alta identidad con una hialuronidasa del veneno de *C. sculpturatus*. Los precursores TfpPLA2_01 y TfpPLA2_02 se caracterizaron por su alto porcentaje de identidad con fosfolipasas tipo 2 (PLA2) del veneno de *C. sculpturatus*.

Las proteasas están involucradas en el procesamiento postransduccional de péptidos y proteínas del veneno y sus precursores, en la inhibición de la agregación plaquetaria, la activación del sistema del complemento, la modulación de la producción de citokinas y la difusión de los componentes tóxicos del veneno al degradar las proteínas de la matriz intersticial (Cologna *et al.*, 2009). Como se dijo atrás, pueden estar involucradas en la pancreatitis observada en las víctimas, mediante la activación del tripsinógeno. Sin embargo sus funciones en el veneno aún son desconocidas (Almeida *et al.*, 2002). En el transcriptoma de *C. limpidus* se encontraron transcritos putativos codificantes para fosfolipasas A2 y D2, y un transcrito putativo para HYAL, aunque no se encontró evidencia de actividad fosfolipasa del veneno entero. Los inhibidores de proteasa podrían proteger los componentes del veneno contra degradación autógena por proteasas del veneno (Cid-Urbe *et al.*, 2019).

Los precursores TfpAMP01 al 08 constituyeron un grupo de ocho péptidos putativos antimicrobianos (PAM, entre 63-104 residuos de longitud, pm entre 6906 y 11102 Da), caracterizados por su alto porcentaje de identidad con PAM reportados principalmente en el veneno de *T. obscurus* (5 precursores) y *T. costatus* (un precursor). Se caracterizaron tres inhibidores putativos de serina proteasa (Serpins, 412 y 446 residuos, alta identidad con componente del veneno en *C. sculpturatus*) y un inhibidor de proteasa tipo Kunitz (83 residuos, identidad con precursor en veneno de *Lychas mucronatus*), así como dos péptidos putativos ricos en cisteína (CAPs, con 62 residuos, pm 6949 Da, y 64 residuos, pm 6866 Da, respectivamente), con identidad a CAPs caracterizados en el veneno de *T. costatus*. Las secuencias de péptidos antimicrobianos (PAM, 17%) y péptidos aniónicos (3%), también fueron abundantes en el transcriptoma de la glándula del veneno de bütidos como *T. serrulatus*. Aunque su función precisa no se ha dilucidado, su abundancia sugiere un papel

importante en la función biológica en la glándula del veneno de esta especie (Alvarenga *et al.* 2012), y se ha propuesto que podrían proteger al escorpión contra infecciones, o potenciar la acción de las neurotoxinas (Bordon *et al.*, 2015).

Finalmente, se encontraron tres precursores con identidad a péptidos de unión a factores de crecimiento tipo insulínico (IGFBPs, 110 a 599 residuos, pm entre 12249 y 66147 Da), cuatro precursores con identidad a alérgenos del veneno de *C. sculpturatus* (288-466 residuos) y siete precursores con identidad a proteínas diversas del veneno de *C. sculpturatus* y bítidos del Viejo Mundo. Transcritos para proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulínico se han encontrado en glándulas del veneno de escorpión, aunque su función no se ha establecido (Cid-Uribe *et al.*, 2019; Santibáñez-López *et al.*, 2016; Ward *et al.*, 2018).

Muchos péptidos del veneno de escorpión son traducidos como precursores, tanto pro-péptidos (péptidos endógenos, no secretados), como pre-pro-péptidos (que presentan un péptido señal de secreción). Las modificaciones postraduccionales generan los péptidos maduros. Algunas modificaciones se pueden predecir a partir del transcriptoma, como sitios de glucosilación y fosforilación putativa, formación de enlaces disulfuro, amidación del C-terminal (una modificación relevante para la afinidad de las toxinas hacia su diana) (Revisado en Rendón-Anaya, 2015). Se ha encontrado que los precursores tienen péptidos señal de alrededor de 20 aminoácidos de longitud, y algunos residuos extra en el carboxilo terminal (que están ausentes en las toxinas maduras), y que la amidación de los aminoácidos del C-terminal es una modificación pos-transduccional frecuente (revisado en Quintero-Hernández *et al.*, 2011). El transcriptoma de la glándula “activa” del veneno en escorpiones de la familia Buthidae, muestra que los transcritos más abundantes son los de NaTx (hasta 54.2% para

B.occitanus) (revisado en Rendón-Anaya *et al.*, 2015). El transcriptoma de la glándula en reposo en cambio, parece mostrar bajos niveles de expresión para NaTx (1.3% para *T. stigmurus* y 6.7% para *H. judaicus*), indicando la dependencia del estado fisiológico de la glándula (Almeida *et al.*, 2012).

Tomados en conjunto, los resultados reportados en estudios anteriores y los resultados del transcriptoma de la glándula del veneno de *T. forcipula*, muestran que la composición del veneno de esta especie corresponde con la característica de los búlidos, y en particular de las especies del género *Tityus* del Nuevo Mundo, incluyendo gran cantidad de proteínas relacionadas con procesos celulares, y mas de 200 transcritos putativos de péptidos y proteínas relacionadas con componentes del veneno. Las enzimas fueron el componente principal del transcriptoma de *T. forcipula*, principalmente proteasas putativas tipo metaloserrulasas, resultado que llama la atención y que requiere investigación adicional, pero que es coherente con la significativa actividad enzimática del veneno entero (fosfolipasa, proteasa e hialuronidasa), en los ensayos *in vitro*. Los transcritos relacionados con neurotoxinas incluyeron principalmente α y β -NaTx, así como α , β y ϵ -KTx, y se encontraron en menor porcentaje transcritos putativos codificantes para diversos péptidos y proteínas, destacándose entre estos últimos los PAM.

Llama la atención el alto número de transcritos que correspondieron con proteínas no caracterizadas o no identificadas previamente en las bases de datos (438 transcritos de los 3000 analizados, el 13.6%, entre proteínas no caracterizadas, proteínas hipotéticas del veneno y transcritos sin coincidencia). Este hecho es congruente con la observación de otros investigadores sobre la necesidad de incrementar los esfuerzos de caracterización del venoma

de los escorpiones, cuya compleja composición en términos de péptidos y proteínas con actividad biológica ofrece un vasto campo de exploración (Rodríguez de la Vega, Schwartz y Possani, 2010; Rendón-Anaya *et al.*, 2012; Rodríguez de la Vega, Vidal y Possani, 2013; Abdel-Rahman, 2015; Quintero-Hernández *et al.*, 2015).

Adicionalmente, los escorpiones son un excelente modelo evolutivo, pues son los animales terrestres más antiguos del registro fósil y se han adaptado a ambientes extremos. Considerando la superposición geográfica de las especies de escorpiones en áreas particulares, se puede suponer que son factibles los cruces y mezclas sucesivas, después de la especiación y antes del surgimiento de las barreras reproductivas, de modo que la organización del genoma podría ser un mosaico de fragmentos genómicos de las especies parentales, con número diploide y morfología de cromosomas muy variable (desde menos de 10, hasta más de 100 cromosomas), y tamaño del genoma (para escorpiones bítidos) comprendido entre 600 Mbp para *M. martensii* (Li *et al.*, 2009) y 880 Mbp para *C. vittatus* (revisado en Rendón-Anaya *et al.*, 2015).

Una pregunta que sigue abierta es como llegó a producirse la enorme diversidad de toxinas peptídicas que caracteriza sus venenos. La explicación podría incluir fenómenos como la duplicación génica y la diversificación funcional acompañadas de una fuerte selección positiva, aunque estudios en otros animales venenosos han mostrado que la sola duplicación no explica el “venoma”, sugiriendo la posibilidad de mecanismos adicionales como el splicing alternativo y mutaciones (Zeng *et al.*, 2012). Los resultados del presente estudio apoyan esta hipótesis, dado que en el grupo de NaTx y KTx putativas de *T. forcipula* hay “clústers” de secuencias que se diferencian en unos pocos aminoácidos (las secuencias

putativas de TfpNaTxAlp05, TfpNaTxAlp06 y TfpNaTxAlp08, todas con 98 residuos y masas similares, difieren entre ellas en unos pocos residuos del péptido maduro), o que se diferencian sólo en el péptido señal (TfpNaTxBet11 y TfpNaTxBet12 presentan 85 residuos en el precursor, identidad del 100% en el péptido maduro, con diferencia de 20 unidades de masa debida a dos sustituciones en la secuencia del péptido señal).

7. ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL VENENO DE *T. forcipula* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL VENENO ENTERO Y FRACCIONES HOMOGÉNEAS SOBRE CANALES hNA_v1.5.

7.1 METODOLOGÍA

7.1.1 Fraccionamiento cromatográfico del veneno mediante el método A

Se utilizaron dos métodos de purificación diferentes. En la Figura 35 se muestra el flujograma que resume los pasos principales de ambos métodos. Mediante el primer método (en adelante se denominará método A) se obtuvieron fracciones cromatográficas para el análisis proteómico de la huella dactilar de masas del veneno (Venom Mass Fingerprint, VMF), para la evaluación de la toxicidad de las principales fracciones del veneno, para la purificación hasta homogeneidad de varios péptidos y para la determinación de sus secuencias aminoacídicas totales o parciales (Coronas *et al.*, 2014).

Para ello se resuspendieron 2 mg de veneno entero en 250 µL de TFA al 0.12% (v/v) en agua tipo I y se centrifugó por 15 min a 14000 rpm. El sobrenadante se fraccionó en una columna analítica de fase reversa C18 Vydac 218 TP (250 mm x 10 mm, 4 µm, tamaño de poro 300 Å, California, EE. UU.), previamente equilibrada con eluente A (TFA al 0.12% v/v en agua tipo I), utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) Waters 625 LC equipado con detector Waters 996 de arreglo de fotodiodos (PAD) controlado mediante el software Millennium 2.10 (Waters, EE. UU.), que también se utilizó para la adquisición y análisis de los espectros cromatográficos. Las fracciones se eluyeron con flujo de 1 mL/min y gradiente lineal de

eluyente A a 60% de eluyente B (TFA al 0.1% v/v en acetonitrilo). Para la preparación de los eluentes se utilizaron solventes y reactivos grado HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), y para todos los efectos se utilizó agua tipo I (resistencia 18 MΩ).

Las fracciones se colectaron manualmente monitoreando la absorbancia a 230 nm, se secaron en un concentrador Savant Speed-Vac SC201A (Thermo Electron Corporation, San José, California, USA) y se guardaron a -20 °C hasta su uso. Algunos componentes del veneno se obtuvieron en forma homogénea después del primer paso cromatográfico y se llevaron a determinación de masa molecular mediante ESI-MS y determinación de secuencia aminoacídica.

Las fracciones cromatográficas principales, que de acuerdo con reportes previos de investigación contienen los péptidos caracterizados por modificar la permeabilidad de los canales iónicos de sodio y potasio, se fraccionaron adicionalmente usando el mismo sistema cromatográfico y de solventes, pero variando los gradientes de elución, buscando purificar los componentes del veneno soluble hasta homogeneidad (Coronas *et al.*, 2014).

7.1.2 Fraccionamiento cromatográfico del veneno mediante el método B

El segundo método de fraccionamiento (en adelante método B) se realizó según la estrategia inicialmente descrita por Ramírez *et al.*, 1988, con algunas modificaciones (Espino-Solís *et al.*, 2011; Olamendi-Portugal *et al.*, 2016). Mediante este método se optimizó la purificación de las fracciones del veneno en términos de rendimiento y homogeneidad de los componentes fraccionados, y se obtuvieron las fracciones para los ensayos electrofisiológicos.

El fraccionamiento se efectuó en un cromatógrafo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Äkta Explorer equipado con detector UV-900, bomba de muestra P960 y colector de fracciones Frac-950 (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia), utilizando inyección y colecta manual en primer y tercer paso cromatográfico (exclusión por tamaño mediante filtración en gel y fase reversa), e inyección mediante la bomba P960 con colecta manual en el segundo paso cromatográfico (intercambio catiónico). La absorbancia se monitoreó simultáneamente a 215 y 280 nM. Los datos se generaron y analizaron mediante el software Unicorn 5.0® (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia). Como eluentes se utilizaron solventes grado HPLC y búferes preparados con reactivos grado HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) y agua tipo I (resistencia 18 MΩ). Todos los búferes y solventes de elución se filtraron con vacío mediante membranas de nylon de 20 µm. La estrategia de purificación requirió tres etapas de fraccionamiento cromatográfico, que brevemente se describen a continuación.

7.1.2.1 Cromatografía de exclusión por tamaño (Size Exclusion Chromatography, SEC) mediante filtración en gel Superdex 75

Se empacó una columna de vidrio Tricorn de 16 x 300 mm (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EE.UU.) con Superdex-75 (13 µm tamaño medio de partícula, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se resuspendieron 147.6 mg de veneno entero en 2 mL del búfer de elución (acetato de amonio 0.1 M pH 4.7) y se inyectó manualmente la suspensión de veneno en la columna previamente equilibrada con 5 volúmenes del búfer de elución. Se eluyeron las fracciones con flujo de 0.8 mL/min, durante

150 min. Las fracciones se colectaron manualmente monitoreando la absorbancia a 215 y 280 nm y se llevaron inmediatamente al siguiente paso cromatográfico sin secado previo.

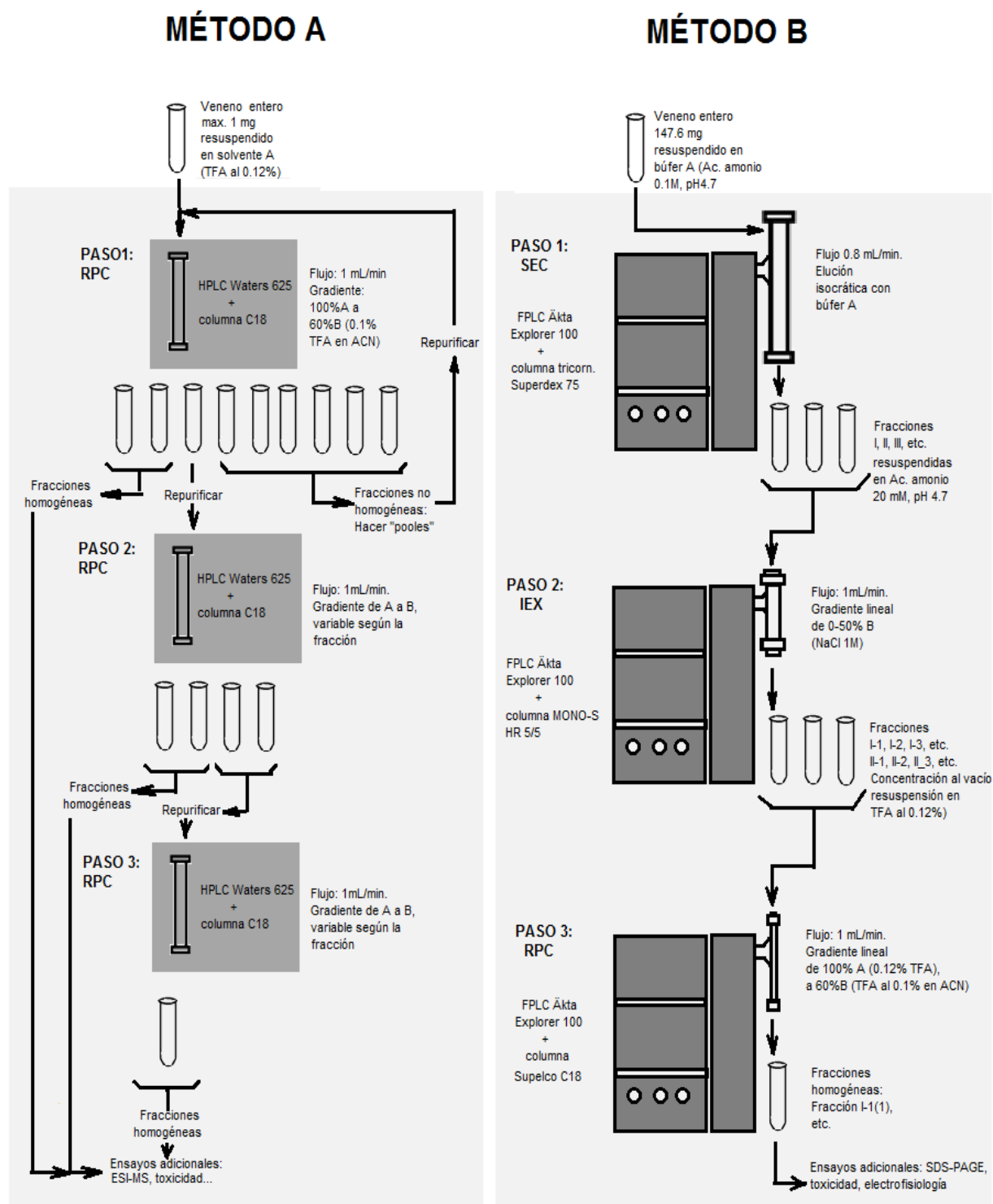


Figura 35. Flujograma ilustrativo de los métodos de purificación A y B.

7.1.2.2 Cromatografía de intercambio iónico (Ionic Exchange chromatography, IEX)

Las fracciones principales obtenidas a partir de la cromatografía de exclusión por tamaño se suspendieron en volúmenes variables (270 μ L a 36 mL) del búfer de equilibrio (búfer A, acetato de amonio 20 mM, pH 4.7), y se purificaron en el segundo paso mediante una columna de intercambio catiónico pre-empacada, MONO-S HR 5/5 (5 x 50 mm, lecho mono disperso con tamaño de partícula de 10 μ m, GE Healthcare, Chicago, Illinois, EE.UU.), previamente equilibrada con 10 volúmenes de búfer A. El analito se cargó en la columna de intercambio mediante la bomba P960 con flujo de 1 mL/min. La elución se realizó con gradiente lineal de 0% a 50% de eluyente B (NaCl 1M) y flujo de 1 mL/min. Las fracciones se colectaron manualmente monitoreando la absorbancia a 280 nm, se secaron en un concentrador Savant SpeedVac (Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.) y se guardaron hasta su uso a -20°C.

La toxicidad de las fracciones obtenidas por IEX se ensayó mediante inyección IP en ratones albino suizo (20 g de masa corporal) para seleccionar las fracciones a purificar en el paso cromatográfico final, priorizando las fracciones más tóxicas con la idea de que son estas fracciones las que contienen las neurotoxinas y cardiotoxinas.

7.1.2.3 Cromatografía de fase reversa (RP)

Las fracciones principales obtenidas en el paso anterior se fraccionaron mediante cromatografía de fase reversa. Para ello se resuspendió el analito en eluyente A (TFA al 0.12% v/v) y se inyectó manualmente en una columna analítica de fase reversa C18 Supelco (25 cm x 10 mm, 10 μ m, 300 Å, Discovery BIO Wide Pore, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) previamente equilibrada con solución A (TFA al 0.12% v/v en agua tipo I). Las

fracciones se eluyeron con flujo de 1 mL/min y gradiente lineal de A a 60% de B (TFA al 0.1% v/v en acetonitrilo), se secaron como se describió antes y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para el paso cromatográfico final los solventes, además de la filtración a través de membranas de 20 µm, se degasificaron mediante sonicación por 10 minutos y se purgaron mediante burbujeo continuo con flujo de helio (aproximadamente 1mL/min) para prevenir la gasificación de los solventes, problema bastante común principalmente con el eluyente B. Todos los solventes y reactivos utilizados fueron grado HPLC (Acetonitrilo de JT Baker, EE.UU., TFA de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y agua tipo I (18 MΩ).

7.1.3 Análisis de espectrometría de masas

Se seleccionaron las principales fracciones cromatográficas obtenidas mediante el método de purificación A, con base en el criterio de absorbancia mayor a 0.15 UA, monitoreada a 230 nm, para determinar las masas moleculares de sus componentes mediante espectrometría de masas de ionización por electro spray (Electro spray ionization-Mass spectrometry, ESI-MS). Cada una de las fracciones se resuspendió en acetonitrilo al 50% con ácido acético al 1%, y un volumen de 2 µL de la muestra se inyectó directamente en un espectrómetro de masas de trampa de iones LCQ FleetTM (Thermo Scientific, San José, California, EE.UU.). Se estableció en 1.6 kV el voltaje del espray y se fijó en 180 °C la temperatura del capilar. Todos los espectros se obtuvieron en modo de iones positivos. Se realizó deconvolución manual para determinar la masa molecular media de los componentes del veneno con masa molecular mayor a 2 kDa, en tanto que las fracciones con masa menor a 1 kDa se expresaron como masas monoisotópicas (Santibáñez-López *et al.*, 2017).

El mismo procedimiento se utilizó para determinar las masas de péptidos purificados mediante fraccionamientos adicionales, así como de péptidos reducidos y alquilados durante los protocolos para determinación de las secuencias aminoacídicas de algunas toxinas presentes en el veneno de *T. forcipula*. En todos los casos se asumió que dos o más masas moleculares se originaban a partir de un mismo péptido, si diferían en dos unidades de masa o menos, en cuyo caso se promediaron y se reportó la masa final media del componente en cuestión. Solamente masas con diferencia mayor a 2 Da se supusieron como provenientes de péptidos diferentes (Santibáñez-López *et al.*, 2017).

7.1.4 Secuenciación de péptidos homogéneos

Se utilizaron los siguientes criterios para seleccionar varias fracciones de neurotoxinas entre los componentes del veneno de *T. forcipula*, y determinar su secuencia aminoacídica mediante degradación automática de Edman. El primer criterio fue el tiempo de retención en la columna C18 según el método A de purificación cromatográfica, seleccionando componentes que, según los reportes previos, eluyeron en el rango de tiempos de retención de las toxinas específicas para canales Na_V y K_V (Olamendi-Portugal *et al.*, 2005). En segundo término, la homogeneidad de la fracción cromatográfica evaluada tanto a partir del cromatograma mismo, como del espectro ESI-MS. El tercer criterio fue la obtención de cantidad suficiente de material homogéneo, teniendo en cuenta que se requiere cargar en el secuenciador entre 30 y 35 µg de proteína para alimentar 35 ciclos de degradación automatizada, y que obtener la secuencia completa requiere más de un ensayo. Por último, se tuvo en cuenta la mayor toxicidad de los componentes, evaluada mediante inyección IP o IC

en ratones, este criterio aplicado específicamente a las posibles toxinas específicas para canales Nav (Corzo et al., 2008).

Se determinaron las secuencias aminoacídicas de fragmentos amino terminales (N-terminal) de cinco péptidos que, con base en los criterios descritos arriba, se asociaron a posibles toxinas específicas para canales Na_v. También se determinó la secuencia completa de un péptido probablemente correspondiente a una toxina específica para canales K_v. Las secuencias se obtuvieron por degradación automática de Edman de las fracciones nativas, de las fracciones reducidas y alquiladas (fracciones sometidas a reducción y carboximetilación, RC) o de los fragmentos de digestión enzimática de los péptidos nativos o las fracciones RC.

La determinación de las secuencias peptídicas se realizó según el protocolo descrito por Olamendi-Portugal *et al.*, 2008. Se inyectaron aproximadamente 0.5 nmol del péptido nativo en un secuenciador de proteínas PPSQ-31A (Shimadzu Scientific Instruments, USA), y se secuenció adicionalmente una muestra similar sometida previamente a RC, para identificar los residuos de cisteína. Cuando fue necesario, los péptidos obtenidos a homogeneidad fueron fragmentados mediante digestión por endoproteasas.

7.1.5 Reacción de reducción y alquilación (RC)

Este procedimiento reduce los enlaces disulfuro que estabilizan la estructura terciaria de los péptidos y seguidamente adiciona un grupo carboximetilo a cada residuo Cys de la molécula. La carboximetilación realizada con el agente alquilante iodoacetamida, inhibe los grupos sulfidrilo (-SH) previniendo que se formen nuevamente los enlaces disulfuro. La

reacción de RC tiene dos propósitos. En primer lugar, facilita la separación de péptidos con tiempos de elución idénticos en la columna RP-C18, ya que la desnaturalización modifica los tiempos de retención. La desnaturalización también puede facilitar la secuenciación permitiendo la permanencia de las moléculas adsorbidas en la matriz del secuenciador y por tanto permitiendo mayor número de ciclos de secuenciación. Adicionalmente, la reacción de RC se utiliza para determinar el número de residuos Cys presentes en el péptido de interés, ya que por cada Cys presente en la estructura se adiciona al péptido un grupo alquilo de 57 Da, el grupo carboximetilo donado por la 2-iodoacetamida. Debido a la pérdida de actividad biológica, las muestras sometidas a RC solo se pueden usar para la determinación de la secuencia aminoacídica. La ecuación (3) se usó para estimar el número de residuos Cys en la estructura de los péptidos a secuenciar:

$$\begin{aligned} \text{No. de residuos de Cys} &= \frac{(\text{PM péptido RC} - \text{PM péptido nativo})\text{Da}}{\text{PM de iodoacetamida}} && \text{Ecuación (3)} \\ &= \frac{(\text{PM péptido RC} - \text{PM péptido nativo})\text{Da}}{57 \text{ Da}} \end{aligned}$$

Para la reacción de RC, entre 30 y 50 µg de los péptidos nativos obtenidos en forma homogénea y seleccionados con base en los criterios descritos, se llevaron a un vial de eppendorf de 1.5 mL y se suspendieron en buffer TRIS-HCl 200 mM, pH 8.6, con 1 mg/mL de EDTA y 6 M de cloruro de guanidinio, homogenizando la mezcla de reacción. Enseguida se adicionaron 0.5 mg de 1,4-ditiotreitol (DTT) y se burbujó nitrógeno a la solución durante 5 min para mantener condiciones reductoras. Luego la mezcla se incubó a 55 °C por 45 min (Accublock Digital Dry Bath, Labnet International, Inc., EE. UU), se añadieron al vial de

reacción 2.5 mg de iodoacetamida y se dejó en reposo durante 30 min en condiciones de oscuridad. Inmediatamente se inyectó la mezcla de reacción en una columna RP-C18 y se hizo cromatografía con el método A para eliminar los reactivos (desalar), colectando manualmente las fracciones correspondientes a los péptidos RC (Olamendi-Portugal *et al.*, 2016). Excepto el DTT (Honeywell Fluka, EE. UU.), los reactivos utilizados en este protocolo se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE. UU.).

7.1.6 Fragmentación enzimática de péptidos homogéneos

En los casos en que el procedimiento de secuenciación no logró completar la secuencia total, ya fuera del péptido nativo o sometido a RC, se procedió a fragmentar el péptido mediante digestión enzimática. Se realizaron dos procedimientos alternativos de digestión, dependiendo del análisis de la estructura del péptido en cuestión. Brevemente los procedimientos fueron:

Digestión con endopeptidasa Aspártico-N (Asp-N, Roche, Mannheim, Alemania): Una muestra de 50 µg del péptido se suspendió en 100 µL de buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0 y se adicionaron 50 µg de la enzima. La mezcla se incubó por 4 horas a 37°C (Accublock Digital Dry Bath) y se fraccionó por HPLC en la columna RP-C18 para separar los fragmentos del clivaje, usando un gradiente de 0–60% B, según el método A, descrito antes. La enzima Asp-N rompe el enlace Asp-X en el lado carboxilo terminal.

Digestión con endopeptidasa Glu-C de Staphylococcus aureus (V8, Roche, Mannheim, Alemania): La muestra seca del péptido reducido y carboximetilado se

resuspendió en 100 μL de búfer NH_4CO_3 25 mM, pH 8.2, se adicionaron 5 μL de enzima con concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (1 μg de enzima) y se incubó el vial de reacción a 37°C por cuatro horas (Accublock Digital Dry Bath). Inmediatamente se hizo cromatografía a la mezcla de reacción en una columna RP-C18 en las condiciones ya descritas. La enzima Glu-C rompe el enlace Glu-X en el lado carboxilo terminal y la reacción debe limitarse al tiempo descrito en el protocolo porque la incubación prolongada hidroliza también enlaces Asp-X.

El tipo de digestión a efectuar se decidió en cada caso según el problema particular a resolver. Después de obtener la secuencia N-terminal de un péptido, usualmente un fragmento de 20 a 30 residuos, se analizó su estructura mediante el algoritmo BLAST-P de NCBI contra la base nr de proteínas (blast.ncbi.nlm.nih.gov). El péptido se sometió a la reacción de RC, el número de residuos Cys en la estructura se estableció a partir de la masa molar del péptido nativo y del péptido RC, determinadas mediante ESI-MS (Ecuación 1), y con base en el análisis de la estructura se decidió el tipo de digestión a realizar, buscando generar fragmentos informativos para determinar la secuencia total del péptido.

El patrón de fragmentación y la masa molar de los fragmentos esperados se simularon mediante la herramienta Protein Prospector (prospector.ucsf.edu). Una vez digerido el péptido, se hizo cromatografía a la mezcla de digestión, se determinó mediante ESI-MS la masa de los fragmentos, y se seleccionaron para secuenciación los fragmentos convenientes para completar la secuencia, teniendo en cuenta las masas molares de los patrones de digestión predichos mediante Protein Prospector (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

7.1.7 Comparación de secuencias de aminoácidos

Las secuencias aminoacídicas de los seis péptidos del veneno de *T. forcipula* secuenciados total o parcialmente, se compararon con secuencias previamente depositadas en bancos de proteínas usando la herramienta BLAST-P de NCBI (base de datos nr de proteínas, scorpiones, taxid: 9855), se extrajeron las secuencias con mayor grado de homología y se hizo alineamiento de múltiples secuencias mediante CLUSTALW (Guerrero-Vargas *et al.*, 2012). Finalmente, mediante la herramienta BLAST-P de Geneious, se analizaron estas secuencias contra la base de datos de los péptidos putativos encontrados a partir del análisis transcriptómico de la glándula de veneno de *T. forcipula*, y se realizó la modelación de la estructura tridimensional de los péptidos como se describió en el apartado de análisis transcriptómico (Corzo *et al.*, 2008).

7.1.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), se determinó el perfil electroforético del veneno entero, así como la homogeneidad y la masa molar aproximada de fracciones obtenidas durante las diferentes etapas del fraccionamiento cromatográfico por el método B (ver adelante). Se usó el siguiente protocolo estándar para proteínas con geles de tris-glicina (Erdes *et al.*, 2014). Se preparó el gel de resolución polimerizando acrilamida (30%) y bisacrilamida (1%) con persulfato amónico y TEMED. Se aplicó gel de apilamiento al 4% sobre gel espaciador al 12.5 % y gel separador al 20%. Las muestras se prepararon en condiciones reductoras (β -2-mercaptoetanol al 5% llevado a ebullición a 95°C por 7 minutos). La corrida se realizó durante 3 horas a 125 V. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% durante

5 minutos y se decoloró en una mezcla de ácido acético al 8% y metanol al 25%. El estándar de masas moleculares de amplio rango (6.5-200 kDa, S8445, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) se corrió en paralelo para estimar las masas molares de las fracciones.

Adicionalmente, para varias fracciones del último paso de fraccionamiento cromatográfico por el método B (ver adelante) se prepararon geles con Tris-tricina, según el protocolo de Schagger, 2006. Se utilizó un gel de corrida de 16.5%T, 6% C y un gel espaciador de 10%T, 3%C. Se corrió en paralelo el marcador de bajo rango (1.06-26 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU).

7.1.9 Ensayos electrofisiológicos

El veneno entero y varias de las principales fracciones purificadas hasta homogeneidad mediante el método B descrito atrás, se llevaron a experimentos de electrofisiología.

7.1.9.1 Soluciones para registro electrofisiológico

Se utilizó como solución extracelular la solución de Tyrode (en mM): 145 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucosa; pH 7.35. La solución interna (en mM) fue: 110 KCl, 5 K₂ATP, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 K₄BAPTA; pH 7.2.

7.1.9.2 Transfección transitoria de células HEK

Células HEK 293 se descongelaron, se sembraron en cajas de petri de 35 mm y se incubaron en medio modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, EE.UU) a 37°C bajo CO₂ al 5% hasta alcanzar una confluencia cercana al 75%. Las células se transfectaron con

lipofectamina 2000 (Invitrogen, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se diluyeron 15 μ L de lipofectamina 2000 en 375 μ L de DMEM. Por separado se adicionaron a 375 μ L de DMEM: 4 μ g del vector de la subunidad β del canal hNav1.5, 4 μ g del vector del gen SCN5A y 0.5 μ g del vector de la proteína verde fluorescente (GFP), homogenizando cuidadosamente cada dilución.

Después de cinco minutos se adicionó la suspensión de ADN a la lipofectamina y se dejó en incubación la mezcla de transfección a temperatura ambiente durante 30 minutos. En seguida se adicionó sobre las células el complejo lípidos-ADN. Las células se llevaron a incubación a 37°C bajo CO₂ al 5% y se examinaron y analizaron en las siguientes 24-72 horas. Cuando fue necesario, se cambió el medio de cultivo.

7.1.9.3 Registros electrofisiológicos

Se retiró el medio de cultivo, se adicionó un mL de tripsina al 0.5% y se incubó durante un minuto a 37°C. Se homogenizó la suspensión celular, se llevó a un tubo Falcon de 15 mL adicionando 4 mL de solución extracelular de Tyrode y se centrifugó a 800-1000 rpm durante un minuto. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 3-4 mL de solución de Tyrode. Se adicionaron 3-5 gotas de suspensión celular a la cámara de registro electrofisiológico y se dejó incubar por 10 minutos. Se seleccionaron para registros electrofisiológicos las células que mostraban expresión de GFP y corrientes máximas de sodio entre 500 y 10000 pA en el protocolo de registro de corriente máxima (ver adelante).

Las pipetas para “patch-clamp” se prepararon con capilares de vidrio borosilicato de 1.2 mm (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) con resistencia de 1-2 M Ω ,

usando un halador de pipetas P-2000 (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) y se llenaron con solución intracelular. Para los registros de corrientes se seleccionaron solamente células que expresaran la GFP. Las células se observaron con un microscopio invertido Olympus IX71 (Olympus LatinAmerica, USA). Se estableció el sello con resistencia eléctrica cercana a un $M\Omega$ entre el electrodo y la membrana celular y se indujo la ruptura mediante succión suave para realizar registros de las corrientes de sodio en modo de célula entera con fijación de voltaje (V-Clamp).

Para la perfusión de las células con las toxinas a ensayar y las soluciones de control, se utilizó un sistema de perfusión rápida presurizado con nitrógeno (<1 mbar), provisto de válvulas eléctricas controladas manualmente. Como control negativo se utilizó solución de Tyrode, y solución de lidocaína $100 \mu M$ como control positivo.

Los registros electrofisiológicos se realizaron mediante la aplicación sucesiva de dos protocolos experimentales. En el primer protocolo, las células se mantuvieron a un potencial de reposo de -80 mV. Para registrar la corriente total de Na^+ se hiperpolarizaron las células hasta un potencial de -130 mV durante 80 ms, seguido de un pulso despolarizante de -10 mV durante 40 ms con regreso al potencial de reposo. El intervalo entre estímulos fue de 1 s, aplicando en total 25 pulsos despolarizantes durante este protocolo (Figura 36A).

Para registrar la activación e inactivación estacionarias de la I_{Na} , se generó un segundo protocolo, consistente en la aplicación de pulsos de potencial con intervalos de 5 s entre pulso y pulso. El potencial de reposo se mantuvo en -80 mV y antes de cada pulso despolarizante se

aplicó un prepulso de -140 mV durante 80 ms, para maximizar la fracción de canales de Na⁺ en estado cerrado. Al finalizar el prepulso, se aplicaron los pulsos despolarizantes con duración de 40 ms, hasta alcanzar el potencial de +70 mV con incrementos de 10 mV. Esta estrategia activa las I_{Na} para construir la relación corriente-voltaje para la activación (relación I-V). Al terminar el pulso despolarizante se generó un pulso de 20 ms de duración a un potencial fijo de 0 mV para la investigación de la inactivación de estado estacionario (Figura 36B).

Antes de la perfusión, las células se levantaron del fondo de la cámara de registro y se verificó la calidad del sello, la resistencia total, la resistencia de acceso y la capacitancia de membrana, mediante el test de membrana. El protocolo experimental completo consistió en el registro de la corriente máxima (primer protocolo) mientras se perfundía la célula con solución de Tyrode, seguida de perfusión con la solución de toxina (wash-in) y nuevamente con solución de Tyrode (wash-out). Enseguida se cambió al protocolo de estimulación I-V (segundo protocolo) y se realizó la perfusión de la célula con solución de toxina (wash-in) seguida de perfusión con solución de Tyrode (wash-out). Luego se regresó al protocolo de corriente máxima mientras se perfundía la célula con solución de lidocaína 100 uM (wash-in), seguida de perfusión con solución de Tyrode (wash-out de lidocaína). Finalmente se realizó de nuevo el test de membrana para verificar la calidad del sello, la resistencia total y la resistencia de acceso.

Los datos se adquirieron mediante un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., USA), se digitalizaron mediante una interfase Digidata 1440A (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., USA), se almacenaron en un computador

utilizando el software pClamp 10 (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., USA) y se analizaron mediante Clampfit 10.2 (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., USA).

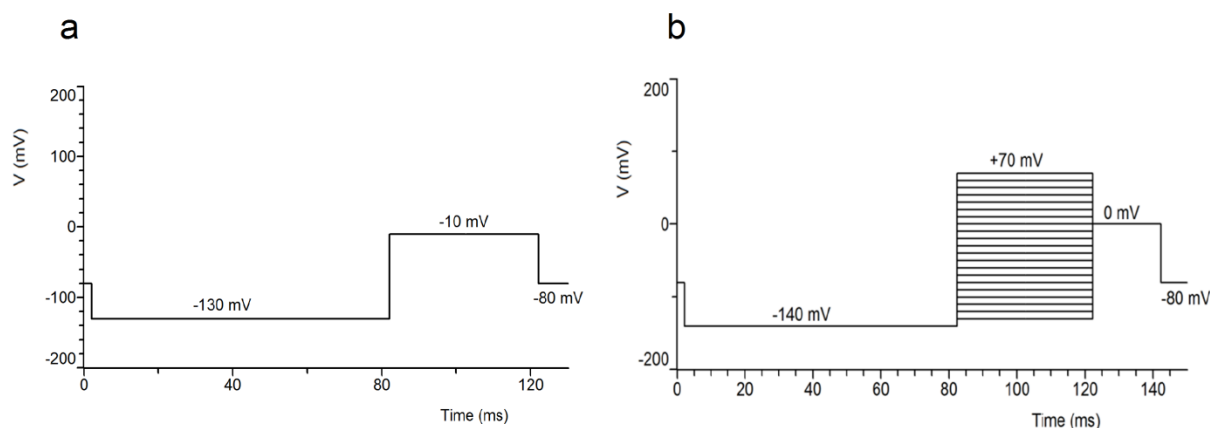


Figura 36. A. Protocolo de corriente máxima. B. Protocolo I-V para células HEK.

Solamente se tuvieron en cuenta para el registro, células con corrientes entre 500 y 10000 pA y capacitancia entre 20 y 30 pF, resistencia de acceso menor a 5 M Ω y resistencia de membrana cercana a 1 G Ω . La calidad del sello se verificó a lo largo del experimento mediante el test de membrana, y para el tratamiento de datos solo se tuvieron en cuenta células que mantuvieron buenas condiciones en el test de membrana durante el protocolo completo: $R_a < 5 \text{ M}\Omega$, $R_m > 1 \text{ G}\Omega$ (Meents y Lampert, 2016).

7.2 RESULTADOS

7.2.1 Fraccionamiento cromatográfico del veneno mediante el método A

La figura 37 muestra el perfil del fraccionamiento cromatográfico por HPLC del veneno entero de *T. forcipula*, obtenido a partir de la inyección de 2 mg de veneno soluble en una columna RP-C18. Con este método se eluyeron 42 picos cromatográficos bien definidos, y se

colectaron 51 fracciones diferentes separando "hombros", "colas" y la parte principal de los picos.

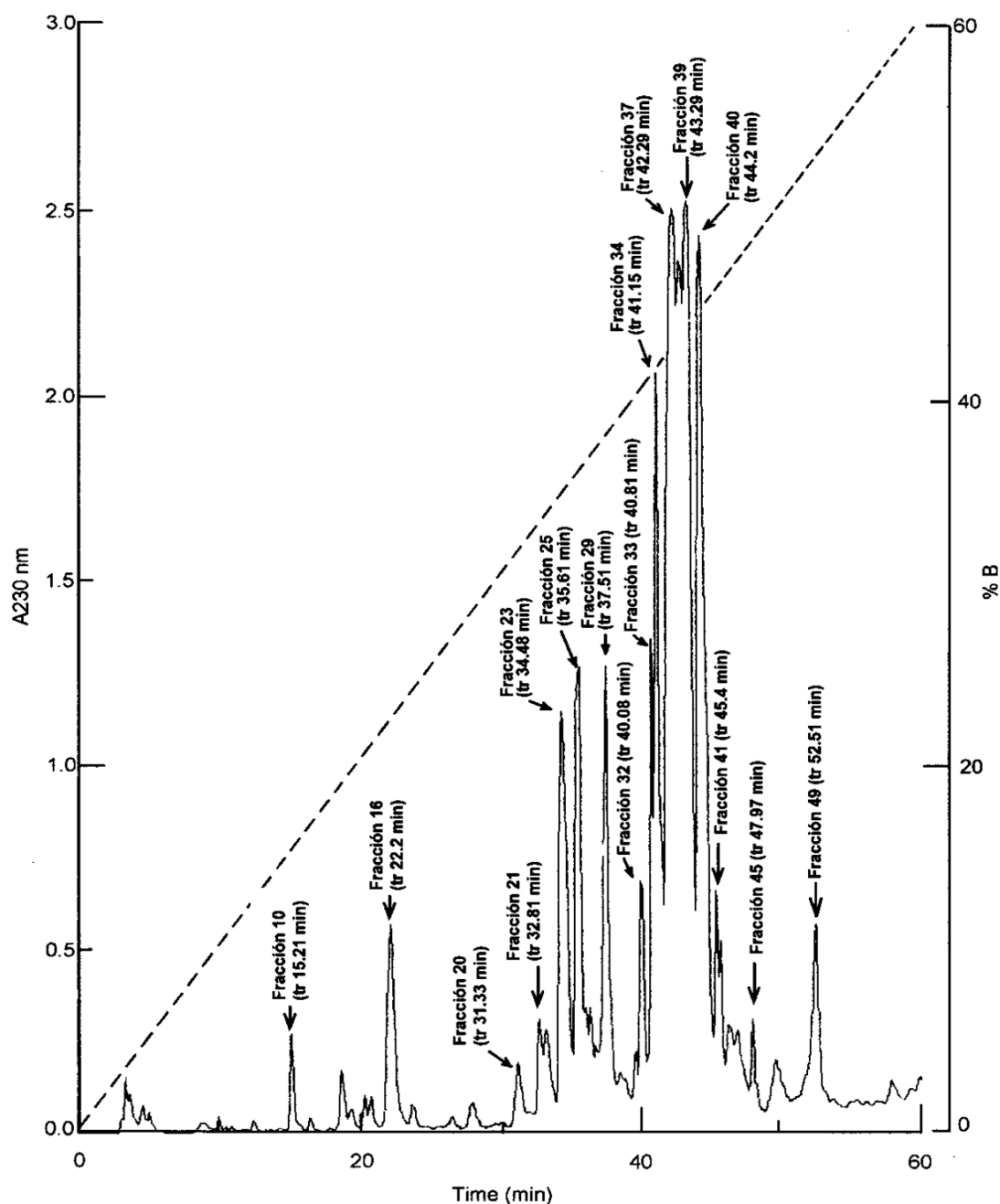


Figura 37. Cromatograma RP-HPLC del veneno soluble de *T. forcipula*. Se inyectaron 2 mg de veneno soluble de *T. forcipula* a una columna de fase reversa Vydac C18, y se fraccionaron con un gradiente lineal del solvente A (0.12% de ácido trifluoroacético -TFA- en agua) al 60% de solvente B (0.10% de TFA en acetonitrilo), durante 60 minutos, con flujo de 1mL/minuto. Se colectaron manualmente las fracciones, monitoreando la absorbancia a 280 nm. Se señalan con flechas en el cromatograma las fracciones más caracterizadas y sus tiempos de retención (min).

La tabla 17 resume el reporte de absorbancia y área bajo la curva de los picos cromatográficos con A>0.15 UA, que representan el 89% del área total bajo el espectro de absorbancia, y en teoría el 89% de la masa de proteína cargada en la columna (software Millenium).

Fracción	Tiempo de retención (min)	Abs (UV)	Abs (mAU)	Abs (AU)	%Area	Masa (ug)
10	15.207	268482	268.482	0.268482	0.64	12.8
16	22.19	560046	560.046	0.560046	2.78	55.6
20	31.323	172932	172.932	0.172932	0.76	15.2
21	32.807	285985	285.985	0.285985	0.84	16.8
22	33.323	257151	257.151	0.257151	1.26	25.2
23	34.39	1122639	1.122.639	1.122.639	5.88	117.6
24	35.44	1191687	1.191.687	1.191.687	1.94	38.8
25	35.623	1236944	1.236.944	1.236.944	3.12	62.4
27	36.44	309713	309.713	0.309713	0.76	15.2
29	37.507	1235202	1.235.202	1.235.202	4.88	97.6
32	40.09	649455	649.455	0.649455	2.09	41.8
33	40.823	1301214	1.301.214	1.301.214	2.48	49.6
34	41.157	2022941	2.022.941	2.022.941	7.24	144.8
37	42.323	2462502	2.462.502	2.462.502	14.84	296.8
38	42.807	231734	231.734	0.231734	4.16	83.2
39	43.29	2481275	2.481.275	2.481.275	13.01	260.2
40	44.207	2384093	2.384.093	2.384.093	12.79	255.8
41	45.407	608729	608.729	0.608729	1.34	26.8
42	45.707	470547	470.547	0.470547	1.14	22.8
43	46.323	249053	249.053	0.249053	1.12	22.4
44	46.907	224470	224.47	0.22447	1.2	24
45	47.99	254522	254.522	0.254522	0.75	15
46	49.64	139869	139.869	0.139869	0.56	11.2
47	49.89	114537	114.537	0.114537	0.45	9
49	52.507	501408	501.408	0.501408	2.9	58
50	56.907	11684	11.684	0.011684	0.04	0.8
Total					88.97	1 779.4

Tabla 17. Análisis del fraccionamiento por HPLC del veneno entero de *T. forcipula* con base en los reportes del software Millenium. Se han seleccionado las fracciones con A>0.15 UA, que se llevaron a determinación de masa molecular por ESI-MS. Se muestran sombreadas las fracciones más homogéneas obtenidas en el primer fraccionamiento por HPLC.

Aunque algunos componentes del veneno se colectaron en forma homogénea en el primer paso de purificación, las cantidades de proteína recuperada fueron insuficientes para ensayos de caracterización porque en la práctica se recupera menos del 50% del material cargado en la columna. Otras fracciones presentaron mayor contenido de proteína, pero el análisis de ESI-MS (Tablas 18 y 19) mostró que son fracciones con múltiples componentes, por lo cual se tuvieron que repurificar en pasos cromatográficos sucesivos.

En total se fraccionaron 47 mg de veneno soluble mediante el método A en varios ciclos de purificación, y se analizaron los cromatogramas para hacer *pooles* de fracciones equivalentes según el tiempo de retención. Los *pooles* se repurificaron con el mismo sistema cromatográfico y elución isocrática con proporciones de A y B seleccionadas según el tiempo de retención (TR) de las fracciones de interés y los porcentajes de eluyente B asociados con la elución. Con base en criterios de homogeneidad y TR, se seleccionaron varias fracciones para hacer ensayos de toxicidad en ratones BALB/C vía IP (20 µg proteína/20 g de masa corporal de ratón, en 50 µL de búfer PBS), y vía IC (2 µg de proteína/20 g de masa corporal de ratón en 5 µL de búfer PBS). En la tabla 18 se presentan de forma resumida estos resultados.

7.2.2 Análisis proteómico del veneno de *Tityus forcipula*

La Tabla 19 muestra el tiempo de retención de las fracciones cromatográficas con absorbancia mayor a 0.15 UA, y las masas moleculares de los principales componentes en cada fracción, según la determinación mediante ESI-MS. El fraccionamiento por HPLC generó 51 fracciones diferentes, de las cuales se llevaron a determinación de masa molecular por ESI-MS, las 36 fracciones con absorbancia mayor a 0.15 UA y solamente 24 fracciones reportaron iones significativos.

Fracción	Tiempo de retención (min)	Observación
29	37.507	Síntomas de intoxicación moderada, recuperación a las 2 hrs post-inyección. Sobrevive.
32	40.09	Síntomas de intoxicación moderada, recuperación a las 2 hrs post-inyección. Sobrevive.
33	40.823	Síntomas de intoxicación central y autónoma. Muerte en 67 min post-inyección.
34	41.157	Síntomas de intoxicación central y autónoma. Muerte en 31 min post-inyección.
37	42.323	Síntomas de intoxicación moderada, recuperación a las 2 hrs post-inyección. Sobrevive.
38	42.807	Síntomas de intoxicación moderada, recuperación a las 2 hrs post-inyección. Sobrevive.
39	43.29	Síntomas de intoxicación moderada, recuperación a las 2 hrs post-inyección. Sobrevive.
40	44.207	Síntomas de intoxicación moderada, recuperación a las 2 hrs post-inyección. Sobrevive.
41	45.407	Síntomas de intoxicación leve, recuperación a las 2 hrs post-inyección. Sobrevive.

Tabla 18. Resultados de ensayo de toxicidad en ratones BALB/C. Se inyectaron ratones BALB/C (17-20 g masa corporal) con 20 µg de proteína/20 g de ratón, suspendidos en 50 µL de agua tipo I, de las fracciones cromatográficas seleccionadas después del primer paso de purificación del veneno total mediante el método A.

Se identificaron 99 componentes en las fracciones analizadas. Los datos crudos se procesaron asumiendo que registros con diferencia menor a 2 Da se deben considerar como provenientes de una misma molécula (Olamendi-Portugal *et al.*, 2016), reduciendo el espectro de masas a 44 componentes con masas moleculares entre 282.0 a 20269.0 Da, y tiempos de retención entre 10 y 49 minutos. Los datos procesados se presentan en la tabla 20, y constituyen la huella dactilar de masas del veneno (Mass Fingerprint of the Venom, MFV) del

escorpión *T. forcipula*. Las masas moleculares por debajo de 2 KDa se muestran como masas monoisotópicas y por encima de 2 KDa como masas promedio.

FRACCIÓN	Tiempo de Retención (minutos)	Masa Molecular (Da)
10	15.21	282.0
16	22.20	282.0
20	31.33	3642.6
21	32.81	4151.35; 4185.5
22	33.27	4185.78; 4287.88
23	34.38	4118.45; 3735.4; 4185.85; 4118.9; 3736.22
25	35.61	4391.78; 3592.03; 4174.44; 3607.14; 1284.6; 4392.28; 3592.22; 1254.6; 3591.00
27	36.40	4174.32; 3895.4
29	37.51	3726.28; 7235.95
32	40.08	7296.03; 3685.4; 7951.04; 7313.0; 7296.97
33	40.81	7313.65; 7950.53; 3686.21; 5444.4; 7949.22; 7313.54; 5444.4; 5444.3; 5188.13; 10911.95; 5187.52; 5444.66; 10911.0
34	41.15	10911.91; 7350.76; 5444.57; 5188.87; 7350.76; 7295.0; 7378.0; 6931.0; 6897.0; 10911.88; 6930.9; 6897.08; 7295.44; 73777.4; 7294.36
35	41.45	6013.37; 7356.81
36	42.01	6013.0; 7296.78; 7357.6
37	42.29	7295.1; 6931.49; 6013.0; 7082.27; 10901.0; 7293.85; 6013.4; 6931.89; 7083.0; 7293.33
38	42.78	10912.2; 10633.87; 6499.71; 6930.85; 7117.9; 7083.05; 10934.74; 10635.24; 10914.65
39	43.29	7082.53; 10921.55; 10634.65; 7082.72
40	44.20	10609.18; 7929.2; 10608.23; 7928.0; 7082.0
41	45.40	11125.62; 7280.38; 10827.0
42	45.70	6753.08
43	46.31	6753.08
45	47.97	2762.02
46	49.66	23559.0
49	52.51	20269.0

Tabla 19. Huella dactilar de masas del veneno (Mass Fingerprint of the Venom, MFV) de *T. forcipula*. Datos crudos del análisis proteómico de los componentes del veneno de *T. forcipula* separados mediante HPLC. Los componentes se analizaron en un espectrómetro de masas LCQ-IT ThermoElectron/Finnigan.

Según este resultado, al menos 44 componentes diferentes están presentes en el veneno de *T. forcipula*, aunque es posible que otros componentes presentes en bajas concentraciones no hayan sido identificados, y que algunos de los componentes de menor masa puedan ser productos de degradación de otros de mayor masa. Además, al seleccionar los picos cromatográficos con absorbancia menor a 0.15 UA, el método podría excluir componentes del

veneno presentes en cantidades muy pequeñas. El componente más enriquecido en cada fracción se determinó según la abundancia relativa de los iones principales en el espectro ESI-MS, y se muestra subrayado en la tabla 20, donde se presenta la MVF depurada.

Fracción	Tiempo de Retención (minutos)	Masa Molecular (Da)
10	15.21	<u>282.0</u>
16	22.20	<u>282.0</u>
20	31.33	<u>3642.6</u>
21	32.81	<u>4151.4</u> ; 4185.7
22	33.27	<u>4185.7</u> ; 4287.9
23	34.38	<u>4118.7</u> ; 3735.8; 4185.7
25	35.61	4392.0; <u>3591.8</u> ; 4174.4; 3607.1; 1284.6
27	36.40	<u>4174.4</u> ; 3895.4
29	37.51	<u>3726.3</u> ; 7235.0
32	40.08	<u>7295.6</u> ; 7313.3; 7950.6; 3685.8
33	40.81	<u>7313.3</u> ; 7950.6; 3685.8; 5188.4; 5444.5; 10912.3
34	41.15	10912.3; <u>5444.5</u> ; 5188.4; 7350.8; 6897.0; 6930.0; 7295.6; 7377.7
35	41.45	<u>6013.2</u> ; 7357.2
36	42.01	6013.2; 7295.6; <u>7357.2</u>
37	42.29	7295.6; <u>6931.3</u> ; 6013.2; 7082.6; 10901.0
38	42.78	10912.3; 10634.6; <u>6499.7</u> ; 6931.3; 7117.9; 7082.6; 10934.7
39	43.29	<u>7082.6</u> ; 10921.6; 10634.6
40	44.20	7082.6; <u>10608.7</u> ; 7928.6
41	45.40	<u>11125.6</u> ; 7280.4; 10827.0
42	45.70	<u>6753.1</u>
43	46.31	<u>6753.1</u>
45	47.97	<u>2762.0</u>
46	49.66	<u>23559.0</u>
49	52.51	<u>20269.0</u>

Tabla 20. Huella dactilar de masas del veneno soluble de *T. forcipula* (fingerprint) depurada. Análisis proteómico de los componentes del veneno de *T. forcipula* fraccionados mediante HPLC. Los componentes se analizaron en un espectrómetro de masas LCQ-IT ThermoElectron/Finnigan. Se han subrayado las masas de los componentes más enriquecidos en cada fracción.

En la figura 38 se presenta la distribución absoluta de masas moleculares de los componentes encontrados en el MFV de *T. forcipula*. Rangos de masa moleculares de 1-3 y 3-5 kDa se asocian típicamente con toxinas que modifican la permeabilidad de los canales

K_V, en tanto que los rangos de masa de 5-7 y 7-10 kDa usualmente incluyen las toxinas que modifican la permeabilidad de los canales Na_V, como se discute más adelante. Los componentes con masas moleculares de 10-20 kDa usualmente corresponden con diferentes clases de enzimas (Olamendi-Portugal *et al.*, 2005; Cid-Urbe *et al.*, 2019).

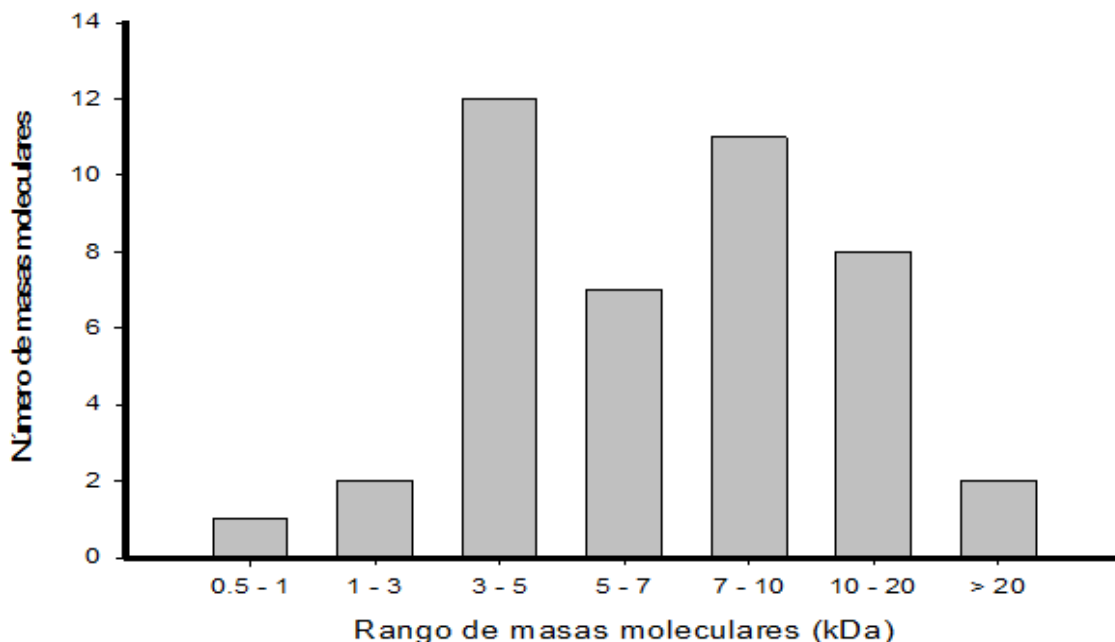


Figura 38. Distribución absoluta de masas moleculares de los componentes encontrados en el MFV de *T. forcipula*. Rangos de masa molecular de 1-3 y 3-5 kDa se asocian típicamente con toxinas que modifican la permeabilidad de los canales K_V, en tanto que los rangos de masa de 5-7 y 7-10 kDa usualmente incluyen las toxinas que modifican la permeabilidad de los canales Na_V. Los componentes con masas moleculares de 10-20 kDa usualmente corresponden con enzimas.

Las fracciones seleccionadas según los criterios de mayor toxicidad en ensayos con ratón, se repurificaron bajo las mismas condiciones del método A y gradiente modificado (10% a 45% de eluyente B), buscando mejorar la resolución. Brevemente, se obtuvieron componentes homogéneos de la fracción 32 (produjo componentes homogéneos con masa de 7296.97, 3685.4, 7951.04 y 7313 Da), la fracción 33 (masa de 7317, 7950 Da, 5444 Da, 5189 y 10911 Da), la fracción 34 (masa de 10911.8, 7357, 7293, 7378, 6930.98 y 6897.08 Da), la fracción 37 (masa de 7293.85, 6013.4, 6931.89, 7083 y 10901 Da), la fracción 38 (masa de 6930.85,

7117.9, 7083.05, 10934.74, 10635.24 y 10914.65 Da), la fracción 39 (7082,72 Da) y la fracción 40 (masa de 10608.23, 7928 y 7082 Da). También se repurificó la fracción 41, que no fue tóxica en ratón (un componente homogéneo de 10827 Da). La figura 39 muestra ejemplos de repurificación de algunas de las fracciones hasta la obtención de sus componentes principales en forma homogénea.

7.2.3 Secuenciación de péptidos homogéneos

En el paso final del análisis proteómico se determinaron las secuencias aminoacídicas de algunos péptidos del veneno de *T. forcipula* mediante degradación automatizada de Edman. Cada péptido se denominó con nombre trivial compuesto del número de la fracción de la cual fue aislado, y el tiempo de retención (tr, en min). Se determinó la secuencia completa del componente principal de la fracción 25 (péptido con TR 35.61 min, masa de 3591 Da), denominado con el nombre trivial Frac_25(tr35.61). Se obtuvo la secuencia de 35 residuos: TGPQTVCEASICEAACKQMGKSMESCQGDACKCKA. La parte subrayada muestra la secuencia obtenida por degradación de Edman directa, en tanto que la parte restante se obtuvo por secuenciación de fragmentos de digestión del péptido RC con la endoproteasa Glu-C. El peso molecular de la secuencia obtenida se estimó en 3598 Da (Expassy.org).

Brevemente se ejemplifican a continuación los resultados de los diferentes pasos de la secuenciación completa de la toxina Frac_25(tr35.61), realizados según la metodología expuesta antes.

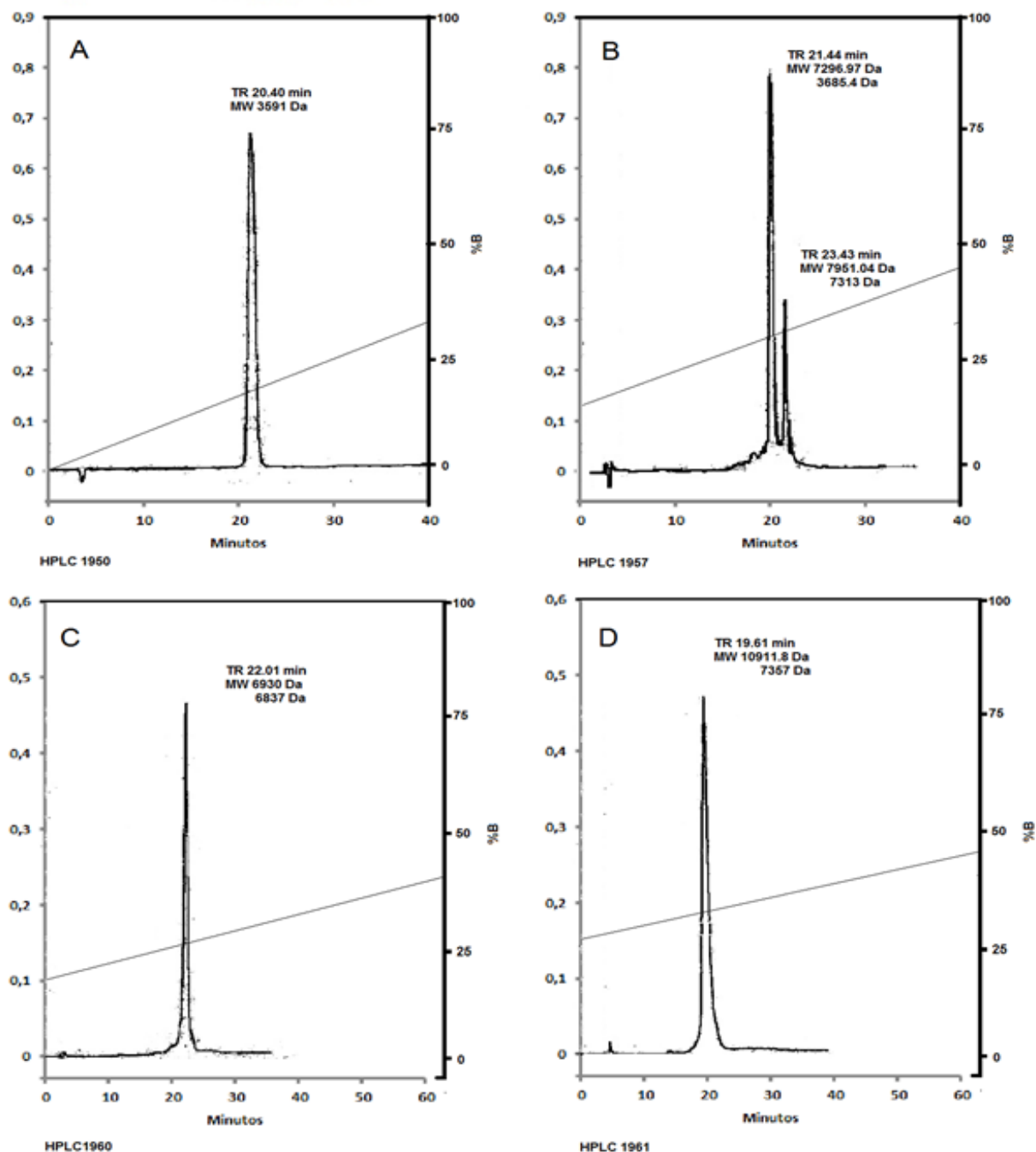


Figura 39. Ejemplos de repurificación de algunas de las fracciones cromatográficas. Mediante el método A Se repurificaron fracciones seleccionadas según criterios de homogeneidad y toxicidad. Las muestras se inyectaron en una columna RP- C18 (Vydac), y se fraccionaron con un gradiente lineal del solvente A (0.12% de ácido trifluoroacético -TFA- en agua) a solvente B (0.10% de TFA en acetonitrilo), seleccionado según el tiempo de retención de la fracción a repurificar, con flujo de 1mL/minuto. Se colectaron manualmente las fracciones (A= 280 nm). A) Repurificación de frac_25(tr 35.61), KTx de pm 3591 Da. B) Repurificación de frac_325(tr 40.08 min), que produjo al menos cuatro componentes de distinta masa (7297, 3685, 7951 y 7313 Da) C) Repurificación de frac_34(tr 41.15 min), que produjo el componente más tóxico (pm 7357 Da), junto con otro componente (10911.8 Da). D) Repurificación de frac_39(tr 43.29 min), que produjo en forma homogénea el componente más abundante del veneno de *T. forcipula* (pm 7082 Da).

T G P Q T V C E A S I C E A A C K Q M G G S S X
H D K M ?

La masa del péptido RC fue de 3939 Da, indicando la presencia de 6 residuos Cys (Ecuación 1). Se hizo cromatografía a los fragmentos de digestión y sus masas se determinaron mediante ESI-MS. Se simuló la digestión del péptido con Protein Prospector y

parte determinada por degradación directa de Edman, ya sea del péptido nativo o del péptido RC, en tanto que el resto de la secuencia se obtuvo a partir de la digestión con la endoproteasa indicada en la tabla.

Se estableció la identidad entre las toxinas secuenciadas y los péptidos putativos mediante búsqueda BLAST-P de los péptidos secuenciados contra la base de datos nr de NCBI (taxid scorpion: 9855) y contra la base local de péptidos putativos encontrados en el transcriptoma de la glándula del veneno de *T. forcipula*. Estos resultados ya fueron mostrados en la tabla 16 y discutidos en la sección anterior.

Fracción	Tiempo de retención (min)	PM del péptido nativo (Da)	PM del péptido RC (Da)	Número de residuos Cys	Digestión	Secuencia	Completa N-terminal
25	35.61	3591	3939	6	Glu-C	<u>TGPQTVCEAS ICEAACKQMG</u> <u>KSMESCQGD</u> CKCKA	x
37	42.29	6932	7392	8	Asp-N	<u>KEGYLLGPDG CKVSCFIPRA</u> <u>GYCP</u>	x
39	43.29	7082	7544.51	8	Asp-N	<u>KEGYPLDTLN GCKVGCF</u> <u>FGS NSWCNDKCKS</u> <u>SKAETGYCKA</u> PK	x
32	40.0	7296	NA	NA	NA	ARDGYPISK NYCPYCPDT KVXKKCTKNR A	x
33	40.81	7313.95	7777	8	NA	KKDGYPAKKN GCCYLCEPYT KVCKKM	x
36	42.01	7357	7839	8	Glu-C	<u>KKDGYPLEYN NCAYICLGYE</u> <u>NAYCDKLCKD</u> <u>WKADSGYCYW</u> <u>ANILCYCV</u>	x
38	42.78	10914	11258.93	6	NA		NA

Tabla 21. Resultados de la secuenciación por degradación automatizada de Edman, de péptidos aislados del veneno entero de *T. forcipula*. Se indica la fracción cromatográfica en la que el péptido es el componente principal, la masa molecular del péptido nativo y del péptido RC (cuando fue sometido a este proceso), el número de residuos Cys calculados a partir de la masa molar del péptido RC, el tipo de digestión enzimática que se realizó para la secuenciación, y la secuencia aminoacídica completa o parcial. Se ha subrayado la secuencia obtenida por degradación directa, en tanto que la parte restante se obtuvo a partir de fragmentación con la endoproteasa indicada en la tabla. Glu-C, endoproteasa V8, cliva el lado carboxilo de enlaces E-X. Asp-N, endoproteasa aspártico N-terminal, cliva en el lado amino de enlaces D-X. NA, no se realizó el procedimiento.

7.2.4 Purificación mediante el método B para experimentos de electrofisiología

En el primer paso de purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), se obtuvieron cinco fracciones (I a V) correspondientes a los picos cromatográficos agudos que se muestran en la figura 40, a partir de la inyección de 147.6 mg de veneno de *T. forcipula* en una columna Superdex 75. Las fracciones colectadas se llevaron al segundo paso de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (IEX) en una columna MONO-S HR 5/5. Las fracciones colectadas se concentraron al vacío para ensayos de toxicidad y purificación adicional.

Los ensayos de toxicidad mostraron que las toxinas del veneno eluyeron en la fracción III, que fue letal en ratón, 37 minutos después de la inyección vía IP (20 mg/20 g de ratón), resultado consistente con reportes previos sobre el fraccionamiento del veneno de escorpión mediante SEC (Olamendi-Portugal *et al.*, 2005). Con base en este resultado, los procedimientos subsiguientes se centraron en la fracción III, aunque todas las fracciones se llevaron al segundo paso de purificación. La fracción I produjo cuatro sub-fracciones eluyendo entre 10 y 50% de B (TR entre 10 y 50 min). La fracción II produjo una sub-fracción principal que eluyó a 100% de B y varias sub-fracciones menores. La fracción III produjo 17 sub-fracciones principales que eluyeron principalmente entre 6 y 37% de B (TR entre 6 y 37 min). La fracción IV produjo una sola sub-fracción que eluyó aproximadamente al 35% de B (TR cerca a 35 min). La fracción V produjo varias sub-fracciones eluyendo entre 10 y 50% de B (TR entre 10 y 50 min). En la figura 40A se muestra el cromatograma del fraccionamiento del veneno de *T. forcipula* mediante SEC, y se ilustra la repurificación mediante cromatografía IEX, para las fracciones II, III y IV (insertos B, C y D, respectivamente).

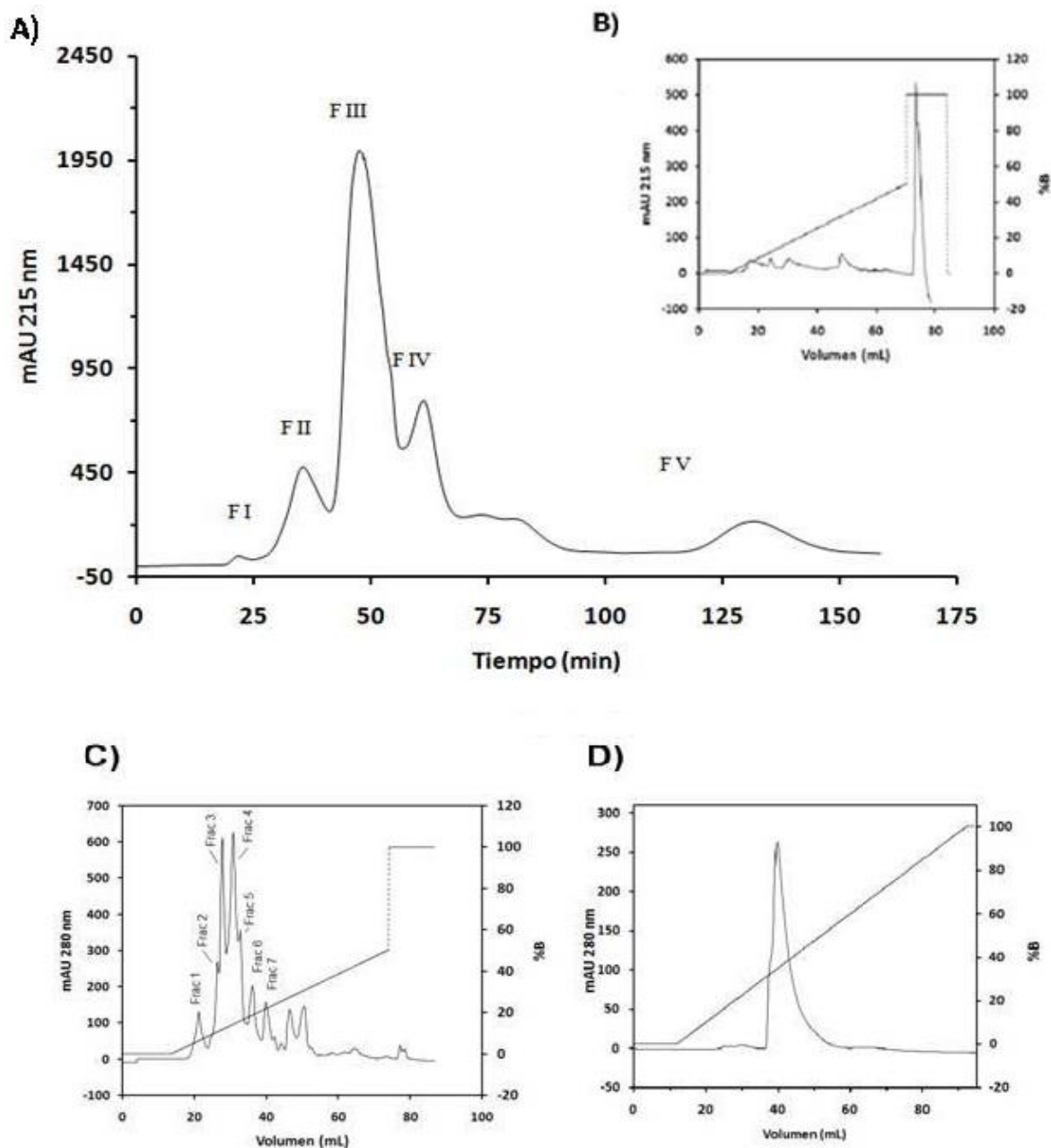


Figura 40. Purificación del veneno de *T. forcipula* mediante el método B. A) Fraccionamiento por SEC del veneno entero de *T. forcipula*. Se cargaron 147.6 mg de veneno soluble en una columna Tricorn empacada en nuestro laboratorio con Superdex 75, equilibrada con búfer de elución (acetato de amonio 0.1M, pH 4.7, flujo de 0.8 mL/min. Las fracciones se colectaron manualmente (A=215 y 280 nm), se resuspendieron en búfer A (acetato de amonio 20 mM pH 4.7) y se llevaron al segundo paso cromatográfico (IEX) en una columna MONO-S HR 5/5, equilibrada con búfer A, cargando la columna mediante la bomba de muestra, y eluyendo con gradiente lineal de 0-50% de búfer B (NaCl 1M, flujo de 1 mL/min). Las fracciones se colectaron manualmente (A=280 nm). En B, C y D se muestran los cromatogramas del fraccionamiento por IEX de las fracciones II, III y IV respectivamente.

Mediante SDS-PAGE se analizó la composición global de las subfracciones de la fracción III y se decidió repurificar, mediante cromatografía de fase reversa (RP), las de mayor interés en términos de su contenido de péptidos específicos para canales Na_v . Partiendo de este criterio se repurificaron en el paso final las subfracciones 1 a 8, que se resuspendieron en eluyente A (TFA al 0.12% v/v), se inyectaron en una columna C18 Supelco, se eluyeron con gradiente lineal de A a 60% de B (TFA al 0.1% v/v en acetonitrilo), se colectaron manualmente y se secaron al vacío para realizar los ensayos electrofisiológicos.

La subfracción III-1 produjo 17 componentes, dos de ellos en forma de picos cromatográficos definidos con gran absorbancia, eluyendo al 50.2 y al 54.5% de B respectivamente. La subfracción III-2 produjo 7 componentes, dos de ellos en forma de picos cromatográficos claros con gran absorbancia, eluyendo al 50 y al 53.7% de B respectivamente. De la subfracción III-3 se colectaron 6 componentes y tres fueron picos cromatográficos definidos, con gran absorbancia (47.1%, 48.3% y 51.6% de B). La subfracción III-4 produjo 16 componentes, al menos ocho como picos cromatográficos claros con gran absorbancia. La subfracción III-5 produjo al menos 12 componentes, tres en forma de picos cromatográficos definidos, con gran absorbancia. Similarmente se purificaron las subfracciones III-6, III-7 y III-8. En la figura 41 se muestran los cromatogramas de varias de las subfracciones purificadas mediante este paso final, junto con los correspondientes geles de la SDS-PAGE.

Para establecer parámetros de comparación entre las fracciones cromatográficas del método A y las del método B, se inyectó 1 mg de veneno entero de *T. forcipula* a la columna C-18 Supelco y se fraccionó como en el paso final de repurificación según el método B. En el

correspondiente cromatograma (Figura 42), se han señalado los picos cromatográficos claramente definidos que corresponden con las fracciones obtenidas en la purificación del veneno por HPLC según el método A (Columna C18, Vydac).

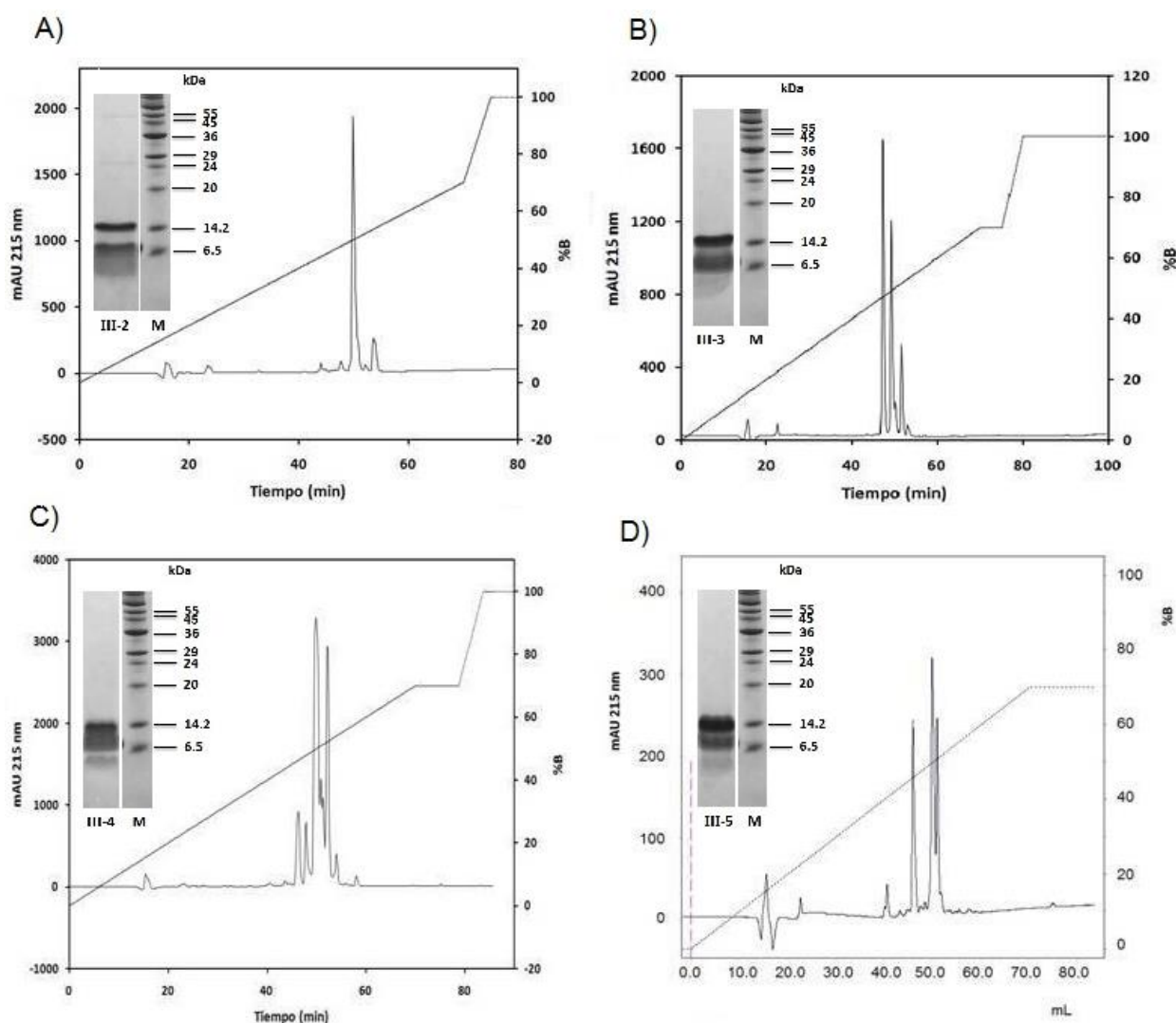


Figura 391. Repurificación de fracciones del veneno de *T. forcipula* mediante el método B. Las fracciones obtenidas de la purificación por IEX se secaron, se resuspendieron en eluente A (TFA al 0.12% v/v) y se cargaron en una columna analítica de fase reversa C18 Supelco, equilibrada con solución A. Las fracciones se eluyeron con gradiente lineal de A a 60% de B (TFA al 0.1% v/v en acetonitrilo), flujo de 1 mL/min, y se colectaron manualmente (A=280 nm). En A, B, C y D, se muestra el cromatograma correspondiente a la purificación final de las fracciones III-2, III-3, III-4 y III-5, respectivamente. En cada gráfica, el inserto muestra el correspondiente gel SDS-PAGE de la fracción. El contenido de proteínas en el rango de masa molar de las NaTx se usó como criterio para seleccionar las muestras a purificar.

Aunque hay diferencias entre los cromatogramas RP-C18 del veneno entero obtenidos por los métodos A y B (los tiempos de retención son mayores en la columna C-18 Supelco del método B, y en las condiciones del método A se logra mejor resolución y obtención de mayor número de fracciones mediante la columna C-18 analítica), los perfiles cromatográficos son suficientemente similares para postular la equivalencia de las fracciones principales entre los dos cromatogramas, tal como se muestra en la figura 42, donde los números utilizados corresponden a las fracciones del cromatograma inicial del método A (figura 37).

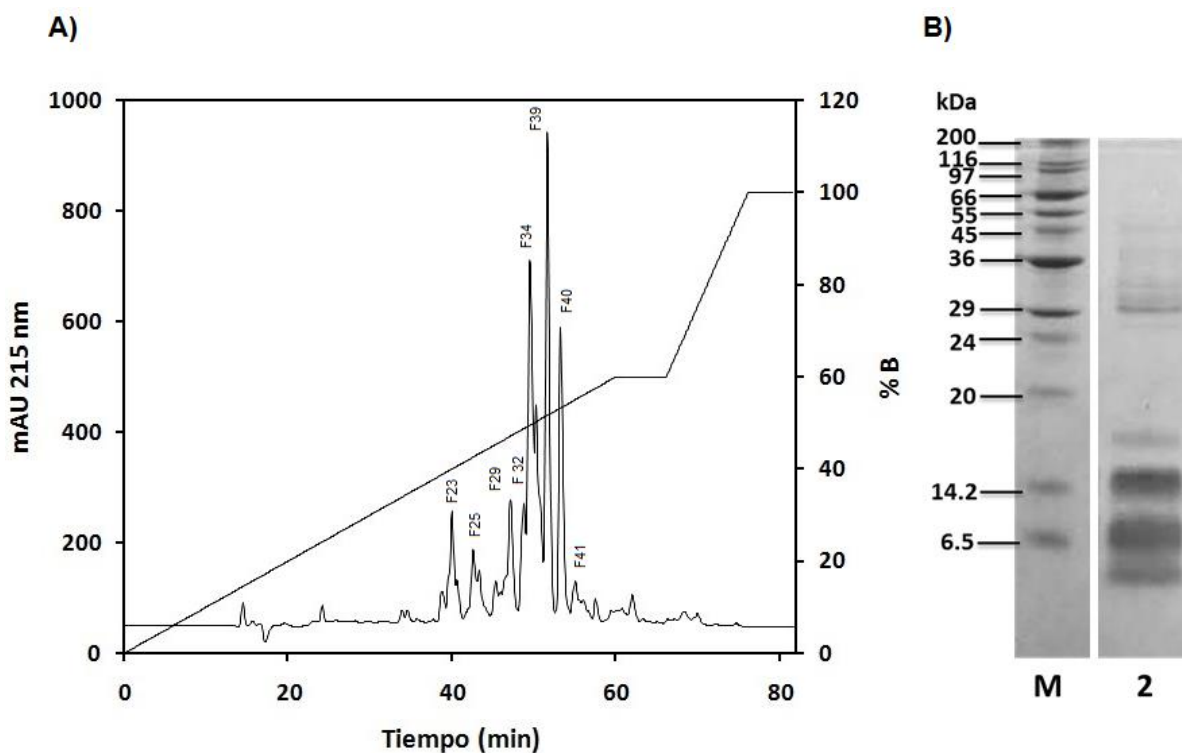


Figura 42. Cromatografía RP del veneno entero de *T. forcipula*. Se resuspendió en eluyente A (TFA al 0.12% v/v) 1 mg de veneno entero, y se cargó en una columna analítica de fase reversa C18 Supelco, equilibrada con solución A. Las fracciones se eluyeron con gradiente lineal de A a 60% de B (TFA al 0.1% v/v en acetonitrilo), flujo de 1 mL/min, y se colectaron manualmente (A=280 nm). En A, se muestra el cromatograma correspondiente, donde se han identificado picos equivalentes a los del cromatograma HPLC 1924. B) Electroforesis SDS-PAGE del veneno entero.

7.2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Se realizaron electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con geles de resolución de acrilamida-bisacrilamida al 20%, corriendo en paralelo el estándar de masas moleculares de amplio rango (6.5-200 KDa). También se realizó SDS-PAGE para varias fracciones del último paso de fraccionamiento cromatográfico por el método B, preparando geles con tris-tricina y corriendo en paralelo un marcador de peso molecular de rango ultra

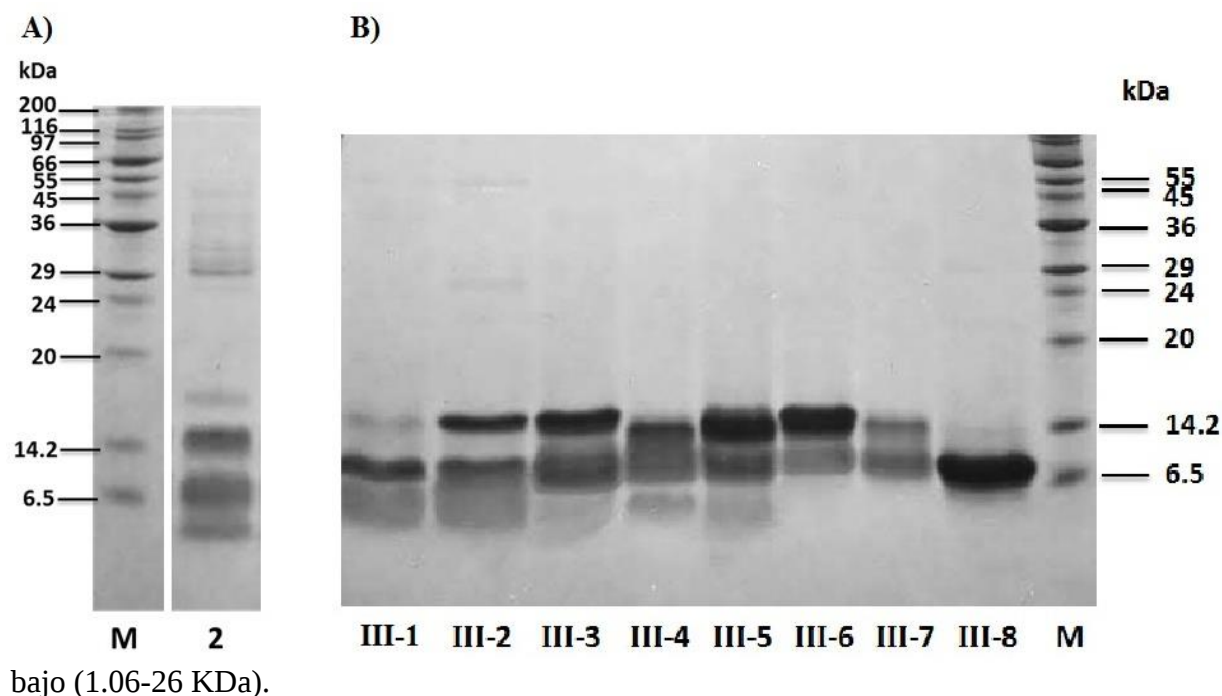


Figura 43. Resultados de la Electroforesis del veneno de *T. forcipula* en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). A) Veneno entero. B) Fracciones III-1 a III-8

La figura 43A muestra el gel resultante de la electroforesis del veneno entero en condiciones desnaturizantes en geles de tris-glicina, en tanto que la figura 43B muestra el gel de la SDS-PAGE de las fracciones III-1 a III-8. Los carriles correspondientes a las fracciones mostradas en los cromatogramas de la figura 41 se han incluido también como insertos en cada panel.

En la figura 43A se observa una primera banda bien definida, correspondiente a componentes con masa menor a 6.5 KDa, que incluye principalmente toxinas que actúan específicamente sobre los canales K_v , de acuerdo con reportes previos para el veneno de bútidios. La segunda banda es más intensa y ancha, y corresponde a péptidos con masa cercano a 6.5 KDa (pero menor a 14.2 KDa), que incluye principalmente toxinas específicamente activas sobre canales Na_v , según reportes previos para venenos de bútidios (Olamendi-Portugal et al., 2005). La tercera banda corresponde a componentes con masa alrededor de 14.2 KDa. Estas tres bandas comprenden la mayor parte de los componentes del veneno entero de *T. forcipula*. Después se observa una cuarta banda de componentes con masa cercana a 17 KDa, como se pudo establecer mediante la SDS-PAGE con tris-tricina y el marcador de peso molecular de rango ultra bajo (Figura 41). También se observa una banda bien definida alrededor de 20 KDa, y varias bandas más tenues entre 29 y 45 KDa, con dos de ellas bien definidas cerca al marcador de 36 KDa y dos más cerca al marcador de 45 KDa. No se detectaron en estas condiciones componentes con masa mayor a 45 KDa.

La figura 43B muestra los resultados de la SDS-PAGE de las fracciones III-1 a III-8, obtenidas en el segundo paso cromatográfico del método B. Se observa que en todas estas fracciones la purificación ha excluido los componentes con masa mayor a 14.2 KDa. La fracción III-1 muestra la presencia de tres bandas electroforéticas principales (cerca a 14.2 KDa, cerca a 6.5 KDa y menor a 6.5 KDa), siendo más intensa y ancha la banda alrededor de 6.5 KDa.

Combinando la información de la SDS-PAGE y el cromatograma RP-C18 de la fracción III-1, se postula que la subfracción principal (TR de 52 min), sería equivalente con la fracción

39 del método A (Figura 42), y estaría por tanto enriquecida en el péptido con masa de 7082 Da (Tabla 20). Similarmente, el segundo pico cromatográfico (TR de 55 min) corresponde a componentes con masa cercana a 14.2 KDa según la SDS-PAGE, y equivaldría a la fracción 41 del método A, enriquecida en el péptido de masa 11125 Da (Tabla 20). Finalmente, los componentes con masas menores a 6.5 KDa en la SDS-PAGE incluyen los péptidos correspondientes a KTx, que en el cromatograma de la figura 40 corresponden a los picos pequeños con TR menor a 50 min.

Según este razonamiento, las tres bandas de la SDS-PAGE de la fracción III-2 (14.2 KDa, 6.5 KDa y < 6.5 KDa), corresponden con los picos bien definidos del cromatograma de la figura 42A. El pico con TR 50 min sería equivalente con la fracción 36 del método A (enriquecida en el péptido de masa 7357 Da), el pico con TR 53.6 min equivaldría con la fracción 40 del método A (su principal péptido con masa 10608 Da), y los picos con TR < 50 min equivaldrían con fracciones del método A que incluyen las KTx.

El mismo razonamiento, analizando juntos los resultados del método A (cromatograma de la Figura 37 y el MFV obtenido mediante ESI-MS de las fracciones con $A > 0.15$, tabla 20), con los resultados del método B (cromatograma FPLC de la figura 42 y distribución de masas de las SDS-PAGE mostradas en la figura 43), permite proponer los resultados que se resumen en la tabla 22 para cada una de las subfracciones de la fracción III.

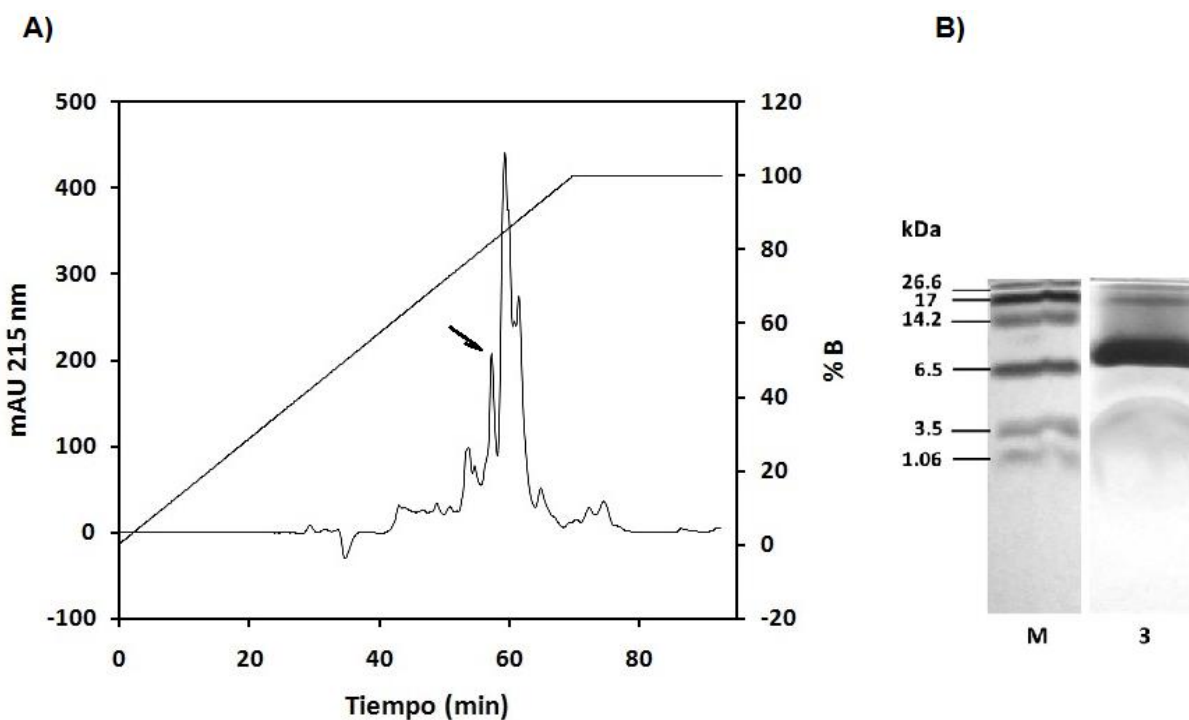


Figura 44. SDS-PAGE con tris-tricina de la fracción III-4 del veneno de *T. forcipula* obtenida mediante el primer paso cromatográfico del método B. Las subfracciones del fraccionamiento final de la fracción III-4 se corrieron en SDS-PAGE con geles de tris-tricina. A) Cromatograma RP-C18 de la fracción III-4. La flecha señala la subfracción III-4(3). B) Patrón electroforético de la subfracción III-4(3). La subfracción muestra homogeneidad en un componente de masa mayor a 6.5 KDa, con una tenue banda contaminante de masa cercana a 17 KDa.

La SDS-PAGE también muestra que los componentes con masa <6.5 KDa (KTx) se concentran principalmente en las subfracciones III-1 y III-2, van disminuyendo en las subfracciones III-3 y siguientes, y no se encuentran en las fracciones III-6 a III-8. Componentes con masa mayor a 14.2 KDa están presentes en todas las subfracciones excepto en la III-8, con mayor concentración en las fracciones III-5 y III-6. Péptidos con masa cercana a 6.5 KDa se encuentran en todas las subfracciones, y la subfracción III-8 contiene estos componentes en forma más homogénea que todas las otras subfracciones (Figura 43B).

Método B				Método A		
Fracción	Subfracción	TR (min)	PM (kDa)*	Fracción	TR (min)	PM (Da)**
III-1	16	52	6.5	39	43.29	7082
III-1	17	55	14.2	41	45.4	11125.6
III-2	12	50	6.5	36	41.45	7357
III-2	13	53.7	14.2	40	44.2	10608
III-3	8	47.1	6.5	29	37.51	7235
III-3	9	49.3	6.5	34	41.15	7350
III-3	11	51.6	14.2	39	43.29	10921.6
III-3	12	55	14.2	41	45.4	11125.6
III-4	9	46.2	6.5	29	37.51	7235
III-4	10	47.8	6.5	29	37.51	7235
III-4	11	49.8	14.2	34	41.15	10912.3
III-4	14	52.2	14.2	37	42.29	10901
III-5	1	45.9	<6.5	27	36.4	4174.4
III-5	3	49.8	14.2	34	41.15	10912.3
III-5	4	50.9	14.2	37	42.02	10901

Tabla 22. Comparación del fraccionamientos del veneno de *T. forcipula* por los métodos A y B. Se han analizado juntos los resultados del cromatograma HPLC del método A (Figura 22) y el MFV (Tabla 11), con el cromatograma FPLC del método B (Figura 40) y el análisis de masas aproximadas de las SDS-PAGE (Figura 41), para proponer la equivalencia de subfracciones homogéneas obtenidas por el método B (fracción III), con subfracciones homogéneas obtenidas por el método A. TR, tiempo de retención en minutos. (*) PM estimado a partir de SDS-PAGE. (**) PM determinado mediante ESI-MS.

Las subfracciones de la fracción III-4 se corrieron en geles de tris-tricina con el marcador de ultra bajo rango (1.06-26 KDa), pero no se obtuvo información adicional sobre el peso molecular de los componentes de interés, que son los péptidos con masas cercanas a las de NaTx. En la figura 44 se muestra uno de estos geles, junto con el cromatograma de la fracción. Se observa que la subfracción presenta gran homogeneidad, enriquecida en componentes con peso molecular cercano a 7 KDa y una tenue banda de un contaminante con masa muy próxima a 17 KDa.

7.2.6 Evaluación de la actividad cardiotoxica mediante experimentos de electrofisiología

La figura 45 muestra registros típicos de los experimentos electrofisiológicos con veneno entero de *T. forcipula* a concentraciones de 7.5 ng/ μ L, 150 ng/ μ L y 750 ng/ μ L, utilizando clamp de voltaje en el modo de célula entera en células HEK 293. Las corrientes de canales hNa_v1.5 se midieron con perfusión de solución control y toxina, mediante un protocolo de corriente máxima y un protocolo I-V.

El veneno entero de *T. forcipula* inhibió la corriente máxima en una forma dependiente de la concentración. A una concentración de 750 ng/ μ L (7.5 μ g/mL), el veneno inhibió 90-95% de la corriente máxima, en tanto que a una concentración de 150 ng/ μ L (150 μ g/mL), inhibió 50-60% de la corriente máxima y a concentración de 7.50 ng/ μ L (7.5 μ g/mL), inhibió el 10% de la corriente (n=3-5 para cada concentración) (Figura 45). El veneno entero a concentración de 7.5 μ g/ μ L desplazó la curva de activación hacia la izquierda 20 mV (Figura 46B), y el mismo efecto se observó a concentración de 150 y 750 ng/ μ L (Datos no mostrados).

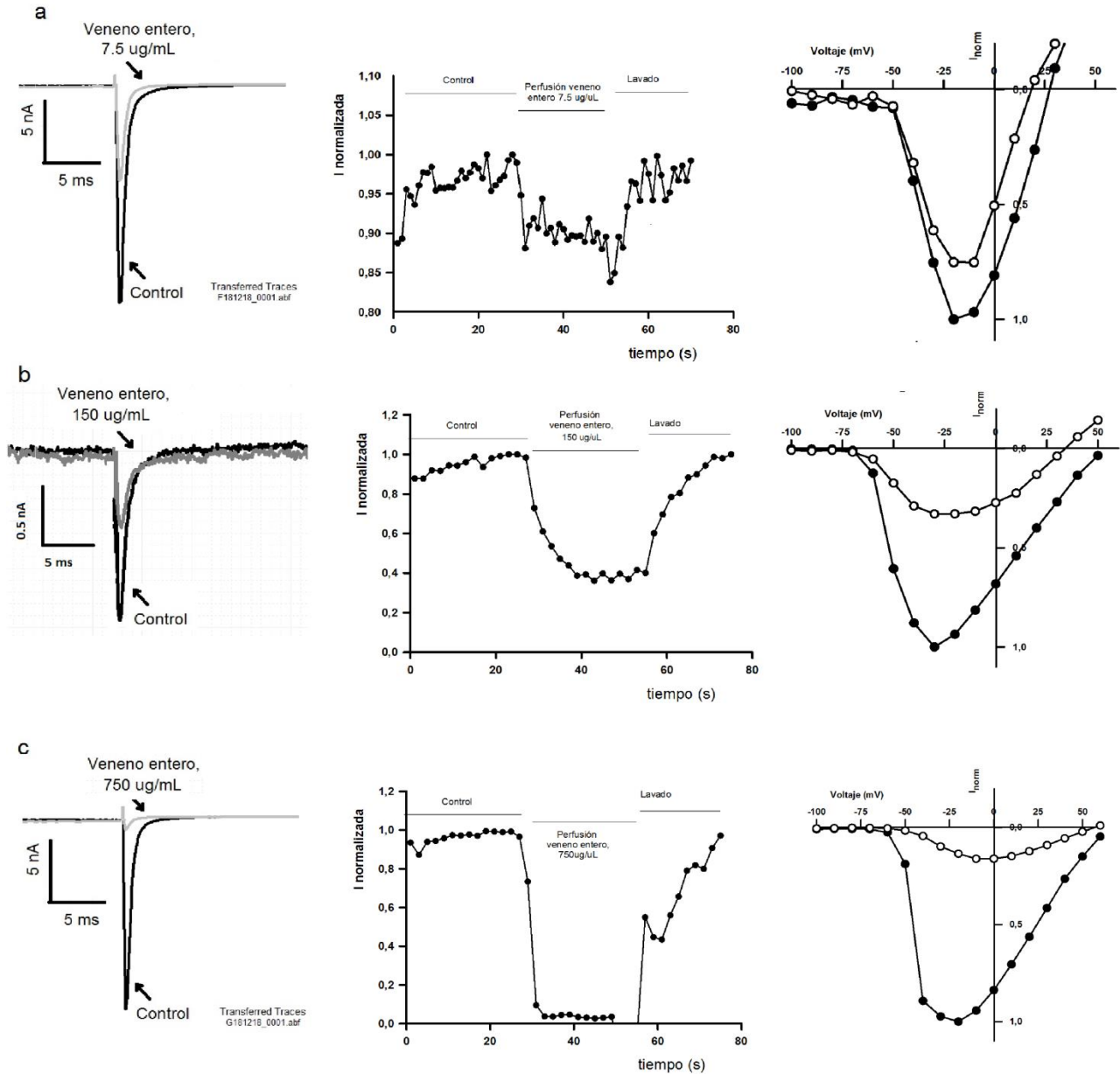


Figura 45. Efecto del veneno entero de *T. forcipula* a tres concentraciones sobre los registros de corriente de sodio en hNav1.5 durante experimentos de patch-clamp en modo célula entera (whole-cell). A) Concentración 7.5 µg/mL, B) 150 µg/mL C) 750 µg/mL. En cada caso, el panel izquierdo muestra trazas representativas de corriente elicitada mediante el protocolo de corriente máxima en el modo whole-cell (pacing-pro, estimulación a -10 mV), durante la perfusión con solución de Tyrode (control) y después de la adición del veneno entero de *T. forcipula*. El panel central muestra el curso temporal de la corriente registrada mediante el mismo protocolo, durante la perfusión con solución de Tyrode (control), durante la perfusión con veneno (wash-in) y durante el lavado (wash-out). El panel derecho muestra los registros I-V (corriente normalizada) en condiciones de perfusión con solución de Tyrode (control, círculos llenos) y después de la perfusión con veneno entero (círculos abiertos). Los registros se obtuvieron en células HEK293 transfectadas para expresar de manera transiente el canal hNav1.5. Se utilizó solución de Tyrode en el baño (en mM): 145 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucosa; pH 7.35, y la solución interna fue (en mM): 110 KCl, 5 K₂ATP, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 K₄BAPTA; pH 7.2.

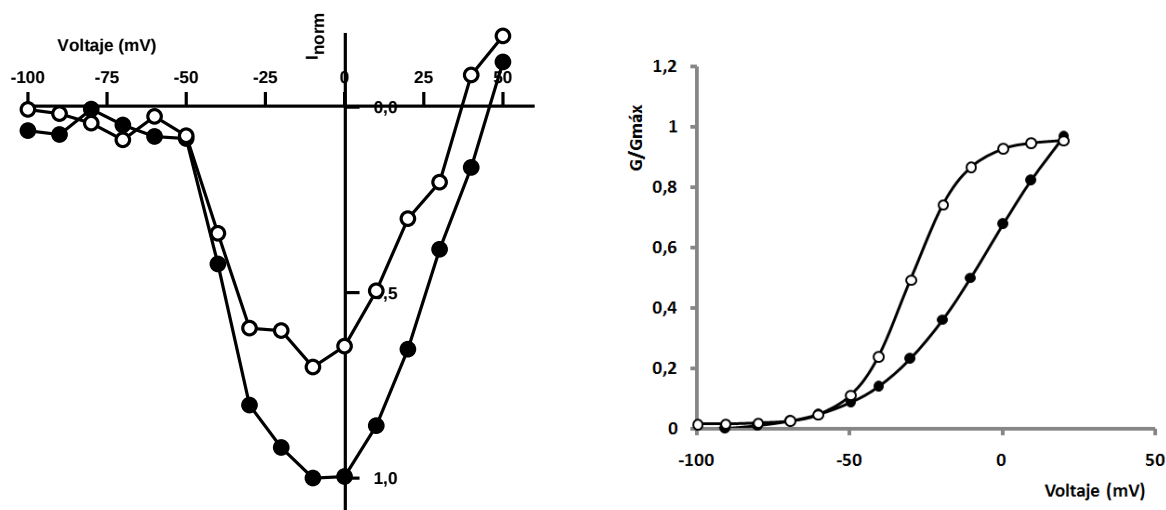


Figura 46. A) Gráfica de corriente normalizada vs voltaje (I-V) en condiciones de perfusión con solución de Tyrode (control, círculos llenos) y perfusión con veneno entero de *T. forcipula* a concentración de 7.5 $\mu\text{g/mL}$ (círculos abiertos). B) Curvas de activación en condiciones de perfusión con solución de Tyrode (control, círculos llenos) y perfusión con veneno entero 7.5 $\mu\text{g/mL}$ (círculos abiertos). Las relaciones conductancia/voltaje (g/V) se calcularon a partir de los picos de los registros corriente-voltaje (I-V), con $g=I/(V-V_{rev})$, donde I es la corriente pico, V es el test de potencial, y V_{rev} es el potencial de reversión, y se ajustaron con una distribución de Boltzmann en el programa OriginPro. Los registros se obtuvieron en células HEK293 transfectadas para expresar de manera transiente el canal hNav1.5. Se utilizó solución de Tyrode en el baño (en mM): 145 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl_2 , 1.8 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 Glucosa; pH 7.35, y la solución interna fue (en mM): 110 KCl, 5 K2ATP, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 5 K4BAPTA; pH 7.2.

Varias subfracciones homogéneas del veneno se ensayaron en las mismas condiciones y en las figuras 47 y 48 se muestran resultados representativos obtenidos en experimentos electrofisiológicos. La subfracción III-3(9) a concentración de 0.8 μM mostró el máximo efecto sobre la curva I-V y la curva de activación, inhibiendo la corriente pico en un 40% y desplazando la curva de activación hacia la derecha unos 10 mV ($n=3$). Esta subfracción sería equivalente con la fracción 34 del método A, enriquecida en la toxina de masa 7350 Da, según se mostró antes (figura 47, tabla 23).

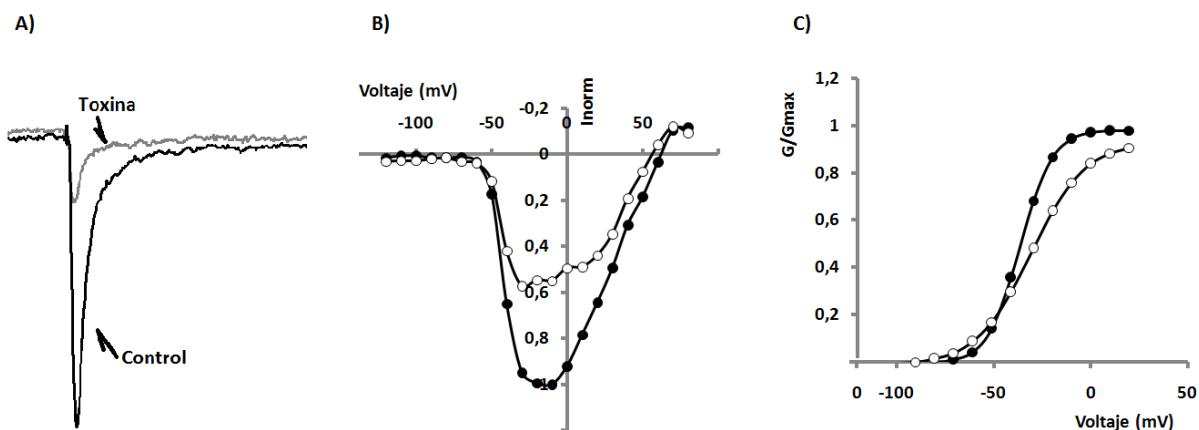
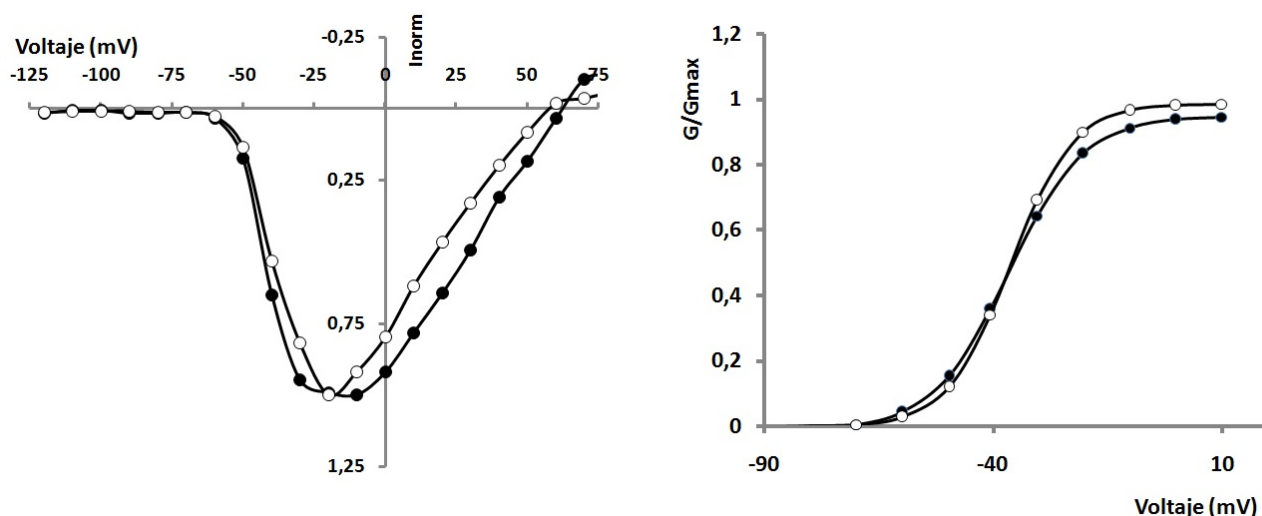


Figura 40 Efecto de la fracción III-3(9) del veneno entero de *T. forcipula* sobre los registros de corriente de sodio en hNav1.5 durante experimentos de patch-clamp en modo célula entera (whole-cell). A) Trazas representativas de corriente elicitada mediante el protocolo de corriente máxima en el modo whole-cell (pacing-pro, estimulación a -10 mV), durante la perfusión con solución de Tyrode (control) y después de la adición de 800 nM de la toxina. B) Gráfica de corriente normalizada vs voltaje (I-V) en condiciones de perfusión con solución de Tyrode (control, círculos llenos) y perfusión con 800 nM de la toxina (círculos abiertos). C) Curvas de activación en condiciones de perfusión con solución de Tyrode (control, círculos llenos) y perfusión con 800 nM de la toxina (círculos abiertos). Las relaciones conductancia/voltaje (g/V) se calcularon a partir de los picos de los registros corriente-voltaje (I-V), con $g = I / (V - V_{rev})$, donde I es la corriente pico, V es el test de potencial, y V_{rev} es el potencial de reversión, y se ajustaron con una distribución de Boltzmann en el programa OriginPro. Los registros se obtuvieron en células HEK 293 transfectadas para expresar de manera transiente el canal hNav1.5. Se utilizó solución de Tyrode en el baño (en mM): 145 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucosa; pH 7.35, y la solución interna fue (en mM): 110 KCl, 5 K₂ATP, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 K₄BAPTA; pH 7.2.

La subfracción III-3(8) a concentración de 0.8 μ M no mostró efecto apreciable sobre la curva I-V y la curva de activación (n=3). Esta fracción correspondería con la fracción 29 del método A, enriquecida en la toxina de masa 7235 Da. La subfracción II-1(16) a concentración de 0.8 μ M, inhibió la corriente máxima en 5% y desplazó la curva de activación hacia la izquierda por 5 mV (n=3). Esta fracción correspondería con la fracción 39, enriquecida en la toxina de masa 7082 Da (figura 48 y tabla 23). En la presente investigación se ensayaron las fracciones III-1(16), III-1(17), III-2(12), III-2(13), III-3(8), III-3(9), III-4(9), III-4(10) y III-4(14). Exceptuando las ya mencionadas, no se observaron efectos claros de las demás fracciones sobre las I_{Na} en las condiciones descritas.

A)



B)

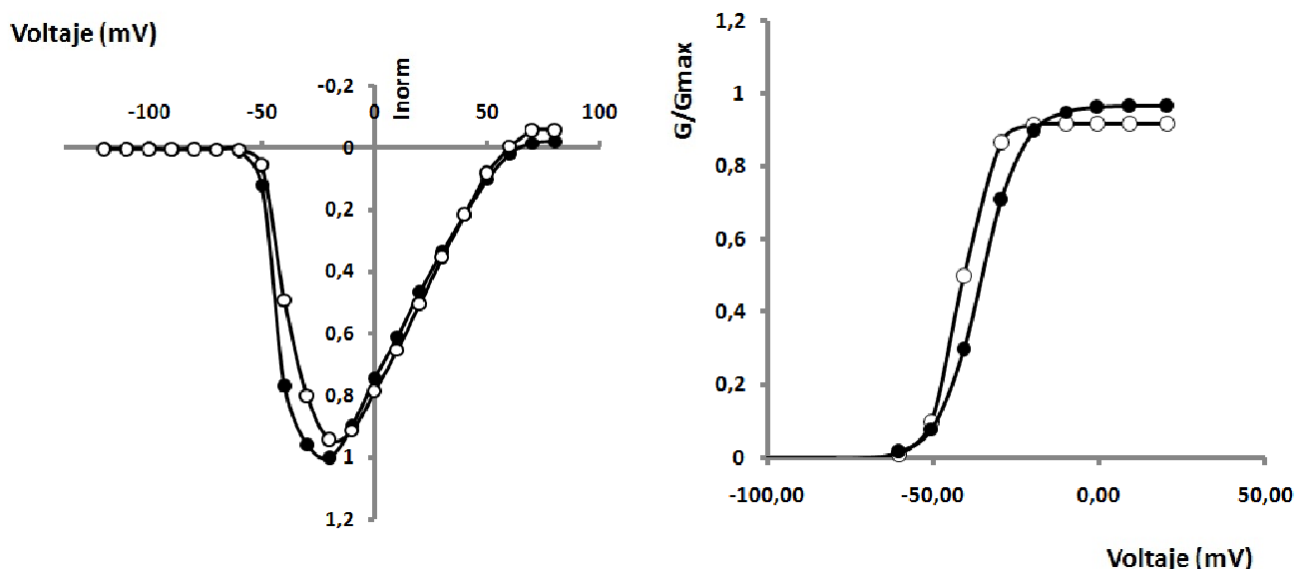


Figura 418. Efecto de fracciones homogéneas del veneno entero de *T. forcipula* sobre los registros de corriente de sodio en hNav1.5 durante experimentos de patch-clamp en modo célula entera (whole-cell). A) Gráfica de corriente normalizada vs voltaje (I-V) y conductancia/voltaje en condiciones de perfusión con solución de Tyrode (control, círculos llenos) y perfusión con la fracción III-3(8), 800 nM (círculos abiertos). B) Curvas de corriente normalizada vs voltaje (I-V) y conductancia/voltaje en condiciones de perfusión con solución de Tyrode (control, círculos llenos) y perfusión con la fracción III-1(16), 800 nM (círculos abiertos). Las relaciones conductancia/voltaje (g/V) se calcularon a partir de los picos de los registros corriente-voltaje (I-V), con $g=I/(V-V_{rev})$, donde I es la corriente pico, V es el test de potencial, y V_{rev} es el potencial de reversión, y se ajustaron con una distribución de Boltzmann en el programa OriginPro. Los registros se obtuvieron en células HEK293 transfectadas para expresar de manera transiente el canal hNav1.5. Se utilizó solución de Tyrode en el baño (en mM): 145 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucosa; pH 7.35, y la solución interna fue (en mM): 110 KCl, 5 K2ATP, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 K4BAPTA; pH 7.2.

7.3 DISCUSIÓN

El perfil cromatográfico del veneno de *T. forcipula* obtenido por el método A, muestra 42 picos cromatográficos bien definidos, distribuidos en dos grupos mayores de componentes. El primer grupo comprende las fracciones 20 a 27 con tiempo de retención (TR) entre 31.3 y 36.4 min, que incluyen el 14.5% de la masa cargada en la columna. El segundo comprende las fracciones 29 a 39, que eluyen con TR entre 37.51 y 43.29 min, y representa el 48.7% de la masa cargada. Los dos grupos de componentes dan cuenta del 63.2% del área cromatográfica y por tanto de la mayor parte de la masa de proteína inyectada en la columna.

Componentes homogéneos del veneno se obtuvieron en el primer paso de purificación, correspondientes con picos bien definidos en el cromatograma de la figura 37, como las fracciones 20 (tr 31.3 min) y 32 (tr 40.09 min). La determinación de la cantidad de proteína en las fracciones mencionadas, arrojó 6.24 µg en la fracción 20, y 18.5 µg en la fracción 32 (NanoDrop ND1000, A=280 nm). La cantidad teórica de proteína en estas fracciones fue de 15.2 y 41.8 µg (reporte de software Millenium, Tabla 17), mostrando que en la práctica se recupera menos del 50% del material inyectado en la columna. La cantidad de material obtenido fue insuficiente para intentar la secuenciación, ya que se requieren unos 15 µg de proteína para alimentar 35 ciclos de degradación automatizada de Edman e intentar la secuenciación directa del máximo de residuos en la estructura.

Las fracciones 23, 34, 37, 39 y 40, presentaron mayor contenido de proteína (117-296 µg, reporte de Millenium), pero el análisis de ESI-MS (Tablas 19 y 20) mostró que son fracciones con múltiples componentes, por lo cual se sometieron a nuevos pasos de purificación. Esto

muestra que utilizando el método A para fraccionar la cantidad de veneno adecuada que produzca buen rendimiento de componentes homogéneos para los experimentos de caracterización, se deben realizar numerosas purificaciones cargando la columna con pequeñas cantidades (idealmente alrededor de 1 mg de proteína, ya que la resolución disminuye al aumentar la carga). Utilizando el método A se fraccionaron en total 47 mg de veneno soluble en varios ciclos de purificación, y se juntaron en *pooles* las fracciones equivalentes según el tiempo de retención. Los *pooles* se repurificaron mediante elución isocrática con porcentajes de los eluentes A y B seleccionados según el TR de las fracciones de interés (Figura 35).

El análisis proteómico del veneno entero de un escorpión proporciona en primer lugar, la huella de masas del veneno (Venom Mass Fingerprint, VMF), esto es, la relación de todas las masas moleculares presentes, y es la aproximación más básica al desciframiento de la composición de un veneno, con base únicamente en las masas individuales presentes. Los venenos animales son usualmente diversos en composición y el VMF permite la comparación entre especies venenosas cercanas o distantes así como variaciones intraespecíficas y la realización de estudios filogenéticos con base en clados de masas (Abdel-Rahman *et al.*, 2015).

En el primer fraccionamiento cromatográfico se inyectaron 2 mg de veneno entero en la columna C18, y se colectaron 51 fracciones diferentes. Se llevaron a determinación de masa molecular muestras de las fracciones con absorbancia mayor a 0.15 UA (Figura 37), de las cuales solamente 24 reportaron iones significativos. Los resultados muestran la presencia de 99 masas moleculares en las fracciones analizadas, con una distribución de masas similar a la

observada en los venenos de bútidios (Valdéz-Velásquez *et al.*, 2013). Los datos crudos se procesaron con base en el criterio de que masas moleculares que difieren en menos de 2 Da se deben considerar como registros diferentes de una misma molécula (Olamendi-Portugal *et al.*, 2016) y se simplificó el espectro de masas, que se presenta en la tabla 20.

En el análisis de MFV se identificaron 44 componentes con masas moleculares diferentes, con rango de distribución entre 282.0 y 20269.0 Da. La figura 38 ilustra la distribución absoluta de masas moleculares de los componentes encontrados del veneno de *T. forcipula*. Rangos de masa moleculares entre 1-3 y 3-5 kDa se asocian típicamente con toxinas que modifican la permeabilidad de los canales K_V , en tanto que los rangos de masa entre 5-7 y 7-10 kDa usualmente incluyen las toxinas que modifican la permeabilidad de los canales Na_V , como se discute más adelante. Los componentes con masas moleculares de 10-20 kDa usualmente corresponden con diferentes clases de enzimas (Olamendi-Portugal *et al.*, 2016; Cid-Urbe *et al.*, 2019).

Las fracciones 21 a 27 con tiempos de retención (TR) entre 32.81 y 36.4 min y masas moleculares entre 3.7 y 4.4 kDa, incluyen los componentes que en reportes previos se han caracterizado como toxinas específicas para canales de K_V , en tanto que las fracciones 32 a 40 con TR entre 40.08 y 44.2 min y masas moleculares entre 3.6 y 10.9 kDa, incluyen principalmente componentes cuyas masas moleculares corresponden a toxinas selectivas para los canales Na_V (Olamendi-Portugal *et al.*, 2016; Cid-Urbe *et al.*, 2019). Componentes de masa menor, o fragmentos de degradación enzimática de proteínas más grandes, eluyen antes de los 32 minutos, en tanto que unos pocos componentes con masa mayor a 10 kDa eluyen por arriba de 44 minutos.

Las fracciones más complejas según este perfil fueron: la fracción 25 (TR 35.61 min) compuesta por componentes con masa molecular típica de KScTx. La fracción 33 (TR 40.81 min) con componentes cuyas masas corresponden usualmente a NaScTx, y en menor medida KScTx. Las fracciones 34 (TR 41.15 min) y 37 (TR 42.29 min) conformadas principalmente por componentes con masas típicas de NaScTx. Por último la fracción 38 (TR 42.78 min), que comprende masas superiores a 10 kDa. La abundancia de componentes en estas fracciones se relaciona estrechamente con la amplitud de los picos del cromatograma (unidades de absorbancia UA), excepto en el caso de las fracciones 23 (TR 34.38 min), 29 (37.51 min) y 40 (44.2 min) que a pesar de presentar notable amplitud, comprenden solo dos o tres componentes diferentes, si se considera el error instrumental en la determinación de masas.

Según se revisa en Abdel-Rahman *et al.*, 2015, se han hecho estudios proteómicos detallados de 25 especies de escorpiones, 60% de los cuales son búlidos, y se han observado diferencias notables en el número de componentes identificados entre especies, que va desde 60 masas únicas detectadas mediante MS y MALDI-TOFMS en el veneno de *T. cambridgei* presente en zonas tropicales de Brasil, hasta 665 componentes detectados mediante LC/ESI y MALDI-TOFMS en el veneno de *Mesobuthus tumulus* de India. Otros estudios referidos a búlidos neotropicales incluyen a *T. serrulatus* de las áreas tropicales de Brasil (380 componentes detectados mediante LC/ESI-MS y MALDI-TOFMS), *T. costatus* de la selva atlántica brasileña (90 componentes detectados usando LC/ESI-MS/MS), *T. stigmurus* de las regiones semiáridas del Brasil (Más de 100 masas únicas detectadas mediante MALDI-TOFMS) y *T. discrepans* distribuido en áreas tropicales de Venezuela (205 componentes detectados usando ESI-MS y MALDI-TOFMS) (Abdel-Rahman *et al.*, 2015). El proteoma del escorpión *T. pachyurus*, relacionado con envenenamientos severos y accidentes fatales en

Colombia (Otero *et al.*, 2004; Izquierdo y Rodríguez, 2012), fue estudiado por Barona *et al.*, 2006, quienes también hicieron la caracterización electrofisiológica de toxinas específicas para canales K_v y Na_v . Mediante SDS-PAGE identificaron componentes con pm desde 7-8 kDa (los más abundantes), hasta 97 kDa. Mediante HPLC obtuvieron 57 fracciones cromatográficas, y mediante ESI-MS/MS reportaron 104 componentes con distinto peso molecular (303 a 44.724 Da).

Valdéz-Velásquez *et al.*, 2013, detectaron mediante ESI-MS, 104 componentes individuales en 80 fracciones cromatográficas del veneno del bútido *C. tecomanus* de México. Batista, 2018, reportó 60 picos cromatográficos resueltos mediante RP-HPLC en el veneno del bútido *T. metuendus* del amazonas brasileño, con al menos 220 masas individuales según el VMF obtenido por LC-MS. Rincón-Cortés, 2017, efectuó el análisis proteómico del veneno de *T. macrochirus*, endémico de Cundinamarca (Colombia), identificó 72 fracciones cromatográficas mediante un procedimiento análogo al utilizado en la presente investigación, y mediante ESI-MS, analizó 24 fracciones con absorbancia mayor a 0.1 UA, identificando 49 masas moleculares individuales, entre 3.5 y 10.8 kDa (Datos no publicados).

Recientemente se reportó el estudio del transcriptoma de la glándula del veneno y del proteoma del veneno, del bútido *C. limpidus*, especie altamente venenosa del centro de México (Cid-Urbe *et al.*, 2019). En el análisis del VMF se detectaron 395 masas individuales (800-19.000 Da) mediante LC-MS/MS, y el mayor número de masas individuales estuvo en el rango esperado para las NaTx (7-8 kDa), seguido por el rango esperado para las KTx (4-5 kDa). En el análisis de LC-MS/MS se identificaron 52 secuencias, de las cuales 46

correspondieron a péptidos y proteínas del veneno, y las restantes a proteínas relacionadas con procesos celulares.

Los resultados del proteoma presentados en esta investigación, indican que respecto a otras especies de escorpiones *Tityus* de Colombia, el veneno de *T. forcipula* contiene un número de componentes individuales similar al de *T. macrochirus* (49 masas individuales), pero menos componentes que el veneno de *T. pachyurus* (104 componentes). Con respecto a escorpiones *Tityus* de regiones vecinas, el veneno de *T. forcipula* podría aproximarse en complejidad al de *T. cambridgei* (60 masas únicas), pero presentaría menor complejidad que *T. stigmurus* (100 componentes), *T. discrepans* (205) y *T. serrulatus* (308 masas individuales). Es importante mencionar que en la mayoría de los estudios mencionados se obtuvo el VMF mediante metodologías "online" como LC-MS, o MALDITOF- MS (Abdel-Rahman, 2014).

El resultado obtenido es coherente con la menor complejidad del cromatograma de *T. forcipula* en comparación con el de bítidos relacionados, tal como se discutió antes, pero también debe considerarse a la luz de la diferencia de sensibilidad entre los procedimientos utilizados para obtener el VMF, ya que métodos como LC/ESI-MS y MALDI-TOFMS detectan todos los componentes presentes en el veneno, aún los que están presentes en cantidades muy pequeñas, en tanto que el método utilizado en la presente investigación, deja por fuera las fracciones con absorbancia menor a 0.15 UA. Además, el equipo utilizado para el análisis del VMF no detecta componentes del veneno con masas moleculares mayores a 20 kDa, aunque están presentes, y con gran diversidad, en el veneno de *T. forcipula*, como se describió en el análisis del transcriptoma, y como se observa en la SDS-PAGE.

Por otra parte, la diferencia entre los resultados observados en la proteómica y los del transcriptoma ya han sido observados y discutidos en otros estudios, y se han propuesto causas como: 1) La fuente de materiales, ya que en la mayoría de los casos el veneno y el tejido glandular provienen de individuos diferentes; 2) Insuficiente caracterización de proteínas en las bases de datos (no se conocen las posiciones del péptido señal, el propéptido y el péptido maduro, para predecir con precisión las masas moleculares); 3) Las modificaciones postraduccionales que experimentan algunas secuencias, y 4) La mayor parte de proteínas de alto peso molecular (especialmente las relacionadas con genes de procesos celulares) se expresan en las glándulas, pero no se liberan en el veneno (revisado en Abdel-Rahman *et al.*, 2015).

Las fracciones del veneno que mostraron mayor toxicidad en ensayos con ratón (Tabla 18) se repurificaron bajo las mismas condiciones del método A, modificando los gradientes de elución para mejorar la resolución. La fracción 32 (con alta toxicidad en los ensayos en ratón) produjo 8 sub-fracciones, dos de ellas con $A > 0.15$ UA, en dos picos cromatográficos definidos (Fig 39) El análisis de ESI-MS de las dos sub-fracciones principales, mostró dos componentes en cada una (masa de 7296.97 y 3685.4 Da en la primera, y masa de 7951.04 y 7313 Da en la segunda).

La fracción 33 también mostró alta toxicidad en ensayo con ratón. La repurificación de la fracción 33, de la cual se obtuvieron 210 μ g (Nanodrop ND 1000, $A = 280$ nm) a partir de seis corridas cromatográficas, produjo 5 subfracciones en tres picos cromatográficos (Figura 39), con mayor rendimiento de la subfracción 2 (62 μ g, con tr de 31.14 min), que se llevó a RC (30 μ g) para secuenciar directamente el máximo posible de residuos aminoacídicos. Fue

mínimo el rendimiento de la subfracción 5 (5.55 µg) en tanto que las restantes sub-fracciones estuvieron dentro de este rango. El análisis de ESI-MS de las subfracciones arrojó los siguientes resultados: Sub-fracción 1 (tr 30.69 min, masa 7317 y 7950 Da), sub-fracción 2 (tr 31.14 min, masa 7317, 7950 y 5444 Da), sub-fracción 3 (tr 31.36 min, 10811 Da), sub-fracción 4 (tr 31.64 min, masa 5444, 5189 y 10911 Da) y la sub-fracción 5 (tr 32.18, masa 5444 y 1091 Da).

La fracción 34 fue muy tóxica en los ensayos con ratón. La repurificación produjo más de 15 sub-fracciones, diez de ellas con $A > 0.15$ UA, en 8 a 10 picos cromatográficos. La sub-fracción 3 (tr 25.66 min) presentó dos componentes (masa de 10911.8 y 7357 Da), así como la sub-fracción 7 (tr 27.69 min, masa 7293 y 7378 Da), y la 9 (tr 28.96 min, masa 6930.98 y 6897.08 Da). Se intentó repurificar la sub-fracción 7 en un tercer paso cromatográfico con gradiente de 20-40% de eluyente B en 60 min, pero no se obtuvo ninguno de sus componentes en forma más homogénea (Fig 39).

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de toxicidad, se decidió llevar la sub-fracción 3 de la fracción 34 (TR 25.66 min) a reacción de RC, para intentar la repurificación hasta homogeneidad y facilitar la secuenciación directa. La mezcla de la reacción de RC se cromatografió según el método A y se obtuvieron dos fracciones altamente homogéneas con masas de 7838.62 Da (TR 32.48 min) y 11258.93 Da (TR 38.5 min), correspondientes a los péptidos de masa 7357 Da y 10911.8 Da, indicando la presencia de 8 y 6 residuos Cys, respectivamente (Ecuación 3). Se secuenció el extremo N- terminal de la fracción con TR 32.48 min, y se decidió fragmentar el péptido mediante digestión con enzima Glu-C. La mezcla de digestión se llevó a cromatografía, mediante el método A, y se colectaron cuatro

componentes (masa en Da: 3706.2, 4151.61, 2194.8 y 2414.83) de los cuales se llevaron a secuenciación los sugeridos por Protein Prospector en el análisis de digestión simulada.

La repurificación de la fracción 37 produjo 20 sub-fracciones cromatográficas, diez de ellas con $A > 0.16$ UA, en 6-8 picos cromatográficos bien definidos (Figura 39). Considerando la toxicidad de esta fracción en ensayos vía IP e IC (Tabla 8) se llevó la subfracción 11 (TR 26.57 min) a un tercer paso de fraccionamiento mediante el método A, para intentar la purificación hasta homogeneidad (gradiente de 20 a 40% de eluyente B en 60 min). El análisis de ESI-MS mostró un componente de masa 7293.85 Da, contaminado con otro de 6013.4 Da.

La repurificación de la subfracción 13 (TR 28.04 min) con idéntica metodología, produjo un componente altamente homogéneo de 6931.89 Da, que se sometió a la reacción de RC y se llevó a cromatografía según el método A para dar un componente homogéneo con masa 7391.95 Da, indicando la presencia de ocho residuos Cys en la estructura (Ecuación 3), que se llevó a secuenciación. La subfracción 12 (TR 27.51 min) no produjo cantidades adecuadas de material. La sub-fracción 17 (TR 31.84 min) produjo dos fracciones bastante homogéneas (masa 7083 Da y 10.901 Da respectivamente).

La fracción 38 mostró toxicidad moderada en los ensayos con ratón. La repurificación produjo 11 subfracciones, siete de ellas con $A > 0.15$ UA, en 7 picos cromatográficos. Las subfracciones principales mostraron al menos dos componentes diferentes, así: subfracción 4 (TR 29.63 min) con masa 6930.85 y 7117.9 Da, sub-fracción 7 (TR 32.09 min), con masa 7083.05 y 10934.74 Da, y sub-fracción 9 (TR 34.89 min) con masa de 10635.24 y 10914.65 Da (Figura 39). Se repurificó la fracción 39 de la que se colectaron 4 sub-fracciones con

A>0.15 UA, con la sub-fracción 1 (TR 30.81 min) homogénea (7082,72 Da), la cual se llevó a una repurificación adicional para intentar la secuenciación total. La repurificación de la fracción 40 permitió coleccionar dos sub-fracciones principales en un solo pico cromatográfico bien definido, y presencia de un componente de masa 10608.23 Da, contaminado con cantidades menores de otros dos (7928 y 7082 Da, respectivamente). La fracción 41 no fue tóxica en los ensayos con ratón, y al llevarla nuevamente a cromatografía mostró un componente principal de 10827 Da (TR 41.18 min).

En el paso final de la caracterización proteómica se determinó la secuencia completa de 35 residuos de la toxina Frac_25(tr35.61), con pm de 3591 Da, y se obtuvo la secuencia: TGPQTVCEASICEAACKQMGKSMESCQGDACKCKA, con masa estimada de 3598.16 Da y PI 5.92 (Expasy.org). La diferencia de siete unidades entre la masa determinada por ESI-MS y la masa estimada para el péptido (Expasy), podría deberse a la oxidación de las Cys para formar tres enlaces disulfuro con pérdida de seis átomos de H, con lo que la masa del péptido secuenciado (y del transcrito putativo) cae dentro del error experimental del equipo, de ± 1 Da (Olamendi-Portugal et al., 2016). La secuencia presentó 100% de sitios idénticos y 100% de identidad con el péptido maduro de la α -KTx putativa TfpKTxAlp04 (e-value=1.3E-23, bit-score=72.02), también con 35 residuos e idéntica secuencia (62 residuos y masa estimada de 6586.77 Da en el precursor), por tanto se postula que el transcrito correspondiente codifica el péptido Frac_25(tr35.61), pm de 3591 Da.

La toxina Frac_36(tr42.01), masa de 7357 Da, que mostró la máxima toxicidad en ratón, se secuenció parcialmente desde el extremo N-terminal y se obtuvo la secuencia: KKDGYPLEYNNCAYICLGYENAYCDKLCKDWKADSGYCYWANILCYCV..., de 48

residuos, que corresponde aproximadamente con el 76% del péptido. No se logró la secuenciación completa de la toxina debido a la dificultad para separarla en forma homogénea de otros componentes presentes en las fracciones en que fue detectada, especialmente la fracción 36 (aunque también se detectó en la fracción 35, Tabla 20, MFV). La secuencia presentó identidad con el péptido maduro de la α -sodio toxina putativa TfpNaTxAlp11 (85.1% de sitios idénticos y 91.5% de identidad, e-value=7.4E-27, bit-score=82.4), que presenta 67 residuos y masa estimada de 7698.72 Da (86 residuos y masa estimada de 9839.62 Da para el precursor), por lo que se postula que el transcrito correspondiente con la toxina putativa TfpNaTxAlp11 podría codificar el péptido más tóxico aislado del veneno, Frac_36(tr42.01), con pm 7357 Da.

Se secuenció la toxina Frac_39 (tr42.29), masa de 7082 Da, de interés por su efecto agudo sobre el control motor central en ratón, y se obtuvo la secuencia N-terminal de 42 residuos: KEGYPLDTLNGCKVGCFFGSNSWCNDKCKSSKAETGYCKAPK..., que presentó 90% de sitios idénticos y 93.8% de identidad con el péptido maduro de la β -sodio toxina putativa TfpNaTxBet09 (e-value=2.0E-25, bit-score=78.57), cuyo precursor tiene 82 residuos y masa estimada de 9311.01 Da (7091.1 Da para el péptido maduro) por lo que se postula que el transcrito correspondiente podría codificar el péptido Frac_39 (tr42.29), con pm7082 Da.

También se secuenció el extremo N-terminal de la toxina Frac_37(tr42.29), masa de 6932 Da, y la secuencia de 24 residuos obtenida (KEGYLLGPDGCKVSCFIPRAGYCP...), alineó con los péptidos maduros de los dos precursores putativos de β -sodio toxinas TfpKTxBet11 y TfpKTxBet12, presentando similares índices del BLAST, pero menor e-value para TfpKTxBet12 (2.9E-12). Éste último tiene 85 residuos de longitud y masa estimada de 9461.2

Da (65 residuos y masa estimada de 7125.23 Da para el péptido maduro). Se secuenciaron 31 residuos del N-terminal de la toxina Frac_32(tr40.08), con masa de 7296 Da. La secuencia obtenida (ARDGYPISKNNYCPIYCPDTKVXKKCTKNRA...), alineó contra las α -toxinas putativas TfpNaTxAlp06 y TfpNaTxAlp08 presentando exactamente los mismos índices del BLAST (e-value=1.4E-15, bit-score=53.3). Los precursores putativos tienen 98 residuos y masas estimadas de 10851.6 y 10875.6 Da respectivamente (65 residuos y masa estimada de 7372.37 y 7386.4 para los correspondientes péptidos maduros). Finalmente, se secuenció el N-terminal de la toxina Frac_33 (TR 40.81), con pm de 7313.95 Da. La secuencia de 26 residuos obtenida (KKDGYPAKKNGCCYLCEPYTKVCKM...), alineó con la α -toxina putativa TfpNaTxAlp02 (e-value=2.4E-5, bit-score=26.56). El precursor putativo presenta 79 residuos y masa estimada de 8689.89 Da, en tanto que el péptido maduro tiene 60 residuos y masa estimada de 6735.55 Da.

La subunidad α del canal de sodio cardíaco en humanos (hNav1.5, codificado por el gen SCN5A) desempeña un papel crítico en la generación y propagación del potencial de acción cardíaco (Tabla 1). El canal hNav1.5 es responsable de la excitación eléctrica de los cardiomiocitos. La apertura del canal, dependiente de voltaje, dispara la fase ascendente del potencial de acción cardíaco, iniciando la despolarización celular y propagando el potencial de acción a lo largo de las cámaras cardíacas. La inhibición del canal inducida por fármacos, disminuye la tasa de despolarización cardíaca y en consecuencia, disminuye la velocidad de conducción. Dependiendo de la magnitud, el bloqueo de hNav1.5 puede manifestarse como prolongación del intervalo PR y/o como ampliación del complejo QRS en el electrocardiograma (revisado en Erdemli *et al.*, 2012).

Los efectos de diversos fármacos sobre el canal hNa_v1.5 también pueden modificar la repolarización cardíaca: la disminución de la corriente de inactivación de sodio puede prolongar el potencial de acción, y la inhibición del canal puede deteriorar la contractilidad cardíaca debido a la reducción de la concentración del Ca⁺² citosólico libre, mediado por el intercambiador Na⁺/Ca²⁺. Los canales hNa_v1.5 son susceptibles de bloqueo por variados fármacos y moléculas pequeñas (anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos y antiarrítmicos), muchos de los cuales se han asociado con efectos graves, incluyendo arritmias cardíacas. Mutaciones en el gen SCN5A subyacen a varias enfermedades cardíacas, tanto por pérdida de función (Síndrome de Brugada), como por ganancia (Síndrome QT largo tipo 3). Diversos estudios confirman que la pérdida de función del canal de Na⁺ cardíaco es la base del fenotipo clínico del síndrome de Brugada (Baroudi, Napolitano, Priori, Del Bufalo y Chahine, 2004; Ishikawa *et al.*, 2012). Por estas razones, el efecto colateral inhibitorio del canal hNa_v1.5 se ha considerado un marcador de riesgo durante los ensayos de fármacos potenciales (revisado en Erdemli *et al.*, 2012).

En los experimentos de electrofisiología, el veneno entero de *T. forcipula* inhibió la I_{Na} máxima a través de hNa_v1.5 expresado en células HEK 293, en una forma dependiente de la concentración, y desplazó la curva de activación hacia la izquierda 20 mV. La corriente fue inhibida en un 90-95% a concentración de 750 ng/μL de veneno, en 50-60% a concentración de 150 ng/μL, y en 10% a concentración de 7.5 ng/μL. D'Suze *et al.*, 2015, ensayaron el veneno entero de escorpiones de Venezuela sobre Na_v1.4 expresado en células HEK 293 a concentración de 1 ng/μL, y encontraron que *T. perijanensis*, *T. zulianus* y *T. discrepans*, desplazaron la curva de activación hacia la izquierda (10 mV para los dos primeros y 5 mV en el caso de *T. discrepans*), y disminuyeron la I_{Na} máxima (84, 82 y 48% respectivamente). *T.*

quirogae no tuvo efecto sobre la curva de activación aunque inhibió la corriente pico en 26%, y *T. caripitensis* desplazó la curva de activación 15 mV hacia la derecha y disminuyó la corriente pico en 72%. Como se observa, el efecto del veneno de *T. forcipula* sobre hNa_v1.5 es pequeño, en comparación con lo reportado para veneno entero de escorpiones de regiones vecinas, aunque cabe destacar que los experimentos de D'Suze et al., se efectuaron sobre una isoforma diferente de Na_v.

A concentración de 0.8 μ M La subfracción III-3(9), enriquecida en la toxina de masa 7350 Da, inhibió la corriente pico en un 40% y desplazó ligeramente la curva de activación hacia la derecha. A la misma concentración, la subfracción III-3(8), enriquecida en la toxina de masa 7235 Da, no mostró efecto apreciable sobre la curva I-V y la curva de activación, en tanto que la subfracción II-1(16) inhibió la corriente máxima en 5% y desplazó la curva de activación hacia la izquierda por 5 mV. Esta subfracción está enriquecida en la toxina de masa 7082 Da. No se observó efecto claro de las demás toxinas ensayadas en los experimentos electrofisiológicos. En la literatura revisada no se encontraron reportes de caracterización funcional de venenos de escorpiones colombianos, que permitan discutir ampliamente los resultados del presente estudio. Barona *et al.*, 2006, caracterizaron toxinas aisladas del veneno de *T. pachyurus* (Tpa1, α -KTx13.3, potente bloqueador del canal Shaker B, y Tpa2, con actividad típica de β -NaScTx, modificó las I_{Na} en células F-11 y TE671). Rincón-Cortés *et al.*, 2019, caracterizaron tres péptidos homogéneos obtenidos a partir del veneno de *T. macrochirus*, dos de los cuales no tuvieron efecto sobre la I_{Na} evaluada en las isoformas hNa_v1.1 hasta hNa_v1.7, expresadas en células HEK 293 (excepto hNa_v1.7), en tanto que el tercero, Tma1 (200 nM), tuvo efecto solamente sobre hNa_v1.4 y hNa_v1.6, con efecto típico de β -NaTx.

Según se revisa en Housley *et al.*, 2017, se han descrito en los venenos de escorpiones, 63 péptidos con acción específica sobre los VGSCs, presentando tres mecanismos de acción principales: 1) inhibición directa del flujo de corriente, 2) hiperpolarización del umbral de activación del canal, y 3) retraso o inhibición de la inactivación. Estas acciones ocurren sobre un amplio rango de concentraciones (100 pM-30 μ M), y muestran variabilidad en la afinidad por el canal. En cuanto a selectividad, 19 péptidos muestran alta selectividad, con acción sobre un único tipo de canal (en contraste con toxinas como MeuNaTx α -5 del bótido asiático *Mesobuthus eupeus* que modula hasta 6 subtipos diferentes de canal Na_v).

En cuanto a caracterización funcional de toxinas de escorpiones *Tityus* de regiones vecinas, la toxina Ts1 es una de las mejor estudiadas entre las específicas para Na_v1.5 (Housley *et al.*, 2017). Ts1 es el componente más abundante del veneno de *T. serrulatus*, modulando la activación de los canales Na_v1.6 y Na_v1.3 con acción de β -toxina clásica (causa la apertura de los canales al potencial de reposo). Ts1 también inhibe la corriente de sodio a través de Na_v1.5, pero sin alterar las curvas de activación o inactivación de estado estacionario (Peigneur *et al.*, 2015). Sin embargo, análisis recientes muestran que Ts1 también podría actuar como α -NaTx, retrasando el proceso de inactivación de los canales Na_v (Martin-Euclaire, Bougis y de Lima, 2018).

La toxina Ts2 de *T. serrulatus* clasificada típicamente como α -Tx, impide la inactivación de Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.5, Na_v1.6 y Na_v1.7 de rata, aunque también presenta acción de β -toxina al cambiar selectivamente la dependencia del voltaje de la activación de rNa_v1.3. La α -neurotoxina Ts5 actúa sobre los canales Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.4, Na_v1.5, Na_v1.6 y Na_v1.7 (Nencioni *et al.*, 2018). La toxina Tz1 de *T. zulianus* modula la actividad de Na_v1.4 > Na_v1.6 >

Nav1.2, con efecto tipo “depresor” sobre Nav1.5, actuando como β -NaTx típica, desplazando la curva de activación hacia la izquierda (D’Suze et al., 2015; Deuis, Mueller, Israel y Vetter, 2017). La toxina Tf2 de *T. fasciolatus*, provoca selectivamente la apertura de hNav1.3 a potenciales hiperpolarizados de membrana, sin efecto de activación o inactivación sobre otras isoformas de canales Nav (Revisado en Deuis et al., 2017). To4 de *T. obscurus* de la amazonia brasileña, mostró actividad estrictamente tipo β -NaTx sobre los canales hNav, desde la isoforma 1.1 hasta la 1.7, a concentración de 70 nM (Morales-Duque et al., 2017).

Entre las ScTx de escorpiones del Viejo Mundo, Nav1.5 fue afectado por toxinas de *Buthus martensii* (BmK AGP-SYPU1, BmK AS, BmK I, BmK M1, BmK α TX47) y Lqh (Lqh β 1, Lqh7, Lqh6, LqhIT, Lq II y Lq III) con efectos variados (inhibición de la inactivación rápida, enlentecimiento de inactivación e hiperpolarización de la inactivación de estado estacionario, aumento y disminución de la corriente pico). La mayoría de estos experimentos se llevó a cabo en el sistema heterólogo HEK 293 a concentraciones entre 2 nM y 1.5 μ M (Housley et al., 2017).

Como se mencionó antes, las NaTx de escorpión se clasifican según el modo de acción sobre los canales Nav. Las α -NaTx afectan la activación, y las β -NaTx modifican la inactivación. Las α -NaTx retrasan la inactivación rápida de los canales, extendiendo la duración del potencial de acción en músculo y nervio. En experimentos de electrofisiología de voltaje controlado, enlentecen la inactivación e incrementan la amplitud de la corriente pico (revisado en Ortiz y Possani, 2018). Las α -NaTx fueron descritas inicialmente en especies de África y Asia, aunque se encontraron después en venenos de especies del Nuevo Mundo (Quintero-Hernández et al., 2013). Las β -NaTx causan la activación de los canales a

potenciales de membrana hiperpolarizados. En experimentos de electrofisiología de voltaje controlado, las β -NaTx típicamente reducen la corriente pico y desplazan hacia la izquierda la curva de activación dependiente de voltaje (D'Suze *et al.*, 2015), aunque los efectos dependen de las isoformas del canal Na_v . De hecho, se ha reportado ampliamente que sobre el canal $\text{Na}_v1.5$, las β -NaTx normalmente reducen la corriente pico, sin modificar la activación, y se ha postulado que este efecto diferencial se debe al residuo G658, presente en $\text{Na}_v1.4$ y ausente en $\text{Na}_v1.5$, residuo que es considerado esencial para el cambio del voltaje de activación a valores más negativos (Coronas *et al.*, 2015).

La fracción correspondiente al pico cromatográfico 34 (tr 41.16 min) fue la más tóxica en los ensayos con ratón (Tabla 8), en la repurificación produjo más de 15 sub-fracciones, y en el análisis de ESI-MS permitió detectar al menos ocho masas individuales, resultando ser la fracción más compleja del VMF (Tabla 11). Las fracciones cromatográficas 35 y 36 también se colectaron dentro del mismo pico cromatográfico de la fracción 34, y en ambas se detectó el componente de pm 7357 Da, que mostró ser el componente homogéneo más tóxico del veneno de *T. forcipula* cuando se inyectó vía IC en ratón. Es interesante observar que la fracción 34 corresponde solo al 7.24% del veneno en peso (Tabla 7), de modo que asumiendo una concentración similar de los componentes, se puede postular que la toxina más letal para mamíferos en el veneno de *T. forcipula*, constituye menos del 1% del veneno soluble entero en peso. Este resultado es opuesto al observado en especies como *T. serrulatus*, en el cual la Ts1, el componente más letal del veneno (con actividad de β -NaTx, activo hacia mamíferos e insectos) constituye el 16% del veneno entero soluble, contribuyendo notablemente a la toxicidad del veneno (Bordon *et al.*, 2015). El componente de pm 7357 Da no tuvo efecto significativo sobre la I_{Na} a través del canal $\text{hNa}_v1.5$, lo cual indica que el péptido es

neurotóxico, sin efecto cardiotóxico. Esta toxina se aisló de forma homogénea y se secuenció parcialmente, resultando altamente similar con el péptido putativo TfpNaTxAlph11, y con alta similitud con Tpa4, una α -Tx putativa de *T. pachyurus*.

También en la fracción cromatográfica 34, se detectó un componente de masa individual 7350 Da, que podría estar relacionado estructuralmente con la toxina más letal de *T. forcipula*, y que mostró el máximo efecto sobre la I_{Na} en hNa_v1.5, con típica actividad de β -NaTx. A la luz de los presentes resultados, este componente sería uno de los principales responsables del efecto cardiotóxico del veneno entero. La fracción 33 (seis masas individuales) correspondió al 2.48% del veneno soluble, también fue muy tóxica por inyección IP en ratón, y se observó enriquecida en el componente de pm 7313 Da. Nuevamente llama la atención la baja proporción de este componente, muy tóxico para mamíferos en el veneno de *T. forcipula* (menos del 0.5%).

El componente más abundante en el veneno de *T. forcipula* parece ser un péptido de pm 7082 Da, detectado en las fracciones 37, 38, 39 y 40, que constituyen el 44.8% del veneno en peso, incluyendo unas doce masas individuales detectadas por ESI-MS. Este péptido fue detectado como masa individual más enriquecida en la fracción 39 (13.01% del veneno en peso), de modo que podría representar cerca del 4.5% del peso del veneno soluble. Ratones inyectados con este componente homogéneo, experimentaron intoxicación moderada y se recuperaron, mostrando un notable deterioro de la función motora y el equilibrio.

El péptido homogéneo de pm 7082 Da fue parcialmente secuenciado, mostró alta similitud con la toxina putativa TfpNaTxBet09, y homología con la β -NaTx Tpa7 de *T. pachyurus*. En

ensayos electrofisiológicos, inhibió de forma moderada la corriente pico en hNa_v1.5, mostrando actividad típica de β -toxina. El análisis de la secuencia N-terminal de 48 residuos (KEGYPLDTLNGCKVGCFFGSNSWCNDKCKSSKAETGYCKAPK...), permite sugerir que la región funcional podría corresponder con el motivo de la subclase antimamífero [KxGYxVx(4)GCKxxCxxLGxNxxCxxECx(9)GYCYxFxCxCxxLx(7)-PlxxKxC], o de la subclase excitatoria anti-insecto [KKxGxxxDxxGKxxECx(4,9)YCxxxCTKVxYAxxGYCCxxx-CYCxGLxDDKx(9)KxxCD] de las β -NaTx, según se revisa en Quintero-Hernández *et al*, 2013, donde “X” significa cualquier residuo, y los números entre paréntesis indican el número de residuos en un punto particular de la secuencia.

Tomados en conjunto, los resultados anteriores sugieren que el veneno de *T. forcipula* presenta una composición menos compleja que la reportada para escorpiones *Tityus* de regiones vecinas (al menos 44 componentes en el proteoma, y 218 en el transcriptoma). La menor complejidad es coherente con la moderada toxicidad y la baja cardiotoxicidad del veneno. Los péptidos tóxicos incluyen α y β -NaTx, siendo el componente más abundante del veneno, la toxina parcialmente secuenciada denominada frac_39(43.29) con pm de 7082 Da, con motivo funcional similar al de la subclase anti-mamífero, o excitatoria anti-insecto, que mostró toxicidad moderada en ensayos con ratón, y afectó ligeramente la corriente pico de sodio en hNa_v1.5 con acción característica de β -NaTx.

El componente más tóxico del veneno sería la toxina parcialmente secuenciada frac_36(42.01), con pm de 7357 Da, que sin embargo parece estar en baja concentración en el veneno, presenta estructura de α -NaTx y no tuvo efecto observable sobre hNaV1.5, aunque este resultado no es sorprendente ya que, como se discutió atrás, la ausencia del residuo G658

determina la relativa insensibilidad de Nav1.5 a numerosas toxinas de escorpiones *Tityus*, que tienen sin embargo potente efecto sobre otras isoformas del Na_v. Además, como se discutió en el capítulo anterior, la toxina frac_36(42.01), con pm de 7357 Da, presentaría amidación C-terminal, rasgo que le confiere mayor selectividad, probablemente hacia isoformas del canal Na_v expresadas en el sistema nervioso, y sería por tanto una α -NaTx extremadamente neurotóxica. Otras toxinas que contribuyen a la toxicidad del veneno de *T. forcipula* serían péptidos con pm de 7050 y 7313 Da. La primera de ellas inhibió en 50% la corriente pico de sodio en hNav1.5, y la segunda es el componente más abundante de la fracción 33 del método A, que también fue muy tóxica en ensayo con ratón.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En 2008 Colombia fue incluida por la OMs como país con escorpionismo endémico, y en la Guía para el Manejo de Emergencias Toxicológicas del Ministerio de Salud de Colombia, se incluyó el escorpionismo como emergencia. Los resultados del presente estudio sugieren que el escorpión *Tityus forcipula*, encontrado en localidades de la zona rural de Cali, debería incluirse en la lista de especies potencialmente peligrosas en Colombia, a pesar de que parece ser una especie de toxicidad moderada en comparación con las especies causantes de escorpionismo severo en países vecinos. Ratones envenenados de forma experimental, mostraron síntomas de envenenamiento central (ataxia, parálisis, temblores, convulsiones) y autonómico (salivación, lacrimación, signo de straub, piloerección, micción, deposición), con efecto cronotrópico negativo, alteraciones hemodinámicas y de la función pulmonar. En el test de dolor, se evidenció una intensa respuesta de fase aguda a la inyección subplantar del veneno entero en ratones, así como una respuesta intensa de fase inflamatoria. Las variables de la química sanguínea evidenciaron la activación de cascadas inflamatorias y la alteración del perfil glucémico. El veneno entero presenta actividad enzimática significativa, lo que probablemente facilita su rápida distribución hacia compartimientos extravasculares y exacerba la respuesta inflamatoria.

Los resultados anteriores, tomados en conjunto, indican que la picaura por *T. forcipula* puede llegar a ser un accidente de consideración, si se tienen en cuenta la letalidad ($DL_{50}=2.39 \pm 0.05$ mg/kg ratón), la más alta para un escorpión de Colombia, y reportada por primera vez en este estudio, y la productividad de veneno ($P_c=1.02$ mg = 1020 µg de proteína soluble), similar a las de escorpiones bútidos de Colombia y regiones vecinas, como *T.*

fuhrmanni, *T. Pachyurus* y *T. zulianus*, cuya picadura ha estado relacionada con accidentes fatales, principalmente en niños.

La ausencia de reportes de escorpionismo severo y fatalidades, probablemente esté asociada con los hábitos poco invasivos de *Tityus forcipula*. El escorpión *T. forcipula* es una especie de bosque, a diferencia de especies como *T. serrulatus* en Brasil, que se ha adaptado muy bien a entornos urbanos, invadiendo las viviendas humanas con el consiguiente incremento en el número de accidentes, o *T. fuhrmanni* en Colombia, que suele infestar las viviendas. *T. forcipula* se ha encontrado en varias localidades rurales de Cali, entre los 1500 y los 2000 msnm, usualmente con densidades poblacionales bajas, en parte debido a su estrategia reproductiva y ciclo de vida. Por esta razón, la mayoría de accidentes por *T. forcipula* se producen en desarrollo de labores del campo, y afectan principalmente a adultos. Sin embargo, habitantes de zonas rurales montañosas de Cali han reportado casos de accidentes dentro de las viviendas. Los resultados del presente estudio permiten sugerir que el envenenamiento severo por picadura de *T. forcipula*, especialmente si las víctimas son niños, podría requerir atención médica, y monitoreo de posibles secuelas de lesión miocárdica, pancreatitis y diabetes.

Se encontró en el presente estudio, que el veneno de *T. forcipula* incluye componentes con actividad enzimática, bien caracterizados en los venenos de otras especies de escorpiones del género *Tityus* de regiones vecinas, como son las proteasas y las HYAL. Además, el veneno de *T. forcipula* muestra, de forma atípica, importante actividad PLA2, que debe investigarse adicionalmente, pues las fosfolipasas son más comunes en venenos de escorpiones no bítidos, con efectos dermonecróticos. Estos resultados corresponden con lo encontrado en el análisis

del transcriptoma, donde se identificaron péptidos putativos de varios tipos de enzimas. La actividad de los componentes enzimáticos del veneno de escorpión es importante en la fisiopatología del envenenamiento. Las HYAL contribuyen a la rápida difusión tisular, en tanto que las proteasas podrían participar en procesos celulares, y en la activación y procesamiento de las toxinas, pero también podrían contribuir al envenenamiento, como se ha propuesto respecto del papel de las proteasas en la pancreatitis aguda observada en el escorpionismo por *T. serrulatus*.

El transcriptoma de la glándula “activa” del veneno de *T. forcipula* muestra la composición típica del veneno de los bûtidos, y particularmente de las especies del género *Tityus* del Nuevo Mundo. Se identificaron numerosas proteínas relacionadas con procesos celulares, así como péptidos y proteínas relacionadas con componentes del veneno. Más del 60% de transcritos corresponde con enzimas, un resultado poco común en los venenos de bûtidos, pero coherente con la significativa actividad fosfolipasa, proteasa e hialuronidasa del veneno entero. En cuanto a los precursores putativos de neurotoxinas, se identificaron α y β -NaTx (13.8%), así como α , β y ϵ -KTx (9.2%). También se encontraron porcentajes menores de transcritos codificantes para péptidos antimicrobianos, inhibidores de proteasa, proteínas ricas en cisteína y péptidos que se unen a factores de crecimiento tipo insulina, entre otros.

Algunos resultados del presente estudio apoyan la idea del splicing alternativo como fuente de variabilidad en el venoma de escorpiones, dado que en el grupo de NaTx y KTx putativas de *T. forcipula* se encontraron “clûsteres” de secuencias que se diferencian en unos pocos aminoácidos, ya sea del péptido maduro, o del péptido señal. Las toxinas putativas de *T. forcipula* presentaron alta similitud con otras previamente reportadas para *T. pachyurus*, *T.*

zulianus y *T. obscurus*, resultado que junto con la evidencia de los efectos del veneno entero en el sistema nervioso central, apoya la idea de una relación filogenética estrecha entre las especies distribuidas al norte de la cuenca amazónica, en comparación con las especies distribuidas al sur, como *T. serrulatus*, *T. stigmurus* y *T. bahiensis*.

Se requiere investigación adicional de la venómica de *T. forcipula*. Se estima una media de 70 péptidos que pueden aislarse a partir del veneno de cada una de las especies de escorpión conocidas (Possani, 1999) y solo una minoría se ha evaluado funcionalmente. Además, la reconocida variabilidad de la composición de los venenos de escorpión (dependencia de estado fisiológico de la glándula, sexo y edad del espécimen, localidad de procedencia) sugiere investigar el veneno de *T. forcipula* desde esta perspectiva, aislando los componentes ya identificados en el veneno con actividad biológica, y caracterizándolos desde el punto de vista bioquímico y electrofisiológico, mediante las técnicas ilustradas en la presente investigación: SDS-PAGE y MS, HPLC y transcriptómica.

Los múltiples y complejos factores que regulan la composición del veneno en *T. forcipula*, podrían investigarse mediante estudios del transcriptoma de la glándula en reposo en comparación con los presentes resultados de la glándula “activa”. Hay evidencia de que el perfil del veneno puede variar dependiendo de factores como el estado fisiológico de la glándula productora, la longitud y localización de intrones en los genes de las toxinas, condiciones medioambientales, localización geográfica, sexo y edad de los especímenes. Finalmente, la taxonomía de los escorpiones es materia de discusión entre los expertos, y respecto a los escorpiones *Tityus* presenta vacíos y desacuerdos, que se pueden ayudar a

resolver mediante un mejor conocimiento del venoma de *T. forcipula* (transcriptoma y proteoma).

Mediante aproximación proteómica se identificaron 44 componentes individuales, con masas comprendidas principalmente en los rangos reconocidos por incluir péptidos que modifican la actividad de los canales Na_v y K_v . Mediante aproximación transcriptómica se identificaron 218 componentes putativos del veneno de *T. forcipula*, principalmente enzimas, y entre ellas las más abundantes fueron las proteasas. Se secuenciaron parcialmente cinco péptidos aislados del veneno, identificados como α y β -sodio toxinas, y fue secuenciado totalmente un péptido identificado como α -potasio toxina. Las secuencias de estos péptidos fueron identificadas en el transcriptoma, aunque excepto en el caso de la KTx (que tuvo 100% de similitud), las masas putativas de los péptidos maduros, y las determinada mediante ESI-MS, fueron diferentes. Las causas de la inconsistencia entre datos de proteómica y transcriptómica han sido discutidas en otros estudios.

En experimentos de electrofisiología sobre canal $\text{hNa}_v1.5$ expresado de forma transitoria en células HEK 293, el veneno entero de *T. forcipula* inhibió la corriente máxima en una forma dependiente de la concentración. La subfracción III-3(9), que según la evidencia corresponde con la toxina de masa 7350 Da, inhibió la corriente pico en un 40% y desplazó la curva de activación hacia la derecha. Los efectos neurotóxicos centrales y autonómicos, y el intenso dolor asociado a la picadura, sugieren investigación adicional mediante electrofisiología, de los efectos de fracciones purificadas, caracterizadas como α y β -toxinas putativas, sobre otras isoformas de canales Na_v presentes en sistema nervioso y músculo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Rahman MA, Ayed AS, Abdel-Mottaleb Y, Omran MAA y Nabil ZI. 2015. Cardiac disorders and mode of action of the Egyptian scorpion venom *Androctonus bicolor* on isolated toad's heart. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 72, 137–144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.09.003>.

Abdel-Rahman MA, Quintero-Hernández V, Possani LD. 2016. Scorpion venom gland transcriptomics and proteomics: An overview. En: Gopalakrishnakone P, Calvete JJ, editores. *Venom Genomics and Proteomics, Toxinology*. Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2016. p. 105-124.

Abdel-rahman, M. A., & Possani, L. D. 2008. *Toxinology*. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 1–17. <https://doi.org/10.1351/goldbook.t06419>.

Adi-Bessalem S, Hammoudi-Triki D y and Laraba-Djebbet F. 2015. Scorpion Venom Interactions with the Immune System. USTHB, University of Science and Technology Houari Boumediene, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Algiers, Algeria *Toxinology*. DOI 10.1007/978-94-007-6647-1_3-1. p. 87-107.

Afgan E, Baker D, Batut B, Van den Beek M, Bouvier D, Cech M, Chilton M, Clements D, Coraor N, Grüning B, Guerler A, Hillman-Jackson J, Hiltemann S, Jalili V, Rasche H, Soranzo N, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A y Blankenberg D. 2018. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*. Vol. 46, Web Server issue. DOI: 10.1093/nar/gky379.

Afgan E, Baker D, Van den Beek M, Blankenber D, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Eberhard C, Grüning B, Guerler A, Hillman-Jackson J, Von Custer G, Rasche E, Soranzo N, Turaga N, Taylor J, Nekrutenko A y Goecks J. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*. Vol. 44, Web Server issue. DOI: 10.1093/nar/gkw343.

Ali T, Kim B, Lijeron C, Dong C, Wultsch C y Krampis K. 2018. Implementation of a Reproducible, Accessible and Transparent RNA-seq Bioinformatics Pipeline within the Galaxy Platform. *J Comput Sci Syst Biol*. 11:3. DOI: 10.4172/jcsb.1000272.

Almeida F.M., Pimienta A.M.C., De Figueiredo S.G., Santoro M.M., Martin-Eauclaire M.F., Diniz C.R. y De Lima M.E. 2002. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Laboratorio de Venenos e toxinas animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais*.

Almeida D, Scortecci K, Kobashi L, Agnez-Lima L, Medeiros S, Silva-Junior A, Junqueira-de-Azevedo I y Fernandes-Pedrosa M. 2012. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. *BMC Genomics* 2012. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/362>.

Alvarenga E, Mendes T, Magalhães B, Siqueira F, Dantas A, Barroca T, Horta C, Kalapothakis E. 2012. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open Journal of Genetics*, 2012, 2, 210-220. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <http://dx.doi.org/10.4236/ojgen.2012.24027>

Anders S, Pyl PT y Huber W. 2014. HTSeq: A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 31 (2):166-169. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu638.

Amorim F.G., Longhim H.T., Cologna C.T., Degueldre M., De Pauw E., Quinton L., Arantes E.C. 2019. Proteome of fraction from *Tityus serrulatus* venom reveals new enzymes and toxins. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*.

Armstrong, C. M. (2006). Na channel inactivation from open and closed states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(47): 17991–17996.

Bai Z-T, Liu T, Pang X-Y, Jiang F, Cheng M, Ji Y-H. 2008. Functional depletion of capsaicin-sensitive primary afferent fibers attenuates rat pain-related behaviors and paw edema induced by the venom of scorpion *Buthus martensi* Karch. *Neuroscience Research*. 62: 78–85. doi:10.1016/j.neures.2008.06.004.

Barona J., Otero R. y Núñez V. 2004. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: Capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica* 24, 42-49

Barona, J., Batista, C.V.F., Zamudio, F., Gomez-Lagunas, F., Wanke, E., Otero, R., Possani, L.D. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ and K⁺ channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764, 76 – 84.

Baroudi G, Napolitano C, Priori SG, Del Bufalo A y Chahine M. 2004. Loss of function associated with novel mutations of the SCN5A gene in patients with Brugada syndrome. *The Canadian Journal of Cardiology*. 20(4):425-430. PMID: 15057319

Bartok A, Panyi G y Varga Z. 2015. Potassium Channel-Blocking Peptide Toxins from Scorpion Venom. En: Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz E, Rodríguez de la Vega RC, editores. *Scorpion Venoms, Toxinology*. Netherlands, Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2015. P. 493-527.

Bartok, A., A. Toth, S. Somodi, T. G. Szanto, P. Hajdu, G. Panyi, Z. Varga. 2014. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels. *Toxicon* 87, 6e16

Basrai, D., Kraft, R., Bollensdorff, C., Liebmann, L., Benndorf, K., Patt, S. 2002. BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. *Neuroreport* 13, 403-407.

Bernardes C, Santos-Filho N.A., Costa T.R., M.S.R., Torres F.S. Costa J, Borges M.H., Richardson M, Dos Santos D.M., De Castro Pimenta A.M., Homsí-Brandeburgo M.I., Soares A.M., De Oliveira F. 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin (ogen)olytic metalloproteinase from Bothrops moojeni snake venom. *Toxicon* 51 (2008) 574–584.

Bhattacharya A, Wickenden AD y Chaplan SR. 2009. Sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics*. 6: 663-787.

Bloch, M., Ousingsawat, J., Simon, R., Schraml, P., Gasser, T.C., Mihatsch, M.J., Kunzelmann, K., Bubendorf, L. 2007. KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene* 26, 2525-2534.

Bordon K.C.F., Cologna C.T. y Arantes EC. 2015. Scorpion Venom Research Around the World: *Tityus serrulatus*. En: Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz E, Rodríguez de la Vega RC, editores. *Scorpion Venoms, Toxinology*. Netherlands, Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2015. P. 411-438.

Bordon K.C.F., Wiezel G.A., Amorin F.G. y Arantes EC. 2015. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* (2015) 21:43. DOI 10.1186/s40409-015-0042-7.

Borges A, Arantes EC y Giglio JR. 1990. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (KARSCH). *Toxicon*. 28: 1011-7.

Borges A.1996. Escorpionismo en Venezuela. *Acta biol. Venez.*16(3): 65-75.

Borges A y De Souza L. 2006. Escorpionismo en Venezuela: Una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. *Revista Facultad de Farmacia*. 69: 1 y 2.

Borges A, Arandia J, Colmenares De Arias Z, Vargas AM y Alfonzo MJ. 2002. Caracterización Epidemiológica y Toxicológica del Envenenamiento por *Tityus Zulianus* (Scorpiones, Buthidae) en el Estado Mérida, Venezuela. *RFM [online]*. 25(1): 76-79.

Borges A, Alfonzo MJ, García CC, Winand NJ, Leipold E y Heinemann SH. 2004. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel β -toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon* 43 (2004) 671–684.doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.022

Borges A, García C, Lugo E, Alfonzo M, Jowers M, Op Den Camp H. 2006. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): Molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142, 240–252.

Bucaretschi F, Fernandes LCR, Fernandes CB, Branco MM, Prado CC, Vieira RJ, De Capitani EM y Hyslop S. 2014. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. *Toxicon* 89 (2014) 17-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.022>

Campos F, Chanda B, Beirão PSL y Bezanilla F. 2008. α -Scorpion Toxin Impairs a Conformational Change that Leads to Fast Inactivation of Muscle Sodium Channels. *J Gen. Physiol.* Vol. 132 No. 2 251-253.

Carmo AO, Oliveira-Mendes BB, Horta CC, Magalhães BF, Dantas AE, Chaves LM. 2014. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. *Toxicon*. 90:45-55.

Catterall W. 2010. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron Review* 67, September 23, 2010. Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle. DOI 10.1016/j.neuron.2010.08.021. p. 915-928.

Cestèle S, Qu Y, Rogers J.C., Rochat H, Scheuer T y Catterall W. 1998. Voltage Sensor-Trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by β -Scorpion Toxin Bound to the S3-S4 Loop in Domain II. *Neuron* Vol. 21, October 1998. p. 919-931.

Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Qu Y, Sampieri F, Scheuer T y Catterall WA. 2006. Structure and Function of the Voltage Sensor of Sodium Channels Probed by a β -Scorpion Toxin. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 281, N° 30, July 28 2006. p. 21332-21344. DOI 10.1074/jbc.M603814200.

Chávez-Haro A y Ortiz E. 2015. Scorpionism and Dangerous Species of Mexico. *Toxinology*. p. 201-213. DOI 10.1007/978-94-007-6647-1_23-1.

Chen B, Wang C, Ji Y. Scorpion BmK venom induces nociceptive response of rats by plantar injection. *Neurotoxicol Teratol.* 23: 675-679.

Chippaux JP y Goyffon M. 2008. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica* 107. 71-79. Doi:10.1016/j.actatropica.2008.05.021

Cho W y Kézdy FJ. 1991. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A2. *Methods Enzymol.* 197:75-9. DOI: 10.1016/0076-6879(91)97134-k

Cid-Uribe JI, Santibáñez-López CE, Meneses EP, Batista CVF, Jiménez-Vargas JM, Ortiz E y Possani LD. 2018. The diversity of venom components of the scorpion species *Paravaejovis schwenkmeyeri* (Scorpiones: Vaejovidae) revealed by transcriptome and proteome analyses. *Toxicon* 151 (2018) 47-62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.085>

Cid-Uribe JI, Meneses EP, Batista CVF, Ortiz E y Possani LD. 2019. Dissecting Toxicity: The Venom Gland Transcriptome and the Venom Proteome of the Highly Venomous Scorpion *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879). *Toxins*. 11: 247. Doi: 10.3390/toxins11050247

Cologna, C. T., Marcussi, S., Giglio, J. R., Soares, A. M., & Arantes, E. C. 2009. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein and Peptide Letters* 16(8), 920-932.

Coronas FIV, Diego-García E, Restano-Casusulini R, de Roodt AR y Possani LD. 2015. Biochemical and physiological characterization of a new Na⁺-channel specific peptide from the venom of the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Peptides*. 68: 11–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2014.05.002>.

Corzo, G., Papp F, Varga Z, Barraza O, Espino-Solís P, Rodríguez de la Vega R, Gaspar R, Panyi G y Possani L.D. 2008. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochemical Pharmacology* 76, 1142–1154.

Costal-Oliveira F, Guerra-Duarte C, Oliveira MS, Pereira de Castro KL, Lopes-de-Sousa L, Lara A, Gomes ER, Bonilla C, Guatimosim S, Melo MM y Chávez-Olórtegui C. 2017. Cardiorespiratory alterations in rodents experimentally envenomed with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. 2017. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 23:2. DOI: 10.1186/s40409-016-0076-5

Cremonez CA, Maiti M, Peigneur S, Cassoli JS, Dutra AAA, Waelkens E, Lescrinier E, Herdewijn P, de Lima ME, Pimenta AMC, Arantes EC y Tytgat J. 2016. Structural and Functional Elucidation of Peptide Ts11 Shows Evidence of a Novel Subfamily of Scorpion Venom Toxins. *Toxins*. 8: 288. Doi: 10.3390/toxins8100288.

Cummins T.R., Sheets P.L. y Waxman S.G. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain* 2007; 131: 243-257.

De Oliveira, U.C.; Candido, D.M.; Dorce, V.A.C.; Junqueira-De-Azevedo, I.D.L.M. 2015. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. *Toxicon*. 95: 52–61.

De Oliveira UC, Nishiyama MY Jr, Dos Santos MBV, Santos-da-Silva AP, Chalkidis HM, Souza-Imberg A, et al. 2018. Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. *PLoS One*. 3(3):e0193739.

D'Suze G, Schwartz EF, García-Gómez BI, Sevcik C y Possani LD. 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. *Biochimie*. 91(8):1010-19.

D'Suze G, Sevcik C, Brazón J. 2011. Fisiopatología inducida por el veneno de alacranes del género *Tityus* de Venezuela. En: D'Suze G, Corzo G, Paniagua J, editores. *Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas*. México: Documaster, SA de CV. p. 31–63.

D'Suze G, Castillo C, Sevcik C, Brazón J, Malave C, Hernández D y Zerpa N. 2015. Scorpionism and dangerous species of Venezuela. En: Gopalakrishnakone P, Possani LD,

Schwartz E, Rodríguez de la Vega RC, editores. Scorpion Venoms, Toxinology. Netherlands, Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2015. P. 493-527273-298

De Sousa L, Parrilla-Álvarez P, Quiroga M. 2000. An epidemiological review of scorpion stings in Venezuela. The north eastern region. J Venom Anim Toxins. 2000; 6:127–65.

De Sousa L, Vásquez D, Salazar D, Valecillos R, Vásquez D, Rojas M, Parrilla-Álvarez P, Quiroga M. 2005. Mortalidad en humanos por envenenamientos causados por invertebrados y vertebrados en el estado Monagas. Invest Clin. 46:241–54.

Deuis JR, Mueller A, Israel MR y Vetter I. 2017. The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators. Neuropharmacology 127: 87-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.014>

Dixon, WJ. 1965. The Up-and-Down Method for Small Samples. Journal of the American Statistical Association, 60(312), 967-978. <http://www.jstor.org/stable/2283398>.

Erdemli G, Kim AM, Ju H, Springer C, Penland RC y Hoffmann PK. 2012. Cardiac safety implications of hNav1.5 blockade and a framework for pre-clinical evaluation. Frontiers in Pharmacology. 3:6-9. Doi: 10.3389/fphar.2012.00006

Erdes E., D. T. Somay, C. I. İlhan, D. Tarık, K. K. Boğaç, S. Tamay et al. 2014. Characterization of *Leiurus abdullahbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis [Internet]; 20:1-8. Recuperado de: www.scielo.br/scielo. Epub Dec 02, 2014.

Escoubas, P. (2006). Mass spectrometry in toxinology: A 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. Toxicon, 47(6), 609–613. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.013>

Espino-Solis G.P., Estrada G, Olamendi-Portugal T, Villegas E, Zamudio F, Cestèle S, Possani LD y Corzo G. 2011. Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. Toxicon 57, 739–746.

Estrada-Gómez, Vargas-Muñoz LJ, Saldarriaga-Córdoba M y Quintana JC. 2016. Venom from *Opisthacanthus elatus* scorpion of Colombia, could be more hemolytic and less neurotoxic than thought. Acta Trop. 153:70-8. Doi: 10.1016/j.actatropica.2015.09.019.

Estrada-Gomez S, Gomez-Rave L, Vargas-Munoz LJ y van der Meijden A. 2017. Characterizing the biological and biochemical profile of six different scorpion venoms from the Buthidae and Scorpionidae family. Toxicon. 130. 104-115. <http://dx.doi.org/10.1016/>

Fet, V., Sissom, W. D.; Lowe, G.; Braunwalder, M (Eds.). 2000. Catalog of the scorpions of the world (1758-1998). New York Entomological Society. USA.

Fischer M, Carli G, Raboisson P y Reeh P. 2014. The interphase of the formalin test. Pain. 155(3): 511-521. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.015>

Fletcher PLJr, Fletcher MD, Weninger K, Anderson TE y Martin BM. 2010. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *J Biol Chem*. 285(10):7405-16.

Flórez, E. 2001. Escorpiones de la familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. *Biota Colombiana* 2(1), 25-30.

Flórez E, 2010. Escorpiones: estado actual de su conocimiento en Colombia. *Memorias del XXXVII Congreso de Entomología*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. P. 154-162

Fox, J. G (editor en jefe). *Laboratory animal medicine*. 3a edición. Academic Press. 2015.

García-Calvo, M., Leonard, R.J., Novick, J., Stevens, S.P., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L. 1993. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J. Biol. Chem*. 268, 18866-18874.

Geddes LA. 1979. *The direct and indirect measurement of blood pressure*. Chicago (Ill): Year Book Medical Publishers.

Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D, Albert I, Taylor J, Miller W, Kent WJ y Nekrutenko A. 2019 *Galaxy: A platform for interactive large-scale genome analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1451-7. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/>

Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J y The Galaxy Team. 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biology*. 11:R86. DOI: <http://genomebiology.com/2010/11/8/R86>

Gómez JP, Velásquez P, Saldarriaga M, Díaz AC, Otero R. 2002. Aspectos biológicos y ecológicos del escorpión *Tityus fuhrmanni* (Kraepelin, 1914), en poblaciones del cerro El Volador y barrios aledaños de la ciudad de Medellín. *Actual Biol*. 24 (77), 103-111.

Gómez JP y Otero R. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 2007; 25(1): 50-60

Gómez, JP., JC. Quintana, P. Arbeláez, J. Fernández, J. F. Silva, J. Barona, JC. Gutiérrez, A. Díaz y R. Otero. 2010. Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá, Colombia: aspectos epidemiológicos, clínicos y toxicológicos. *Biomédica*. 30: 126-39.

Gómez JP, Otero R, Núñez V, Saldarriaga M, Díaz A, Velásquez M. 2002. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* (Kraepelin). *MEDUNAB*. 5(15):159-65.

Gómez JP, Quintana JC, Arbeláez P, Fernández J, Silva JF, Barona J, Gutiérrez JC, Díaz A, Otero R. 2010. Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá, Colombia: aspectos epidemiológicos, clínicos y toxicológicos. *Biomédica*. 30(1):126–39.

Grimsley GR y Pace N. 2003. Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science* (2003) 3.1.1-3.1.9.

Guerra-Duarte C, Horta CCR, Oliveira-Mendes BBR, Magalhães B de F, Costal-Oliveira F, Stransky S, de Freitas CF, Campolina D, de Oliveira Pardal PP, Lira-daSilva R, Machado de Ávila RA, Kalapothakis E, Chávez-Olórtegui C. 2019. Determination of hyaluronidase activity in *Tityus* spp. scorpion venoms and its inhibition by Brazilian antivenoms. *Toxicon*. 167: 134-143. Doi: 10.1016/j.toxicon.2019.06.019.

Guerrero-Vargas JA, C. B. F. Mourao, V. Quintero-Hernández, L. D. Possani y E. F. Schwartz. 2012. Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* Novel Putative Na⁺-Channel Scorpion Toxins. *PLoS ONE* (www.plosone.org).

Guerrero-Vargas JA, Rodríguez JR, Ayerbe S, Flórez E y Beltrán JT. Scorpionism and dangerous species of Colombia. En: Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz E, Rodríguez de la Vega RC, editores. *Scorpion Venoms, Toxinology*. Netherlands, Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2015. p. 245-272.

Guías para el Manejo de Urgencias Toxicológicas. Ministerio de la Protección Social. Imprenta Nacional de Colombia. 2008. Bogotá, D. C., Colombia

Guinand A, Cortés H, D'Suze G, Díaz P, Sevcik C, González-Sponga M y Eduarte G. 2004. Escorpionismo del género *Tityus* en la sierra falconiana y su correlación con la liberación de mediadores inflamatorios y enzimas cardíacas. *Gac Méd Caracas*; 112(2):131-138.

Gurevitz M, Gordon D, Barzilai MG, Kahn R, Cohen L, Moran Y, Zilberberg N, Froy O, Altman-Gueta H, Turkov M, Dong K y Karbat I. 2015. Molecular Description of Scorpion Toxin Interaction with Voltage-Gated Sodium Channels. En: Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz E, Rodríguez de la Vega RC, editores. *Scorpion Venoms, Toxinology*. Netherlands, Dordrecht: Springer Science+Business Media; DOI 10.1007/978-94-007-6404-0_10.

Haas BJ, Papanicolau A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, LeDuc RD, Friedman N y Regev A. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc*. 8(8): 10.1038/nprot.2013.084.

Harrison P, Abdel-Rahman MA, Miller K y Strong PN. 2014. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*. 88:115-37. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.06.006.

Holzer M y Mackessy SP. 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 34(10):1149-55. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00057-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00057-8)

Housley DM, Housley GD, Liddell MJ y Jennings EA. 2017. Scorpion toxin peptide action at the ion channel subunit level. *Neuropharmacology*. 127: 46-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.004>

Huang X. y L.Y. Jan. 2011. Targeting potassium channels in cancer. *J. Cell Biol*. 206(2): 151-152.

Hunskar S & Hole K (1987) The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30; 103-114.

Infante-Vázquez O, Sánchez-Torres G, Martínez-Memije R, Flores-Chávez P, Pastelin-Hernández G, Sánchez-Miranda M. 1997. Medición de la presión arterial utilizando el retardo en el pulso distal. *Rev Bras Eng Bioméd*. 13:81-92.

Irwin, S. 1968. Comprehensive observational assessment: A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*.13:222-257.

Ishikawa T, Sato A, Marcou CA, Tester DJ, Ackerman JA, Crotti L, Schwartz PJ, On YK, Park JE, Nakamura K, Hiraoka M, Nakazawa K, Sakurada H, Arimura T, Makita N y Kimura A. 2012. A Novel Disease Gene for Brugada Syndrome Sarcolemmal Membrane– Associated Protein Gene Mutations Impair Intracellular Trafficking of hNav1.5. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 1098-1107. DOI: 10.1161/CIRCEP.111.969972.

Israel MR, Tay B, Deuis JR y Vetter I. 2017. Sodium channels and venom peptide pharmacology. *Adv Pharmacol*. 79:67-116

Izquierdo LM y Rodríguez JR. 2012. Cardiovascular dysfunction and pulmonary edema secondary to severe envenoming by *Tityus pachyurus* sting. Case report. *Toxicon* 60: 603–606.

Jang, S.H., Choi, S.Y., Ryu, P.D., Lee, S.Y. 2011. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol*. 651, 26-32.

Jiménez-Charris E, Montealegre-Sánchez L, Solano-Redondo L, Castro-Herrera F, Fierro-Pérez L y Lomonte B. 2016. Divergent functional profiles of acidic and basic phospholipases A2 in the venom of the snake *Porthidium lansbergii lansbergii*. *Toxicon*. 119:289-298.

Jungo F, Bougueleret L, Xenarios I y Poux S. 2012. The UniProtKB/Swiss-Prot Tox-Prot program: A central hub of integrated venom protein data. *Toxicon*. 60(4):551-557. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.010>.

King D, Langmead B y Salzberg SL. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*. 12 (4):357-360 [doi:10.1038/nmeth.3317].

Krayem N, Abdelkefi-Kouba Z, Marrakchi N, Luis J y Gargouri Y. 2018. Anti-angiogenic effect of phospholipases A₂ from *Scorpio maurus* venom glands on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Toxicon*. 145: 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.042>

Kuang, Q., P. Purhonen y H. Herbert. 2015. Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci*. 72, 3677–3693.

Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. 2006. Evaluation of Blood Pressure Measured by Tail-Cuff Methods (without Heating) in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29 (8):1756-8

Laraba-Djebari F, Adi-Bessalem S y Hammoudi-Triki D. 2013. Scorpion Venoms: Pathogenesis and Biotherapies. En: Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz E, Rodríguez de la Vega RC, editores. *Scorpion Venoms, Toxinology*. Netherlands, Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2015. p. 1-21. DOI 10.1007/978-94-007-6647-1_2-1.

Lazcano-Ponce E, Salazar-Martínez E, Gutiérrez-Castrellón P, Angeles-Llerenas A, Hernández-Garduño A, Viramontes JL. 2004. Ensayos clínicos aleatorizados: variantes, métodos de aleatorización, análisis, consideraciones éticas y regulación. *Salud pública de méxico* / vol.46(46).

Liu T, Pang XY, Jiang F, Ji YH. Involvement of spinal nitric oxide (NO) in rat pain-related behaviors induced by the venom of scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*. 2008; 52 (1):62–71.

Liu B, Madduri RK, Sotomayor B, Chard K, Lacinski L, Dave UJ, Li J, Liu C y Foster IT. 2014. Cloud-based bioinformatics workflow platform for large-scale next-generation sequencing analyses. *Journal of Biomedical Informatics*. 49:119–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2014.01.005>.

Lourenço W. 2000. Synopsis of the Colombian species of *Tityus* Koch (Chelicerata, Scorpiones, Buthidae), with descriptions of three new species. *Journal of Natural History*, 2000, 34, 449–461.

Luna-Ramírez K, Quintero-Hernández V, Juárez-González VR, Possani LD (2015) Whole Transcriptome of the Venom Gland from *Urodacus yaschenkoi* Scorpion. *PLoS ONE* 10(5): e0127883. doi:10.1371/journal.pone.0127883

Marinkelle C.J, Stahnke H.L. 1965. Toxicological and clinical studies on *Centruroides margaritatus* (Gervais), a common scorpion in western Colombia. *J Med Entomol*. 1965; 2(2):197-99.

Martin-Eauclaire, M.-F., Pimenta, A.M.C., Bougis, P.E., De Lima, M.-E. 2016. Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello). *Toxicon* 119, 253-265

Martin-Euclaire MF, Bougis PE, De Lima ME. 2018. Ts1 from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*: A half-century of studies on a multifunctional beta like-toxin. *Toxicon* 152 (2018) 106–120.

Mcferrin, M. B. y Sontheimer H. 2006. A role for Ion Channels in Glioma Cell Invasion. *Neuron Glia Biology*. 2(1): 39–49.

Meents, J y Lampert, A. 2016. Studying Sodium Channel Gating in Heterologous Expression Systems. En: *Advanced Patch-Clamp Analysis for Neuroscientists* (pp.37-65) DOI: 10.1007/978-1-4939-3411-9_3. (Capítulo de libro)

Mendes TM, Guimaraes-Okamoto P.T.C., Machado-de-Avila RA, Oliveira D, Melo MM, Lobato ZI, Kalapothakis E, Chavez-Olórtegui C. 2015. General characterization of *Tityus fasciolatus* scorpion venom. Molecular identification of toxins and localization of linear B-cell epitopes. *Toxicon*. 99. 109-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.03.018>.

Miyamoto JG, Andrade FB, Ferraz CR, Cândido DM, Knysak I, Venancio EJ, Verri Jr WA, Landgraf MA, Landgraf RG y Kwasniewski FH. 2018. A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms. *Toxicon* 141 (2018) 25-33.

Morales-Duque H, Mourão CBF, Tibery DB, Barbosa EA, Campos LA y Schwartz EF. 2017. To4, the first *Tityus obscurus* β -toxin fully electrophysiologically characterized on human sodium channel isoforms. *Peptides*. 95. 106–115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2017.07.010>.

Moreno-Vélez FH. 2008. Actividad neurotóxica del veneno de dos especies de escorpión del Valle del Cauca. Tesis de grado para optar al título de Biólogo. Cali, Colombia. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. 59 p.

Nencioni ALA, Neto EB, Alves de Freitas L y Coronado Dorce VA. 2018. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. *Journal of Venomous Animals and toxins including Tropical Diseases*. 24:3. DOI 10.1186/s40409-018-0139-x

Nishikawa AK, Caricati CP, Lima ML, Dos Santos MC, Kipnis TL, Eickstedt VR, Knysak I, Da Silva MH, Higashi HG, Da Silva WD. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*. 1994; 32:989–98.

Olamendi-Portugal T, Somodi S, Fernández JA, Zamudio FZ, Becerril B, Varga Z, Panyi G, Gáspár G y Possani LD. 2005. Novel a-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 KC channels of T cells. *Toxicon*. 46: 418–429

Olamendi-Portugal, T., Bartok, A., Zamudio-Zuniga, F., Balajthy, A., Becerril, B., Panyi, G., Possani, L.D. 2016. Isolation, chemical and functional characterization of several new K⁺ channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*. *Toxicon* 115, 1-12.

Ortiz, E., Gurrola, G.B., Schwartz, E.F., Possani, L.D. 2015. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon* 93, 125-135.

Ortiz E y Possani LD. 2018. Scorpion toxins to unravel the conundrum of ion channel structure and functioning. *Toxicon*. 150:17-27. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.032>.

Otero, R., E. Navío, F. A. Céspedes, M. J. Núñez, L. Lozano, E. R. Moscoso, C. Matallana, N. B. Arsuza, J. García, D. Fernández, J. H. Rodas, O. J. Rodríguez, J. E. Zuleta, J. P. Gómez, M. Saldarriaga, J. C. Quintana, V. Núñez, S. Cárdenas, J. Barona, R. Valderrama, N. Paz, A. Díaz, O. L. Rodríguez, M. D. Martínez, R. Maturana, L. E. Beltrán, M. B. Mesa, J. Paniagua, E. Flórez & W. R. Lourenço. 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.

Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. 2005. Role of Voltage-gated Potassium Channels in Cancer. *Journal of Membrane Biology*. 205: 115–124.

Pardo LA y Stühmer W. 2008. Eag1: An Emerging Oncological Target. *Cancer Res*. 68: (6). doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5710.

Pardo, L.A., Stühmer, W. 2014. The roles of K⁺ channels in cancer. *Nat Rev Cancer*. 14: 39-48.

Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*. 475:353–8.

Peigneur S, Cologna CT, Cremonez CM, Mille BG, Pucca MB, Cuypers E, Arantes EC y Tytgat J. 2015. A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin1 on NaV-type isoforms. *Neuropharmacology*. 95. 269-277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.027>.

Paneque-Peres AC, Nonaka PN, de Carvalho PTC, Toyama MH, Melo CA, Vieira RP, Dolhnikoff M, Zamuner SR, de Oliveira LVF. 2009. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon*. 53. 779–785. Doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.002.

Peigneur S. y Tytgat J. 2018. Toxins in Drug Discovery and Pharmacology. *Toxins*. 10(3), 126; <https://doi.org/10.3390/toxins10030126>.

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 785. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>.

Petricevich VL, 2010. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Mediators Inflamm.* 2010: 903295. Doi: 10.1155/2010/903295.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem.* 1999; 264:287–300.

Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desakorn V, McMichael AJ, White NJ, Bunnag D. 1988. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon.* 26(7): 629-637. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90245-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90245-0).

Quintero-Hernández V, Ortiz E, Rendón-Anaya M, Schwartz EF, Becerril B, Corzo G y Possani LD. 2011. Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression. *Toxicon* 58: 644–663.

Quintero-Hernández, V., Jimenez-Vargas, J.M., Gurrola, G.B., Valdivia, H.H., Possani, L.D., 2013. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* 76, 328e342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.012>

Quintero-Hernández, V., Ramírez-Carreto, S., Romero-Gutierrez, M.T., Valdéz-Velazquez, L.L., Becerril, B., Possani, L.D., Ortiz, E., 2015. Transcriptome analysis of scorpion species belonging to the *Vaejovis* genus. *PLoS One* 10 (2), e0117188. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0117188>.

Ramírez A, Gurrola GB, Martin B y Possani LD. 1988. Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *centruroides limpidus tecomanus* hoffmann. *Toxicon.* 26(9):773-783.

Rendón-Anaya, M., Delaye, L., Possani, L.D., Herrera-Estrella, A., 2012. Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species. *PLoS One* 7, e43331. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043331>.

Rendon-Anaya, M., Camargos, T.S., Ortiz, E., 2015. Scorpion venom gland transcriptomics. In: Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., Schwartz, E.F., Rodríguez de la Vega, R.C. (Eds.), *Scorpion Venoms*. Springer Dordrecht Heidelberg, New York London, pp. 531-545.

Repetto, M. y Repetto, G. *Toxicología Fundamental*. Díaz de Santos eds. Sevilla: 2009. \$a edición.

Riaño-Umbarila L, Rodríguez-Rodríguez ER, Santibáñez-López CE, Güereca L, Uribe-Romero SJ, Gomez-Ramírez IV, Cárcamo-Noriega EN, Possani LD y Becerril B. 2017. Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon* 138: 130-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.022>.

Rincón-Cortés CA, Reyes-Montaña EA y Vega-Castro NA. 2017. Purificación parcial de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* (Buthidae) y evaluación

preliminar de su actividad citotóxica. Biomédica. 37:238-49.
<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3265>

Rincón-Cortés CA, Olamendi-Portugal T, Cárcamo-Noriega EN, González-Santillán E, Zamudio F, Reyes-Montaña EA, Vega Castro NA y Possani LD. 2019. Structural and functional characterization of toxic peptides purified from the venom of the Colombian scorpion *Tityus macrochirus*. Toxicon 169 (2019) 5–11.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.07.013>.

Rodríguez De La Vega, R. C. & L. D. Possani. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K-channels. Toxicon. 43: 865–875.

Rodríguez de la Vega, R. C., Possani, L. D. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. Toxicon 46(8), 831-44.

Rodríguez de la Vega RC, Schwartz EF y Possani LD. 2010. Mining on scorpion venom diversity. Toxicon 56 (2010) 1155–1161. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.010.

Rodríguez de la Vega RC, Vidal N y Possani LD. 2013. Scorpion Peptides. En: Handbook of Biologically Active Peptides. Kastin AJ (Editor). Academic Press. 2a edición. USA. Cap 59. P. 423-426. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00059-2>

Rodríguez A, Rodríguez Y, Yusef F, Trejo E, Rossini M y Zerpa H. 2015. Hematological alterations induced by *Tityus discrepans* scorpion Venom in mice. Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 56(1):10-16. 2015

Roeding F, Borner J, Kube M, Klages S, Reinhardt R, Burmester T. A. 2009. 454 sequencing approach for large scale phylogenomic analysis of the common emperor scorpion (*Pandinus imperator*). Mol Phylogenet Evol. 53:826–34.

Roux S, Sablé E y Porsol RD. 2005. Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function. Current Protocols in Pharmacology. (2014) 10.10.1-10.10.23.

Rowe AH, Xiao Y, Scales J, Linse KD, Rowe MP, Cummins TR y Zakon H. 2011. Isolation and Characterization of CvIV4: A Pain Inducing α -Scorpion Toxin. PlosOne. 6(8): e23520.

Samy RP, Stiles BG, Franco OL, Sethi G y Lim LHK. 2017. Animal venoms as antimicrobial agents. Biochemical Pharmacology 134 (2017) 127–138.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.005>.

Santibáñez-López CE y Possani LD. 2015. Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. Toxicon. 107: 317-326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.029>.

Santibanez-López CE, Cid-Urbe JI, Batista CVF, Ortiz E y Possani LD. 2016. Venom Gland Transcriptomic and Proteomic Analyses of the Enigmatic Scorpion *Superstitionia donensis* (Scorpiones: Superstitioniidae), with Insights on the Evolution of Its Venom Components. *Toxins* 2016, 8, 367; doi: 10.3390/toxins8120367.

Santibáñez-López CE, Cid-Urbe JI, Zamudio FZ, Batista CVF, Ortiz E y Possani LD. 2017. Venom gland transcriptomic and venom proteomic analyses of the scorpion *Megacormus gertschi* Díaz-Najera, 1966 (Scorpiones: Euscorpiidae: Megacorminae). *Toxicon*. 133. 95-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.05.002>.

Seoane, 2014. Modelos mixtos (lineales)? Una introducción para el usuario temeroso. *ETOLOGUÍA*, 24 (2014). Grupo de Ecología Terrestre (TEG). Dpto. Ecología, Universidad Autónoma de Madrid.

Smith, J., Alewood, P. 2015. Modern venom profiling: mining into scorpion venom biodiversity. In: Gopalakrishnakone, P., Ferroni Schwartz, E., Possani, L.D., Rodríguez de la Vega, R.C. (Eds.), *Scorpion Venoms*. Springer, Netherlands, pp. 1-15.

Stockman R. Introduction to Scorpion Biology and Ecology. En: Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz E, Rodríguez de la Vega RC, editores. *Scorpion Venoms*, Toxinology. Netherlands, Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2015. p. 25-59.

Sutti R, Tamascia ML, Hyslop S y Rocha-e-Silva TAA. 2014. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 20:2. <http://www.jvat.org/content/20/1/2>.

Teixeira Jr AL, Fontourab B.F., Freire-Maiac L, Machado C.R.S., Camargos E.R.S., Teixeira M.M. 2001. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon* 39 (2001) 703–709

Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL y Pachter L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*. 7(3):563-578. DOI:10.1038/nprot.2012.016.

Tytgat, J., K.G. Chandy, M.L. Garcia, G.A. Gutman, MF. Martin-Eauclaire, J.J. van der Walt y L. D. Possani. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: a-KTx molecular subfamilies. *TiPS* 20, 444-447.

Valdez-Velázquez LL, Quintero-Hernández V, Romero-Gutiérrez MT, Coronas FIV y Possani LD (2013) Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. *PLoS ONE* 8(6): e66486. doi: 10.1371/journal.pone.0066486

Venancio EJ, Portaro FC, Kuniyoshi AK, Carvalho DC, Pidde-Queiroz G y Tambourgi DV. 2013. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon*. 69:180-90.

Wang W y Huang T. 2002. Purification and Characterization of a Novel Metalloproteinase, Acurhagin, from *Agkistrodon acutus* Venom. *Thromb Haemost.* 87: 641–50.

Ward, M.J.; Ellsworth, S.A.; Rokyta, D.R. 2018. Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the Hentz striped scorpion (*Centruroides hentzi*; Buthidae) reveal high toxin diversity in a harmless member of a lethal family. *Toxicon.* 142: 14–29.

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.

Weaver, A.K., Liu, X., Sontheimer, H., 2004. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J. Neurosci. Res.* 78, 224-234.

Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C. C., Pettersen, E. F y Ferrin, T. E. 2012. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system. *Journal of Structural Biology*, 179(3), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.09.006>.

Zeng XC, Wang S, Nie Y, Zhang L, Luo X. 2012. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. *Peptides.* 33:44–51.

Zhong J, Zeng X, Zeng X, Nie Y, Zhang L, Wu S y Bao A. 2017. Transcriptomic analysis of the venom glands from the scorpion *Hadogenes troglodytes* revealed unique and extremely high diversity of the venom peptides. *Journal of Proteomics.* 150: 40–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.004>