

**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA GLÁNDULA DE VENENO DE
Tityus asthenes (ESCORPIONIDA: BUTHIDAE) DEL MUNICIPIO DE
BUENAVENTURA, COLOMBIA.**

NATALIA MURIEL TRIANA



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS MÉDICAS
PROGRAMA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2019**

**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA GLÁNDULA DE VENENO DE
Tityus asthenes (ESCORPIONIDA: BUTHIDAE) DEL MUNICIPIO DE
BUENAVENTURA, COLOMBIA.**



**TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

NATALIA MURIEL TRIANA
nataliamurielt@gmail.com

DIRIGIDA POR
RAFAEL SANTIAGO CASTAÑO VALENCIA PhD

CODIRIGIDA POR
ADALBERTO SANCHEZ PhD
LEONARDO FIERRO PhD

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS MÉDICAS
PROGRAMA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2019

Nota de aprobación

El trabajo de grado titulado “ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA GLÁNDULA DE VENENO DE *Tityus asthenes* (ESCORPIONIDA: BUTHIDAE) DEL MUNICIPIO DE BUENAVENTURA, COLOMBIA”, presentado por la estudiante NATALIA MURIEL TRIANA, en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad del Valle, para optar al título de Magister en Ciencias Biomédicas, fue revisado por el jurado y calificado como:

APROBADA

A mis padres William Muriel y Gladys Triana Morales
por su amor, paciencia y apoyo incondicional,
mi hermano William Jr que con su ejemplo
me ha mostrado el camino hacia la superación.

A los tíos que se fueron Edilma, Tista, Martha y Augusto
por enseñarnos a tener una familia unida y amorosa
y a los primos que llegaron Emmanuel y Martín
para enseñarles el camino del amor y la sabiduría.

AGRADECIMIENTOS

Durante mi maestría he tenido la fortuna de contar con personas maravillosas a mi lado y primero que todo quiero agradecer a toda mi familia por guiarme en este camino y apoyarme siempre en mis estudios, los cuales sin importar el tiempo y la distancia me llenan de amor y felicidad.

Mi director Santiago Castaño gracias por su paciencia y guianza en el proyecto y mis codirectores Adalberto Sánchez y Leonado Fierro, quienes lograron contactos y financiación durante el proceso de la Maestría. Además a los grupos de investigación Farmacología Univalle y el grupo Herpetología y Toxinología y a todos los profesores del posgrado.

A mi Universidad del Valle y a la Universidad Georgia Tech, especialmente al laboratorio del profesor King Jordan por acogerme en sus instalaciones donde logré finalizar mi proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema y justificación	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Escorpiones y problemas relacionados con la salud humana	4
2.1.1. <i>Tityus asthenes</i>	5
2.2. Diversidad de los componentes del veneno de escorpión	7
2.3. Toxinas que actúan sobre canales iónicos	9
2.3.1. Toxinas moduladoras de canales de Na ⁺ (NaScTx).....	10
2.3.2. Toxinas moduladoras de canales de K ⁺ (KScTx).	12
2.3.3. Toxinas de otros canales iónicos.	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.3. Transcriptómica de la glándula de veneno de <i>T. asthenes</i>	18
4.3.1. Extracción de RNA.	18
4.3.2. Secuenciación.	19
4.3.3. In silico.	19
4.4. Análisis de la actividad del veneno de <i>T. asthenes</i> en modelo murino.....	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1. Aspectos ecológicos de <i>T. asthenes</i> en el municipio de Buenaventura	22
5.2. Perfil transcriptómico de la glándula productora de veneno	24
5.3. Búsqueda de similitud y anotación de funciones de transcritos de toxinas putativas moduladoras de canales iónicos	27
5.3.1. Toxinas moduladoras de canales de Na ⁺	30
5.3.2. Toxinas moduladoras de canales de K ⁺	39
5.4. Test de Irwin con veneno entero de <i>Tityus asthenes</i> en modelo murino.....	47
6. CONCLUSIONES.....	52
7. LITERATURA CITADA	54
ANEXOS.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escorpión <i>T. asthenes</i> del municipio de Buenaventura, en estado adulto (a la izquierda) y en estado inmaduro (a la derecha).	7
Figura 2. Diagrama de los componentes del veneno de escorpiones. Información recopilada de Abdel-rahman.	8
Figura 3. Proyección in sílico de las toxinas de escorpiones tipo alfa (α) y beta (β) dirigidas a canal de Na^+	10
Figura 4. Estructura secundaria de un canal de Na^+ y sitios diana para toxinas de escorpión.	11
Figura 5. Vista frontal de un canal de K^+ ubicando los sitios diana para toxinas y los diferentes dominios y subunidades.	12
Figura 6. Proyección In sílico de toxinas de escorpión que afectan canales de K^+ presentando diferentes tipos de configuraciones.	13
Figura 7. Especies de escorpiones observadas en los diferentes muestreos de las dos localidades del municipio de Buenaventura, Colombia.	23
Figura 8: Porcentaje y abundancia de los transcritos que corresponden a componentes putativos del veneno de <i>T. asthenes</i>	25
Figura 9: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos que codifica el péptido similar a potenciadores de bradiquinina (BPP) con secuencias homologas reportadas en NCBI.	27
Figura 10: Histograma de la abundancia de cada rango de longitud de transcritos putativos del transcriptoma de la glándula de veneno del escorpión <i>T. asthenes</i> . ..	28
Figura 11. Distribución de las secuencias anotadas como toxinas putativas que modulan canales de Na^+ y K^+ obtenidas del análisis transcriptómico de la glándula de veneno de <i>T. asthenes</i>	29
Figura 12: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los transcritos putativos que codifican α -NaScTx en el transcriptoma de <i>T. asthenes</i> con secuencias homólogas del NCBI. En todos los alineamientos se ha omitido el péptido señal..	32
Figura 13: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los transcritos putativos que codifican β -NaScTx en el transcriptoma de <i>T. asthenes</i> con secuencias homólogas del NCBI.	37
Figura 14: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los transcritos putativos que codifican α -KScTx en el transcriptoma de <i>T. asthenes</i> con secuencias homólogas del NCBI.	43
Figura 15. Estructura espacial del complejo de canales $\text{K}_{v1.2}$ - $\text{K}_{v2.1}$ con CTX, mostrando el residuo de Lys27 dentro del poro del canal y el residuo aromático Tyr36 de la diada funcional.	43
Figura 16. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los transcritos putativos que codifican β -KScTx en el transcriptoma de <i>T. asthenes</i> con secuencias homólogas del NCBI.	46
Figura 17: Test de Irwin mostrando la frecuencia absoluta y el porcentaje de ratones ($n=5$) que presentaron alteraciones fisiológicas o en su comportamiento, luego de la inyección IP de 6,1 mg de veneno/kg ratón del veneno de <i>T. asthenes</i>	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Transcritos de <i>T. asthenes</i> que codifican toxinas putativas tipo alfa que actúan sobre canales de Na ⁺	33
Tabla 2: Transcritos de <i>T. asthenes</i> que codifican toxinas putativas tipo beta que actúan sobre canales de Na ⁺	38
Tabla 3: Toxinas putativas moduladoras de canales de K ⁺ tipo alfa con sus valores de punto isoelectrico (pI).....	41
Tabla 4: Transcritos de <i>T. asthenes</i> que codifican toxinas putativas tipo alfa que actúan sobre canales de potasio.. ..	44
Tabla 5: Transcritos de <i>T. asthenes</i> que codifican toxinas putativas tipo beta que actúan sobre canales de potasio.. ..	46
Tabla 6: Cambios fisiológicos y comportamentales observados en porcentajes de ratones (n=5) durante el test de Irwin.....	49

RESUMEN

El escorpión *Tityus asthenes*, es la especie más común que puede afectar la salud humana en la Región del Pacífico Colombiano. Para conocer el transcriptoma de la glándula de veneno se construyó una librería de cDNA, el cual presentó un total de 19.359.053 reads, de los cuales se ensamblaron y se contaron 44.047 transcriptos. En el proceso de identificación, conteo y anotación funcional, se revelaron 218 transcriptos putativos del escorpión *T. asthenes*, homólogos a secuencias de especies del género *Tityus*. Estos transcriptos se organizaron en nueve diferentes categorías, donde el transcripto con mayor conteo fue un potenciador de bradiquinina (730.742 reads) y la categoría más abundante fue metaloproteinasas (37%). Las toxinas moduladoras de canales iónicos estuvieron representadas por sodiotoxinas (15%) y potasiotoxinas (10%), lo que se corresponde con lo reportado para especies de la familia Buthidae que afectan la salud de los humanos. Se realizó test de Irwin en ratones expuestos a la DL50 reportada por Gómez y colaboradores (2010) para la misma especie en la localidad de Mutatá-Antioquia (6,1 mg de veneno/kg ratón). Se observaron efectos en doce variables relacionadas al sistema autónomo, periférico y sistema nervioso central, sin ocurrir muerte en ninguno de los animales. Esto confirma que las neurotoxinas encontradas en el transcriptoma están siendo traducidas en péptidos en el veneno entero del escorpión, por lo cual se propone en el futuro adelantar estudios de proteómica, que permitan detallar la estructura de estos péptidos y sus actividades biológicas potenciales.

PALABRAS CLAVE: *Tityus asthenes*, transcriptoma, secuencias, test de Irwin, sistema nervioso y neurotoxinas.

ABSTRACT

The scorpion *Tityus asthenes*, is the most common species that can affect human health in the Colombian Pacific Region. To know the transcriptome of the venom gland, a cDNA library was constructed, which presented a total of 19,359,053 reads, of which 44,047 transcripts were assembled and counted. 218 putative transcripts of the scorpion *T. asthenes*, homologous to sequences of species of the genus *Tityus*, were identified by functional annotation. These transcripts were organized into nine different categories, where the transcript with the highest count was a bradykinin enhancer (730,742 reads) and the most abundant category was for metalloproteinases (37%). The ion channel modulating toxins were represented by sodium-toxins (15%) and potassium-toxins (10%), which corresponds to previous reports for species of the Buthidae family that affect the human health. The Irwin test was performed in mice exposed to the LD₅₀ reported by Gómez et al. (2010) for the same species in the town of Mutatá-Antioquia (6.1 mg of venom / kg mouse). Effects were observed in twelve variables related to the autonomic, peripheral and central nervous system, without death occurring in any of the animals. This confirms that the neurotoxins found in the transcriptome are being translated into peptides in the entire venom of the scorpion, so it is proposed to advance proteomics studies in the future, which will allow to detail the structure of these peptides and their potential biological activities.

KEYWORDS: *Tityus asthenes*, transcriptome, sequences, Irwin test, nervous system and neurotoxins.

1. INTRODUCCIÓN

Los escorpiones, son artrópodos quelicerados pertenecientes a la Clase Arácnida y del Orden Scorpionida (Flórez 2001), estos son quizás los animales terrestres más antiguos de la fauna actual, sin alteraciones significativas en su morfología por aproximadamente 450 millones de años, desde la era silúrica (Gómez et al. 2010). La importancia médica y biológica de estos arácnidos ha hecho que a pesar de ser un grupo relativamente pequeño, se le haya dedicado gran atención desde el punto de vista toxicológico, epidemiológico y más recientemente a los mecanismos moleculares relacionados con los componentes de su veneno que inducen su acción patológica.

En los últimos años, el estudio de los venenos de los escorpiones se ha llevado a cabo mediante técnicas de proteómica y transcriptómica (Schwartz et al. 2007; Alvarenga et al. 2012; Guerrero-Vargas et al. 2012; Cao et al. 2013; U. Oliveira et al. 2015; Abdel-rahman, Quintero-Herna, and Possani 2016; Santibáñez-lópez et al. 2016). La Secuenciación de Nueva Generación (NGS), y su derivación para transcritos: RNA-Seq, se ha convertido en una de las principales tecnologías para el estudio del transcriptoma de la glándula de veneno de los escorpiones, debido a que es una metodología de bajo costo con la cual se pueden identificar millones de secuencias en un corto periodo de tiempo (Nagalakshmi, Waern, and Snyder 2010; Wang, Gerstein, and Snyder 2009; Raiol et al. 2014; Conesa et al. 2016; Luna-ramírez et al. 2015). Se estima que existen alrededor de 200,000 péptidos en la glándula de veneno de 2,000 especies de escorpiones; sin embargo, menos del 3% han sido identificados hasta el momento (Zhong et al. 2017).

El veneno de escorpión es una mezcla compleja de diversos compuestos entre los que se destacan proteínas y péptidos que juegan un papel importante en la actividad tóxica proveyendo a estos animales de herramientas para paralizar o matar a su presa, y defenderse de otros depredadores (Possani and Rodríguez de la Vega 2006). Los péptidos se clasifican en dos grupos: con puentes disulfuro (DBPs) y sin puentes disulfuro (NDBPs). Sobre este último grupo hemos profundizado en nuestra investigación por tener actividad moduladora sobre canales iónicos de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Cl^- (Zhong et al. 2017). En el veneno se encuentran péptidos de bajo peso molecular (3–8 kDa) que actúan alterando los mecanismos de activación de los canales iónicos, así como bloqueando sus filtros de selectividad. Su acción está dirigida a alterar la excitabilidad nerviosa y muscular de presas y depredadores potenciales, alterando la actividad de estos canales iónicos que son de suma importancia en la excitabilidad y el movimiento de los animales (Possani and Rodríguez de la Vega 2006).

En Colombia los estudios de escorpionismo (accidente escorpiónico) y su fisiopatología son muy incipientes, presentándose un índice alto de subreporte. Se debe tener en cuenta además, que los casos más graves se presentan con pacientes pediátricos o geriátricos (Gómez and Otero 2007). Sin embargo, con la poca evidencia reunida se ha reportado que *T. asthenes* es posiblemente el responsable de los casos más graves de escorpionismo en la Región del Pacífico del Valle del Cauca. El accidente escorpiónico producido por esta especie ha sido reportada para una población de Mutatá-Antioquia (Gómez et al. 2010), sin embargo es sabido que el veneno varía en su composición de género a género y de especie en especie. Además, pueden diferir en potencia probablemente debido a cambios en la proporción de toxinas asociadas a genética o variaciones medioambientales como dieta o clima (Cordeiro et al. 2015; Roodt et al. 2010), por lo cual no es prudente pensar que especies del mismo taxón van a presentar las mismas toxinas o un grado de afección similar.

El estudio de los RNAs ha sido la clave intermedia entre DNA y el proteoma, para la identificación de transcriptos y la cuantificación de la expresión de genes. Este es actualmente el primer paso para el estudio de los componentes del veneno de los escorpiones (Wang et al. 2009; Nagalakshmi et al. 2010, Conesa et al. 2016). Estos datos provenientes de diferentes especies representan hoy día una fuente importante de información en toxicología y medicina (Catterall et al. 2005; Karbat et al. 2007; Wang et al. 2009; Nagalakshmi et al. 2010; Conesa et al. 2016). Considerando lo anterior, en este estudio nos trazamos como objetivo secuenciar y analizar el transcriptoma de la glándula de veneno del escorpión *Tityus asthenes* (Pocock, 1893) mediante la metodología “RNA-seq” para conocer el perfil de sus componentes y profundizar en los transcriptos que codifican para toxinas putativas con actividad moduladora sobre canales iónicos.

1.1. Planteamiento del problema y justificación

El escorpionismo es considerado un problema que se presenta principalmente en los países tropicales. Generalmente no se presentan víctimas mortales, pese a que si se ha reportado la muerte de niños y ancianos. No hay registros que permitan definir con certeza la magnitud del escorpionismo para Colombia, ya que no existe un programa de vigilancia epidemiológica para el accidente escorpiónico de obligatorio reporte y las entidades prestadoras del servicio de salud no presentan protocolos estandarizados de atención, prevención y registro obligatorio ante las picaduras de escorpiones.

Sabemos que la especie Buthidae es la familia de escorpiones a la que pertenecen la mayoría de especies peligrosas para los humanos, entre ellas las del género *Tityus*, las cuales presentan una elevada diversidad de neurotoxinas moduladoras de canales iónicos los cuales son los responsables de los síntomas neurales del envenenamiento. Ampliar el conocimiento de las toxinas de escorpiones para Colombia es una necesidad en salud pública y en el ámbito mundial es una fuente rica de conocimiento para futuros estudios que se direccionen en la solución de problemas en el campo de la Biomedicina. En esa dirección, para este estudio se realizó un análisis transcriptómico de la glándula productora de veneno de la especie *Tityus asthenes* encontrada en Buenaventura-Valle del Cauca, con el fin de conocer y comparar sus componentes con otros escorpiones del género *Tityus* peligrosos para los humanos, enfocándonos principalmente en secuencias de toxinas putativas que son activas sobre canales iónicos.

Además, se valoró mediante el test de Irwin en biomodelo murino la dosis letal media reportada para una población de la misma especie ubicada en Mutata-Antioquia, con el objeto de identificar efectos moduladores sobre el sistema nervioso. Conocer la composición del veneno de esta especie permite entender la fisiopatología asociada a los efectos de sus toxinas y así, poder realizar un manejo asertivo de la terapéutica del escorpionismo, además de permitir desarrollar en el futuro terapias con suero antiveneno específicas para esta especie.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Escorpiones y problemas relacionados con la salud humana

Actualmente en el mundo se conocen 18 familias de escorpiones y alrededor de 2140 especies (Borges & Graham 2016), de las cuales solo entre 25 y 30 son peligrosas para los humanos (Chippaux and Goyffon 2008; Chippaux 2012, Guerrero-vargas et al. 2015). Todas las especies con relevancia médica pertenecen a la familia Buthidae a excepción de la especie Indo-Arabiga *Hemiscorpius lepturus* (Hemiscorpiidae) (Chowell et al. 2006). La familia Buthidae es la que presenta mayor distribución geográfica y aunque el mayor número de géneros de bítidos se encuentra en el Viejo Mundo (64 géneros), en América se encuentra el género más diverso, *Tityus* con alrededor de 170 especies con distribución exclusivamente neotropical (Flórez 2001; Borges et al. 2010; Borges et al. 2015).

El estimado global de la incidencia de escorpionismo es cerca de 1.5 millones de envenenamientos los cuales envuelven 3000 muertes anuales (J. Chippaux and Goyffon 2008; J. P. Chippaux 2012; Cordeiro et al. 2015). La mayor intensidad ocurre en algunos países como: India con 1000 casos por año, Brasil con 21.500 casos, Túnez con 40.000, Turquía con 80.000 y México con 200.000 casos reportados al año (Chowell et al. 2006; Gómez et al. 2010; Izquierdo and Rodríguez 2012).

En Colombia se reporta la presencia de cinco familias de escorpiones (Buthidae, Chactidae, Diplocentridae, Hemiscorpidae e Ischnuridae), con un total de 14 géneros y 80 especies (Guerrero-vargas et al. 2015). Guerrero et al. (2015) reportan que entre 2006 y 2010 ocurrieron 1783 accidentes con animales venenosos en Colombia, de los cuales un 25% fue a causa de picaduras de escorpiones. Los departamentos más afectados por escorpionismo, algunos incluyendo fatalidades en niños son Antioquia, Valle del Cauca, Tolima y Cundinamarca (Charry 2006; Gómez et al. 2010).

No hay registros que permitan definir con certeza la magnitud del escorpionismo en el país debido a que no existe un programa de vigilancia epidemiológico para el accidente escorpiónico de obligatorio reporte como si es el caso para accidente ofídico, siendo los primeros estudios realizados sobre los accidentes reportados con la especie *Tityus pachyurus* (Otero et al. 2004; J. Chippaux and Goyffon 2008; Izquierdo and Rodríguez 2012). Otras especies que incrementan la incidencia de escorpionismo en el país son: *Centruroides margaritatus* (Marinkelle and Stahnke 1965), *Tityus asthenes* (Gómez et al. 2010), *T. fuhrmanni* (Gómez et al. 2002) y además *C. edwardsii*,

T. forcípula, *T. n. sp. aff. metuendus* y *T. columbianus* (Guerrero-Vargas et al. 2015).

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha adelantado estudios de las especies de escorpiones presentes en el Valle del Cauca y de la incidencia de escorpionismo en el departamento, donde se evidencia la necesidad de generar protocolos estandarizados de manejo y atención de afecciones ante picaduras de escorpiones debido a que existen falencias graves en el conocimiento de los mecanismos moleculares y fisiológicos de esta picadura, lo que genera incertidumbre del impacto social y la magnitud real de incidencia de escorpionismo para el departamento (Datos en proceso de publicación).

2.1.1. *Tityus asthenes*.

La especie *T. asthenes* fue descrita inicialmente por Pocock (1893), pertenece al subgénero *Atreus* Gervais, 1843 y a la familia Buthidae (Pocock 1893). Se caracteriza porque los individuos inmaduros son de color amarillento jaspeado y los individuos adultos de color negruzco (figura 1), con subacúleo y esternón triangular, presenta granulaciones espinoides en los segmentos metasómicos II a IV (12-15) y alcanzan tamaños en diferente regiones entre 60 - 150 mm (Gómez et al. 2010; A Borges et al. 2012). *T. asthenes* parece tener una distribución restringida a altitudes bajas en el ecosistema de bosque lluvioso tropical, desde el norte de Perú hasta Costa Rica en América Central, es la especie más común de la Región del Pacífico Colombiano (Lourenco and Florez 1989; Brito and Borges 2015; Guerrero-Vargas et al. 2015). Dentro de esta área, se han reportado casos de escorpionismo en Panamá (A Borges, Miranda, and Pascale 2012), Colombia (Otero et al. 2004; Gómez et al. 2010; Guerrero-Vargas et al. 2015) y Ecuador (Brilo and Borges 2015; A Borges et al. 2015).

En Colombia el primer registro de escorpionismo por *T. asthenes* fue reportado en 1998 a niños en el departamento de Antioquia, un niño de diez años de la localidad de Tarazá, presentó pancreatitis hemorrágica y formación de pseudoquistes; en otro niño de cuatro años en Chigorodó, se reportaron alteraciones cardiovasculares, edema pulmonar y muerte; y en una niña de 3 años, se presentó pancreatitis edematosa aguda, la cual evolucionó con éxito después de manejo con terapia antiveneno (Otero et al. 1998). Años después se reportaron siete casos de escorpionismo por esta especie en las localidades de Necoclí, Mutatá, Caucasia, Zaragoza, Segovia y San Roque, donde un niño de tres años de edad de la localidad de Segovia, presentó vómitos persistentes (más de 20 episodios), dolor abdominal, taquipnea, hipoxemia, hiperamilasemia (369 UI/l) y pancreatitis edematosa aguda, la cual se diagnosticó mediante tomografía computarizada (Otero et al. 2004).

En el mismo departamento de Colombia, en la localidad de Mutatá, se presentaron doce casos en el hospital por picaduras del escorpión *T. asthenes* durante un periodo de 18 meses (septiembre de 2005 a febrero de 2007), de éstos, seis eran niños menores de 15 años. Entre las manifestaciones clínicas locales más frecuentes se presentó dolor, parestesias y sudoración local y en menor proporción edema y eritema. Los signos sistémicos de toxicidad más frecuentes fueron taquipnea y vómito y en menor proporción taquicardia, sialorrea, dolor abdominal y sudoración generalizada, no se presentaron muertes ni secuelas (Gómez et al. 2010). Por el contrario en Ecuador en un reporte de casos, en la localidad de Flavio Alfaro, en la provincia de Manabí, se registró la muerte de un niño de 1.9 años, el cual presentó inicialmente dolor intenso, eritema local, sialorrea intensa, seguidos de vómito persistente (10 episodios). Dos horas después se presentó palidez, sudoración general y broncoespasmo bilateral, después de siete horas hiperglucemia sostenida y leucocitosis, finalmente entre diez y doce horas de la picadura se presentó hipoxemia, insuficiencia cardiorrespiratoria y la muerte; no hubo evidencia de laboratorio de daño pancreático o de otros tejidos (Borges et al. 2015).

En la caracterización del veneno, se ha encontrado que la población de *T. asthenes* de Costa Rica presenta un DL50 en ratones igual a 4.14 mg/kg (A Borges et al. 2012), mientras que la población de Mutatá-Antioquia reportó un DL50 igual a 6,1 mg de veneno/kg en ratones (Gómez et al. 2010), sin embargo en Costa Rica no hay documentación de casos de escorpionismo por *T. asthenes* para el país, se debe tener en cuenta que la población de *T. asthenes* en Panamá y Costa Rica es mucho menor que la población de la especie para Colombia. Adicionalmente se han realizado pruebas con antivenenos donde una población de Panamá presentó poca reacción ante los anti-*Tityus serrulatus* de Brasil e igualmente con el anti-*Tityus discrepans* de Venezuela (A Borges et al. 2012), mientras que la población de Antioquia, Colombia presentó reactividad inmunológica por Western blot de los antivenenos del Instituto Bioclón, México (Alacramyn®) y del Instituto Butantan, Brasil (Soro antiaracnídico®) (Gómez et al. 2010).

Gómez y Otero en el 2007 reportaron que para el país habría un sub-registro ante el escorpionismo de entre 70-90% y desde ese entonces hasta la actualidad en Colombia no existe un programa de vigilancia epidemiológica para el accidente escorpiónico y se conocen pocos estudios de escorpiones y los que existen son principalmente con enfoque clínico-epidemiológico.



Figura 1. Escorpión *T. asthenes* del municipio de Buenaventura, en estado adulto (a la izquierda) y en estado inmaduro (a la derecha).

2.2. Diversidad de los componentes del veneno de escorpión

Las tecnologías OMICAS como la proteómica y la transcriptómica han ampliado el conocimiento de la estructura y diversidad molecular de los venenos de los animales venenosos, la primera usando veneno crudo para purificación de componentes activos y la segunda formando librerías de cDNA a partir de mRNA de las glándulas productoras de veneno. (Schwartz et al. 2007; Alvarenga et al. 2012; Guerrero-Vargas et al. 2012; Oliveira et al. 2015; Kuzmenkov, Grishin, and Vassilevski 2015; Abdel-rahman, Quintero-Herna, and Possani 2016; Cid-uribe et al. 2018;). El estudio de la composición del veneno es un paso fundamental para adquirir una mejor comprensión de la diversidad molecular y la evolución del veneno (Rodríguez de la Vega and Possani 2005; Ma et al. 2010; U. Oliveira et al. 2015; Luna-ramírez et al. 2015) así como para desarrollar posibles agentes terapéuticos (Catterall et al. 2005; Karbat et al. 2007; Ortiz et al. 2014; Deuis et al. 2017; Housley et al. 2017).

El aparato venenoso del escorpión consiste en una vesícula que contiene un par de glándulas responsables de la producción y almacenamiento del veneno, conectadas al telson el cual está localizado en el último segmento del metasoma del animal (Cordeiro et al. 2015). El veneno de los escorpiones es una secreción apocrina de diferentes componentes (entre 100–700) no proteicos y proteicos, el cual está conformado por proteínas y péptidos (Rodríguez de la Vega and Possani 2005; Ortiz et al. 2015b; Luna-ramírez et al. 2015; Abdel-rahman, Quintero-Herna, and Possani 2016). Los péptidos han captado especial interés y han sido clasificados en dos grupos: péptidos con puentes disulfuro (DBPs) y péptidos sin puentes disulfuro (NDBPs) (Figura 2).

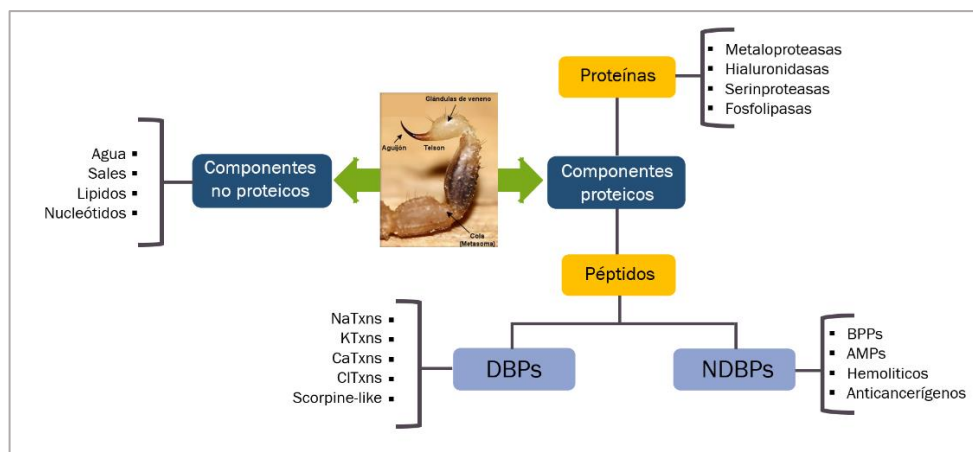


Figura 2. Diagrama de los componentes del veneno de escorpiones. Información recopilada de Abdel-rahman, Quintero-Herna, and Possani 2016.

Los DBPs contienen entre 28-120 residuos de aminoácidos y se caracterizan por actuar sobre canales iónicos de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- (Zhong et al. 2017). Algunos de estos péptidos interactúan específicamente con canales iónicos de mamíferos, mientras que otros actúan sobre canales de insectos o crustáceos. Su actividad aumenta la excitabilidad celular y causa la liberación de neurotransmisores (catecolaminas y acetilcolina) en las terminaciones postganglionares de las ramas simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo (SNA). Se reportan efectos locales y sistémicos (Gómez et al. 2002). Por su parte, los NDBPs son más cortos (10-50 aminoácidos) y exhiben diferentes funciones biológicas entre las que se encuentran actividad antimicrobiana (AMPs), citolítica, hemolítica, potenciadora de bradiquinina (BPP) e inmunomoduladora, entre otras (Almaaytah and Albalas 2014).

La mayoría de estos estudios se han enfocado principalmente en especies de la familia Buthidae, el total de péptidos y proteínas reportados es de 969 en las bases de datos y dicha familia presenta al alrededor del 73% de estos reportes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estudios realizados con otras familias de escorpiones han demostrado que estas también son una fuente rica de toxinas y péptidos que exhiben múltiples actividades biológicas con potenciales aplicaciones biotecnológicas. Se han realizado análisis transcriptómicos además, en miembros de las familias Caraboctonidae (Schwartz et al. 2007), Hemiscorpiidae (Kazemi-Lomedasht et al. 2017), Chaerilidae (He et al. 2013), Euscorpiidae (Santibáñez-López et al. 2017), Scorpionidae (Diego-García et al. 2012), Superstitioniidae (Romero-Gutiérrez et al. 2018; Santibáñez-López et al. 2016), Urodacidae (Luna-ramírez et al. 2013, 2015) y Vaejovidae (Cid-uribe et al. 2018; Romero-Gutiérrez et al. 2018).

En Colombia no existe ningún estudio transcriptómico de la glándula de veneno de escorpiones, solo la especie *T. pachyurus* tiene reportes de cinco secuencias de toxinas putativas de canales sodio (Na^+) realizado en la universidad de Brasilia (Guerrero-Vargas et al. 2012). Consideramos importante adelantar estas investigaciones en el país para conocer la gran diversidad de componentes proteínicos y peptídicos de los venenos de los escorpiones que se encuentran en Colombia, importante para el desarrollo científico del país. En otros países latinoamericanos como Brasil, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Panamá, Cuba han realizados investigaciones a gran escala en proteómica y transcriptómica de especies de escorpiones para identificar secuencias y tan solo del género *Tityus* hay estudios reportados en el NCBI de treinta y cinco especies diferentes.

2.3. Toxinas que actúan sobre canales iónicos

Históricamente los DBPs han sido los componentes más estudiados debido a su relevancia clínica (Carbone et al. 1982; Doyle 1998; Rodríguez de la Vega and Possani 2005; Quintero-Hernández et al. 2013; Housley et al. 2017). Así mismo, por su alta especificidad han sido empleados en el estudio de la estructura y función de los canales iónicos y en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades asociadas a estos (Catterall et al. 2005; Karbat et al. 2007; Ortiz et al. 2015a). Estas toxinas dirigidas a canales son más abundantes en escorpiones de la familia Buthidae, sin embargo se han encontrado en menor proporción en familias no-Buthidae (Abdel-rahman, Quintero-Herna, and Possani 2016; Cid-uribe et al. 2018).

Los péptidos con actividad aparentemente específica para canales iónicos tienen efecto sobre las superfamilias de canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v), los canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje (K_v), los canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje (Ca_v) y los canales de cloruro (Housley et al. 2017). Estos péptidos de bajo peso molecular (3–8 kDa) también conocidos como neurotoxinas, actúan alterando los mecanismos de apertura del canal o bloqueando los filtros de selectividad (Rodríguez de la Vega and Possani 2005; Possani and Rodríguez de la Vega 2006). En este estudio se proporciona la primera aproximación de los componentes putativos del veneno de *T. asthenes*, presumiendo que la alta especialización de las glándulas que producen el veneno, debe producir una alta expresión de genes correspondientes a transcritos de las toxinas.

2.3.1. Toxinas moduladoras de canales de Na⁺ (NaScTx).

Las primeras toxinas de escorpiones que fueron descritas pertenecen a las sodiotoxinas (NaScTxs) (Gomez and Diniz 1966). Estas han evolucionado numerosas veces debido a la importancia de los canales de Na⁺ en la función normal del sistema nervioso central y periférico, así como en músculos cardíacos, esqueléticos y musculo liso, estos canales son los responsables de la iniciación o fase despolarizante y propagación de potenciales de acción en estas células excitables y cualquier alteración de su función por toxinas o fármacos modifica la generación del potencial de acción (Olamendi-portugal et al. 2002; Rodríguez de la Vega and Possani 2005; Deuis et al. 2017; Banerjee et al. 2013). Los activadores de canales de Nav han sido aislados además en organismos como: arañas, avispas, serpientes, conos y anémonas de mar, también son producidas por plantas, bacterias y algas (Deuis et al. 2017).

Estas sodiotoxinas se consideran de cadena larga de aminoácidos (53-78 de longitud) en comparación con las potasiotoxinas (23-64 aminoácidos) (Diego-García et al. 2007; Cordeiro et al. 2015). Estas presentan una estructura tridimensional conservada que comprende una α -hélice y dos o tres laminas β estabilizadas por entre dos a cuatro puentes disulfuro. Esta topología estructural es conocida como $\beta\alpha\beta\beta$ (Rodríguez de la Vega and Possani 2005). Diferentes clasificaciones han sido propuestas para las sodiotoxinas, la más usada está basada en su papel fisiológico como moduladores de canales de Na⁺, por lo cual se subdividen en α -NaScTx y β - NaScTx como se ilustra en la figura 3.

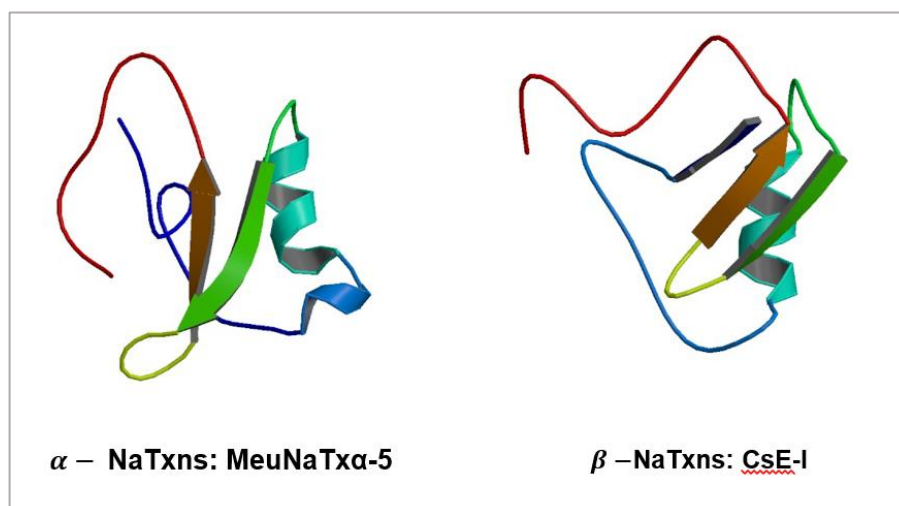


Figura 3. Proyección *in silico* de las toxinas de escorpiones tipo alfa (α) y beta (β) dirigidas a canal de Na⁺. Los modelos se generaron usando el programa MODELLER 9.1 en el software USFC Chimera.

Como consecuencia de la actividad de ambas sodiotoxinas se produciría un aumento de la excitabilidad por la modificación de los Na_v en los tejidos, posiblemente produciendo contracciones musculares espontáneas o incremento en la generación de señales nociceptivas aun en estado de reposo. Sin embargo hay que tener en cuenta que el efecto es relativo a cómo llegan estos péptidos a el tejido diana (Sabatier and De Waard 2013). El efecto de las toxinas también dependería de la afinidad de la toxina sobre cada tipo de canal, en insectos solo se expresa un tipo de Na_v (DmNa_v) con una variante por splicing alternativo, pero en mamíferos hay nueve tipos de Na_v (1.1 a 1.9) expresadas diferencialmente en tejidos excitables y con pequeñas variaciones en sus secuencias (figura 4) (Quintero-Hernández et al. 2013).

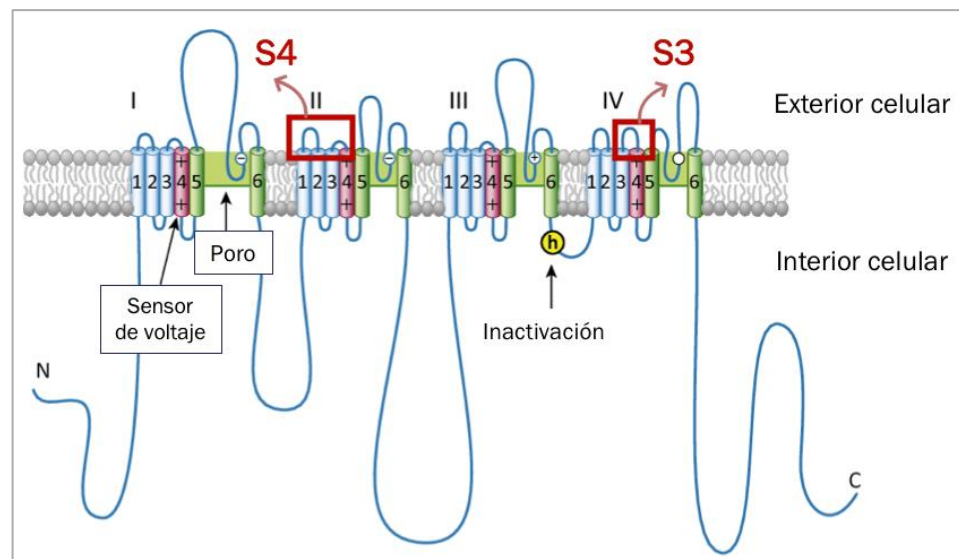


Figura 4. Estructura secundaria de un canal de Na^+ y sitios diana para toxinas de escorpión. Tomado de: Catterall and Zheng 2015.

Las α -Neurotoxinas (α -NaScTx) interactúan con el sitio 3 del receptor del canal, localizado en el bucle extracelular de S3-S4 del dominio IV (figura 4), estas modulan la cinética del canal por estar cerca a los sensores de voltaje, retardando el mecanismo de inactivación y prolongando la fase de repolarización del potencial de acción de membrana (Cordeiro et al. 2015). Las α -NaScTx pueden ser subdivididas en tres grupos principales: 1) α -toxinas clásicas que son altamente activas en Na_v de mamíferos y pobremente activas contra insectos; 2) α -NaScTXs contra insectos, que son altamente activas solo en insectos; y 3) α -like toxinas activadas en ambos, Na_v de insectos y mamíferos (Batista et al. 2002; Quintero-Hernández et al. 2013).

Por su parte las β -NaScTx interactúan en el receptor del sitio 4 en el bucle extracelular que conecta los segmentos transmembrana S3-S4 y S1-S2 del dominio II (figura 4), alterando la dependencia de voltaje hacia potenciales más negativos, lo que causa un incremento de potenciales espontáneos y

repetitivos (Cordeiro et al. 2015). Estas se subdividen en cuatro grupos de acuerdo a su selectividad farmacológica en canales Na_v : 1) β_m activos en canales Na_v de mamíferos; 2) β_i activos selectivamente en canales Na_v de insectos; 3) β -like los que no presentan preferencia por Na_v de insectos o mamíferos; y 4) β_α para aquellos que presentan una estructura de β -toxins pero con efectos funcionales similares a α -Neurotoxinas (Bosmans and Tytgat 2007).

2.3.2. Toxinas moduladoras de canales de K^+ (KScTx).

Los canales de potasio (K^+) son una superfamilia de proteínas integrales de membrana que median el transporte selectivo de iones K^+ a través de la membrana celular (figura 5). Se han encontrado en todos los organismos vivos, desde bacterias hasta animales multicelulares superiores, incluidos los humanos (Banerjee et al. 2013). Presentan dos funciones principales que son contribuir a mantener el potencial de membrana en reposo y aumentar la permeabilidad a K^+ durante la fase de repolarización del potencial de acción en células eléctricamente excitables. Participan en numerosos procesos fisiológicos, tales como el transporte de iones, la transmisión de señales nerviosas, la comunicación, la proliferación celular, la regulación neurohumoral y la respuesta inmune (A. I. Kuzmenkov et al. 2015). Una fuente rica de ligandos del canal K^+ es el veneno de diferentes animales: serpientes, anémonas de mar, caracoles cono, abejas, arañas y escorpiones (Sabatier and De Waard 2013).

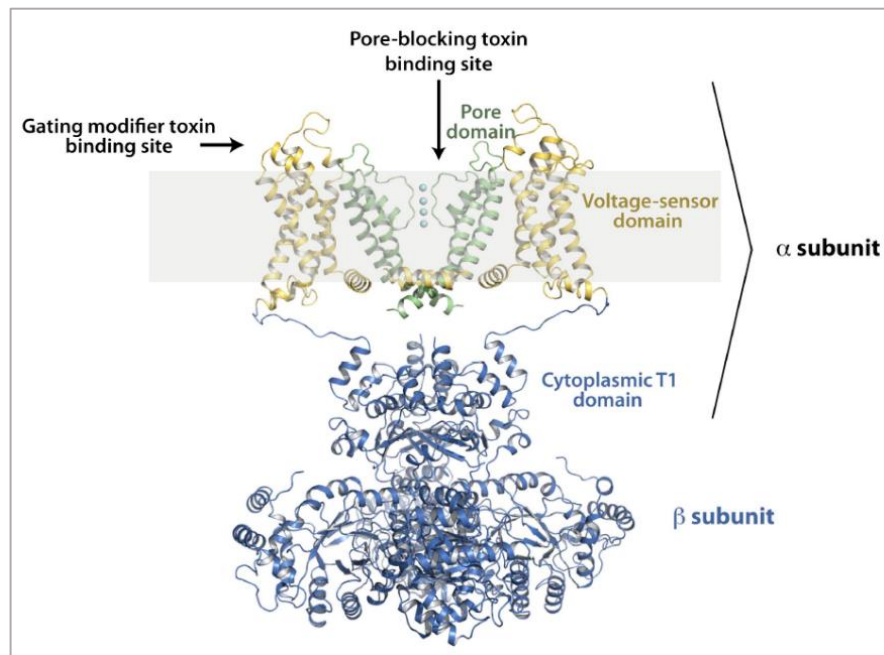


Figura 5. Vista frontal de un canal de K^+ ubicando los sitios diana para toxinas y los diferentes dominios y subunidades. Tomado de: Banerjee et al. 2013.

En análisis transcriptómicos previos de glándulas de escorpiones se ha evidenciado que las toxinas que afectan los canales de K^+ (KScTxns) son componentes abundantes tanto en los venenos de especies Buthidae como no Buthidae (Cid-uribe et al. 2018). Estos péptidos tienen longitudes entre 23 y 64 aminoácidos y actúan bloqueando la conductividad iónica por oclusión física del poro sin afectar la cinética del canal (figura 6) (Banerjee et al. 2013; Kuzmenkov et al. 2015; García 2017). Presentan principalmente dos motivos estructurales como se muestra en la figura 6: una hélice α conectada a una doble o triple hoja β antiparalela estabilizada por cisteínas ($CS_{\alpha/\beta}$) y dos α -hélices cortas conectadas por un giro β ($CS_{\alpha/\alpha}$) (Doyle 1998; Zhu et al. 2010; Quintero-Hernández et al. 2013; Housley et al. 2017).

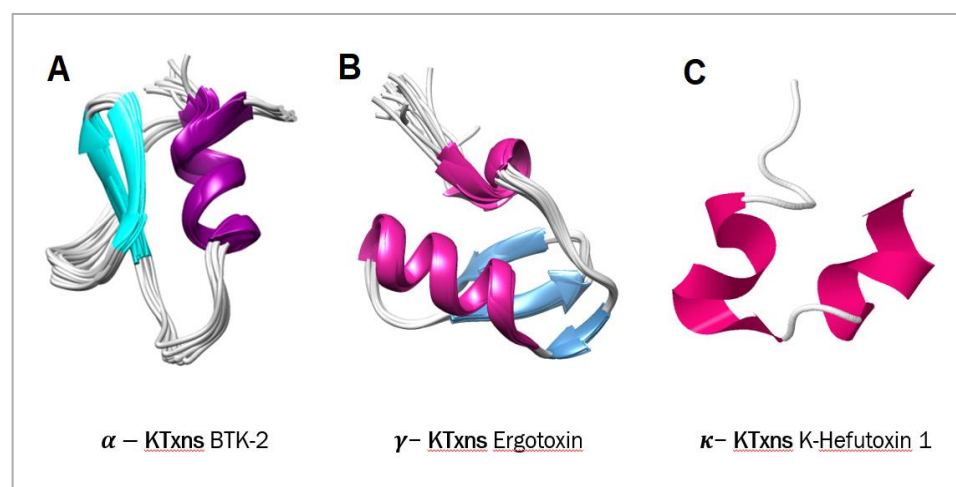


Figura 6. Proyección In silico de toxinas de escorpión que afectan canales de K^+ presentando diferentes tipos de configuraciones: A) Configuración $CS_{\alpha/\beta}$ con doble hoja beta, B) Configuración $CS_{\alpha/\beta}$ con triple hoja beta antiparalela y C) configuración $CS_{\alpha/\alpha}$. Los modelos se generaron usando el programa MODELLER 9.1 en el software USFC Chimera.

En función de su secuencia de aminoácidos y patrones de cisteínas, las KScTx inicialmente fueron clasificadas en tres familias: a) α -KScTx, que tienen entre 23-42 aminoácidos y constituyen el grupo más abundante y estudiado hasta la fecha y al igual que las β -KScTx presentan una configuración $CS_{\alpha/\beta}$; b) β -KScTx, contienen péptidos con 45-75 aminoácidos entrecruzados por tres puentes disulfuro y c) γ -KScTxns, que afectan a un grupo particular de canales de K^+ dependientes de voltaje conocidos como ERG (Almaaytah and Albalas 2014; Kuzmenkov, Grishin, and Vassilevski 2015). Sin embargo, estudios recientes han propuesto tres familias adicionales: κ , δ y λ (Zhu et al. 2010; Santibáñez-López et al. 2017).

El bloqueo de los canales de K^+ tiende a producir una despolarización sostenida del potencial de membrana celular, lo cual puede producir

potenciales de acción espontáneos, contracción muscular y activación de células nociceptivas (Banerjee et al. 2013). Inmediatamente después, esta despolarización sostenida puede producir acumulación de inactivación en canales Na_v llevando a la no generación de PA, parálisis flácida en sistemas excitables musculares de pequeño tamaño y anestesia localizada entre otros efectos (Rodríguez de la Vega and Possani 2005). Hay que tener en cuenta que en mamíferos existen más de 40 secuencias de canales de K^+ dependientes de voltaje (<https://iuphar.org/>) y están distribuidos en tejidos eléctricamente excitables y no excitables participando en un gran número de tareas fisiológicas celulares.

2.3.3. Toxinas de otros canales iónicos.

Los canales de Ca^{2+} están involucrados en la transmisión sináptica y la contracción muscular. Estos son clasificados en varias subfamilias: canales dependientes de voltaje, canales independientes de voltaje y canales activados por ligandos. Las toxinas más estudiadas son las que modulan los receptores de ryanodina (RyRs) y las que modulan los canales dependientes de voltaje tipo T (Mosbah et al. 2000; Olamendi-portugal et al. 2002; Rodríguez de la Vega and Possani 2005; Quintero-Hernández et al. 2013).

Las toxinas dirigidas a canales de Ca^{2+} han recibido el nombre de calcinas. Estas toxinas bloquearían la actividad contráctil del músculo y la señalización intracelular mediada por Ca^{2+} como segundo mensajero (Mosbah et al. 2000). Estas calciotoxinas a nivel estructural se caracterizan por tener tres hojas beta antiparalelas estabilizadas por tres puentes disulfuro que forman parte de un motivo conocido como nudo inhibidor de cisteínas (ICK), en lugar del motivo $CS\alpha/\beta$ exhibido por la mayoría de toxinas de escorpiones que interactúan con canales iónicos (Olamendi-portugal et al. 2002; De Waard and Sabatier 2006; Santibáñez-López et al. 2017; Cid-uribe et al. 2018).

La primer clorotoxina fue aislada en 1993 del veneno del escorpión Israelí *Leiurus quinquestriatus*, es un péptido pequeño de 36 aminoácidos con cuatro puentes disulfuros (DeBin et al. 1993). Inicialmente fue usada como herramienta farmacológica para caracterizar canales de cloruro y pronto se descubrió que su blanco eran células cancerígenas (Dardevet et al. 2015). Por lo que ha sido importante en el desarrollo de diagnóstico y tratamiento de glioma, así como en el estudio de otras líneas celulares de cáncer como melanoma, carcinoma, neuroblastoma, meduloblastoma, sarcoma de Ewing y el feocromocitoma (Sabatier and De Waard 2013). Desde entonces, se han propuesto alrededor de 30 péptidos con posible acción de clorotoxina, sin embargo, solo unos pocos de estos péptidos han sido caracterizados bioquímicamente (Diego-García et al. 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Secuenciar y analizar el transcriptoma de la glándula productora de veneno del escorpión *Tityus asthenes*, describir el perfil general de sus componentes y analizar los transcriptos que codifican toxinas putativas de canales.

3.2. Objetivos específicos

Analizar el transcriptoma de la glándula productora de veneno del escorpión *T. asthenes* del municipio de Buenaventura para conocer sus componentes putativos.

Identificar y analizar los transcriptos presentes en la glándula productora de veneno de *T. asthenes* del municipio de Buenaventura que codifiquen para toxinas putativas moduladoras de la actividad de canales iónicos.

Registrar el comportamiento y los cambios fisiopatológicos de un modelo murino expuesto al veneno entero del escorpión *T. asthenes* del municipio de Buenaventura para relacionarlo con lo obtenido en el transcriptoma de la glándula de veneno.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Disposiciones Legales vigentes

Para el desarrollo de este trabajo se dio inicio al proceso de consulta previa para colecta con el Ministerio del Interior, permisos de colecta y de ética animal.

Inicialmente, el trabajo fue presentado ante el Ministerio del Interior para la consulta previa de presencia de etnias en las áreas de colecta en ejercicio de las facultades legales y reglamentarias, en especial, las conferidas en el artículo 16 del numeral 5 del Decreto 2893 de 2011 y la Resolución 1928 del 2 de diciembre de 2013. Para el cual dieron el aval mediante el proceso de permisos con el oficio de radicado externo EXTMII5-0005966 con certificación número 305 de 24 de marzo de 2015.

Posterior a esto, para dar cumplimiento a la legislación vigente relacionada con la protección a la biodiversidad y el acceso a recursos genéticos, se legalizaron las colectas de escorpiones y el manejo del veneno por medio del “Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica” de la Universidad del Valle resolución 1070 del 28 de agosto del 2015 en uso de las facultades conferidas en la Ley 99 de 1993, en el Decreto Ley 3573 del 27 de septiembre de 2011 y el Decreto 1076 del 26 de mayo de 2005. Por lo cual nos concedieron el certificado con número 164383F74D5 del 25 de junio de 2018.

Adicionalmente, para el desarrollo del tercer objetivo, fue presentado el proyecto ante el comité institucional de revisión de ética con animales en experimentación (CEAS) de la universidad del Valle. El cual dio el AVAL al proyecto con número 001-019 en los aspectos éticos para la experimentación, mediante la resolución No. 159 de 2013, la cual está regida por la ley 84 de 1989 y la resolución No. 8430 de 1992 del Ministerio de Salud, sobre protección de animales en experimentación, este se firmó con fecha de certificación CEAS a los 21 días del mes de enero del 2019.

4.2. Área de muestreo y colecta de material biológico

La colecta y avistamientos de escorpiones se hizo en el municipio de Buenaventura que se encuentra en la Región Pacífico del Valle del Cauca, Buenaventura tiene una extensión de 737.646 hectáreas de extensión, la cual incluye islas continentales como Isla Palma y una isla Oceánica ubicada a 400 km de Buenaventura (IGAC 1997). El municipio está poblado de ecosistemas de manglar a lo largo de la costa, el cual penetra entre 5 y 25 km dentro del territorio. El territorio es considerado un ecosistema de selva pluvial ya que la precipitación promedia anual es de 4.000 mm/año y presenta un régimen de lluvias de distribución unimodal (OSSO and Minga 2000).

Se realizaron dos salidas de campo al municipio de Buenaventura y se colectaron escorpiones en dos puntos de muestreo. La primera salida tuvo lugar entre el 7 y el 12 de febrero de 2016 y la segunda entre el 26 de octubre y el 1 de noviembre de 2017. Las localidades muestreadas fueron: Isla Palma (3,9052222, -77,3617222) y la Base Naval de Bahía Málaga (3,9813889, -77,3366944) esta última es zona continental. Estas localidades están bajo la jurisdicción de la Dirección General Marítima (DIMAR) y actualmente hacen parte del Parque Nacional Natural Uramba Bahía Málaga. En cada salida de campo se hicieron muestreos nocturnos de escorpiones con el esfuerzo de tres colectores mediante captura manual, usando pinzas y tarros plásticos debidamente rotulados, además se emplearon linternas de luz ultravioleta para detectarlos fácilmente debido a la fluorescencia de su tegumento.

Los individuos de la especie *T. asthenes* fueron llevados al laboratorio de fisiología del posgrado de la Universidad del Valle, para ser desvenenados bajo microestimulación eléctrica del telson (4 voltios). El veneno se colectó en capilares y estos a su vez se guardaron en viales debidamente rotulados con el fin de cuantificar la cantidad en peso (mg) del veneno extraído por individuo. Posteriormente, el veneno se disolvió en agua tipo I y se centrifugó por 15 minutos a 14000 rpm, el sobrenadante fue liofilizado y almacenado a -20 °C (Cao et al. 2013; Fuzita et al. 2015; Romero-Gutiérrez et al. 2018). Este liofilizado se denomina veneno entero, el cual fue empleado para realizar el test de Irwin en modelo murino.

Después de ser desvenenados, los escorpiones fueron sometidos a eutanasia en un receptáculo cerrado con Isoflorano hasta observar que sus movimientos cesaron e inmediatamente fueron dispuestos en viales con alcohol al 80%, debidamente rotulados para ser depositados en las colecciones: MUSENUV de la Universidad del Valle y en el ICN de la universidad Nacional. Dos de estos especímenes fueron usados para realizar la extracción de las glándulas productoras de veneno y el procesamiento posterior para hacer el análisis transcriptómico.

4.3. Transcriptómica de la glándula de veneno de *T. asthenes*

Se han desarrollado varias tecnologías para derivar y cuantificar un transcriptoma. Una de ellas es RNA-Seq, la cual ha tenido un enfoque para la elaboración de perfiles del transcriptoma y utiliza tecnologías de secuenciación profunda. Esta proporciona mayor precisión frente a otras metodologías para determinar los niveles de expresión y las isoformas presentes en los transcritos (Wang, Gerstein, and Snyder 2009). Jazayeri y colaboradores (2009) describieron tres pasos básicos importantes para desarrollar experimentos mediante el uso de RNA-Seq que incluyen una parte de "laboratorio", la parte "en equipo" y finalmente la parte "in silico".

4.3.1. Extracción de RNA.

La extracción del RNA se hizo por aislamiento de glándula de veneno de dos especímenes de *T. asthenes* que fueron desvenenados cinco días antes. Para la extracción se empleó el miniKit universal QIAGEN RNAeasy. La concentración de RNA fue medida empleando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000c) y su integridad se evaluó con el sistema Agilent 2200 TapeStation, para posteriormente construir la librería de cDNA.

Para la elaboración de las librerías, se empleó el Kit Illumina TruSeq Stranded mRNA. La síntesis de la primera cadena de cDNA fue preparada a 25°C por 10 minutos, 42°C por 15 minutos y 70°C, usando hexámeros aleatorios y la transcriptasa reversa ProtoScript II (NEW ENGLAND BioLabs Inc.). Para la síntesis de la segunda cadena de cDNA, el molde de RNA fue removido y una segunda hebra fue generada por la incorporación de dUTP (iridina trifosfato) (en lugar de dTTP, para mantener la información de la hebra) para generar doble cadena (ds) en cDNA. Los cDNA con extremos romos fueron removidos de la mezcla mediante el uso de microesferas (beads). Los extremos 3' de los cDNA fueron adenilados y ligados a adaptadores. Se amplificó mediante PCR, el DNA con adaptadores en ambos extremos con las siguientes condiciones: 15 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos.

Las librerías fueron cuantificadas usando el sistema dsDNA Promega QuantiFluor sobre un Fluorómetro Quantus (Promega, Madison, WI). El tamaño y la pureza de las librerías fueron analizadas usando una plataforma automatizada para electroforesis que se compone de tres elementos: una cinta consumible (High Sensitivity D1000 Screen Tape), un instrumento (TapeStation Agilent 2200) y un paquete de software (Agilent TapeStation Analysis).

4.3.2. Secuenciación.

Para el desarrollo de la parte "en equipo" las librerías fueron normalizadas, reunidas y sujetas a clúster y la lectura de las secuencias pareadas, denominadas reads fueron sometidas a secuenciación por 100 ciclos en un HiSeq2500 (Illumina, Inc. San Diego, CA, USA). Jazayeri y colaboradores (2009) mencionan que, durante la secuenciación, cada dNTP modificado se une a una base específica de fluoróforo que se vuelve fluorescente cuando se incorpora al fragmento de cDNA. La emisión es registrada por una cámara de alta resolución. Este proceso se repite en cada ciclo a medida que se produce la incorporación de un dNTP marcado, seguido de la toma de una imagen fluorescente y la eliminación del terminador. En este método, los fragmentos son amplificados por puente. La librería de cDNA obtenida consistió en dos archivos fastq (reads forward y reverse).

4.3.3. In silico.

El paso inicial de la parte "in silico" consiste en evaluar la calidad de los fragmentos crudos o reads, esta fue evaluada mediante el programa FastQC de la plataforma de GalaxyProject (<https://usegalaxy.org/>). Al no disponer de un genoma de referencia, los reads fueron ensamblados *de novo* con el software Trinity (v 2.2.0) y mapeados contra las secuencias ensambladas mediante la herramienta TopHat, la cual alinea los fragmentos con el genoma o en este caso los reads ensamblados y descubre los sitios de empalme de transcripción (Trapnell et al. 2012).

Para estimar la cantidad de reads que existe de cada uno de los transcriptos, se utilizó la herramienta Htseq-count. Posteriormente se seleccionaron los transcriptos con conteo mayor a 286 reads correspondientes a 3000 transcriptos e igualmente la cantidad de transcriptos que acepta el programa, para realizar la búsqueda de secuencias homólogas contra la base de datos no redundante (nr) de los escorpiones del género *Tityus* (taxa: 6886) empleando el servidor BLASTN del NCBI, la cual compara con una base de datos de nucleótidos secuencias de nucleótidos (e-value $<10^{-10}$) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Los transcriptos que presentaron similitud o hicieron match con secuencias reportadas en las bases de datos son denominados transcriptos putativos, estos, fueron seleccionados, analizados manualmente para anotar su función según la literatura. Posteriormente se clasificaron en: componentes celulares, función desconocida, metaloproteinasas, péptidos potenciadores de bradiquinina (BPP), cisteína peptidasas, endopeptidasas, péptidos antimicrobianos (AMPs) y toxinas moduladoras de canales iónicos (NaScTx y KScTx). Estas últimas fueron analizadas además mediante el algoritmo

BLASTX del NCBI la cual toma una secuencia de nucleótidos, la traduce en los seis marcos de lectura y compara esas traducciones con las secuencias de la base de datos de proteínas. Así se tiene más confianza en la función definitiva de las secuencias de estudio.

Finalmente para realizar los alineamientos, las secuencias de nucleótidos fueron traducidos a aminoácidos para determinar sus marcos abiertos de lectura (ORFs, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Se realizó la predicción del péptido señal y del corte del propéptido con el programa Signal P 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y SpiderP (<http://www.arachnoserver.org/spiderP.html>), respectivamente. Los alineamientos de múltiples secuencias se realizaron con MUSCLE del software MEGA 7. Estos fueron editados con Jalview (<http://www.jalview.org/>) y Adobe Illustrator CS3. En todos ellos se omite el péptido señal y el propéptido.

4.4. Análisis de la actividad del veneno de *T. asthenes* en modelo murino: Test de Irwin

Los ensayos con modelos murinos son las pruebas gold estándar para evaluar la actividad nociceptiva, antinociceptiva y los efectos tóxicos in vivo de venenos. Estos biomodelos han sido seleccionados genéticamente y mantenidos en condiciones controladas, lo cual permite consistencia en las respuestas. Son también fáciles de manipular y mantener en condiciones de laboratorio.

El test de Irwin es un procedimiento observacional sistemático descrito por Irwin en 1968. Se usa frecuentemente para evaluar neurotoxicidad en las fases iniciales de los estudios y permite: 1) prever los efectos secundarios de la sustancia sobre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP), 2) suponer los mecanismos por los cuales se dan estos efectos y posiblemente revela algunos efectos terapéuticos nuevos. Cuando la sustancia está caracterizada, el test también provee información importante sobre su margen de seguridad (Roux, Sablé, and Porsolt 2004; Avellaneda 2011; Castagné et al. 2013).

Actualmente este test hace parte de los procedimientos recomendados por la ICH (International Committee for Harmonization) (Castagné et al. 2013). Esta investigación se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de fisiología de posgrado de la Universidad del Valle. Las pruebas biológicas se realizaron con ratones machos albinos suizos de 9 a 12 semanas de edad, machos, con pesos entre 20 y 23 gramos. En conformidad con las normas colombianas para el uso e investigación en animales vivos, además de garantizar que los resultados de la investigación sean confiables.

Inicialmente se realizaron observaciones diarias de los animales durante dos semanas con el fin de reconocer cuál era la conducta normal en condiciones estándar. Posterior a esto, se examinó el comportamiento y parámetros fisiológicos de los organismos frente a 2 tratamientos diferentes: 1) el grupo de ratones albino suizos control (n=5) fue inyectado por vía intraperitoneal (IP) con 0,5 ml de solución salina en amortiguador fosfatos a pH 7,2 (PBS) y 2) un grupo experimental (n=5) de ratones albinos suizos fueron inyectados por vía IP, con una dosis igual a 6,1 mg de veneno de *T. asthenes* del municipio de Buenaventura por cada kg de peso de los ratones, esta dosis es la reportada como DL50 para la misma especie en la localidad de Mutatá-Antioquia por Gómez y colaboradores (2010). El veneno fue disuelto en 0,5 ml de PBS.

Todos los experimentos con animales se hicieron a 25 °C, con humedad relativa entre el 45-55% y niveles de ruido menores a 70 decibeles. Se distribuyeron en receptáculos transparentes por separado, suministrándoles agua y alimento *ad libitum* como se muestra en el anexo 1. Todos los ratones fueron monitoreados en el transcurso de una hora y se conservaron hasta las 24 horas para determinar si la dosis empleada era letal o si por el contrario se recuperaban. Los síntomas presentados por los ratones son registrados a los 15 minutos, 30 minutos y una hora en la tabla modificada del test de Irwin (Anexo 2).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aspectos ecológicos de *T. asthenes* en el municipio de Buenaventura

Durante el día los escorpiones son relativamente inactivos y permanecen en sus refugios, estos salen en busca de alimento por lo general después del atardecer al igual que lo citan Brown & O'Connell (2000). En el estudio estos se observaron fuera de sus refugios principalmente desde alrededor de las 18:30 y permanecían muy activos hasta alrededor de las 22:00, por lo general después de la media noche no se colectaban individuos fuera de sus refugios.

Tityus asthenes Pocock, 1893, fue reportada para la isla Gorgona en el Pacífico por Lourenço & Flórez (1989), además se sabe que esta especie es la más común para la zona de vida de la región del pacífico. En nuestro estudio se colectaron 35 individuos entre las dos localidades del municipio de Buenaventura tanto en isla como en zona continental. Se encontraron individuos adultos, sub adultos y juveniles, hembras y machos forrajeando en el envés y en axilas de hojas de arbusto y también en el tronco de estos a varias alturas del suelo, solo se observaron sobre hojarasca y entre raíces de árboles a algunos juveniles.

La ecología de los escorpiones es uno de los aspectos menos conocido, en cuanto a su hábitat, se pueden dividir en dos grupos generales según Polis (1990), las especies que habitan en el suelo y las especies arbóreas, según esto *T. asthenes* se considera una especie arbórea puesto que tanto adultos como crías se encontraron a diferentes alturas en la vegetación. La selección de hábitat tiene consecuencias importantes para la supervivencia de un organismo, la disponibilidad de alimentos y la abundancia de los depredadores puede influir en esta elección. Lo ideal es que los organismos deben elegir hábitats que maximicen la abundancia de alimento como que minimicen el riesgo de depredación.

En Isla Palma se colectó una hembra con crías a más de 3 metros de altura y en la localidad Bahía Málaga se registró la mayor altura la cual fue sobre el tronco de un árbol a 7 metros del suelo. También se encontraron dos individuos adultos cerca a construcciones humanas, lo cual también lo reporta Flórez (2001) y Cozijn (2011), quienes los reportan en áreas rurales intra y extra domiciliarias. Todos los individuos se colectaron durante la noche teniendo en promedio 25.7°C y 84.3% de humedad relativa.

Adicionalmente Brown & O'Connell (2000) registraron que el hecho de encontrar escorpiones a diferentes alturas en la vegetación puede deberse a una reacción del gradiente de humedad y Skutelsky (1996) lo correlacionó con un aumento de la presión de vapor de agua y la velocidad del viento. Estas teorías se ven soportadas por el hecho de que el municipio de Buenaventura presenta los valores más altos de precipitación y humedad relativa en el departamento del Valle del Cauca. Sin embargo, hacen falta más estudios para comprender mejor aspectos como, la ecología y la historia natural de estos arácnidos.

Se realizaron varias consultas en hospitales del municipio en donde indicaron que algunas de las manifestaciones clínicas que presentaban pacientes con picaduras de escorpiones fueron: Dolor que se prolonga por el miembro afectado, linfadenopatías locales, inflamación local, punto necrótico, malestar de 6 h en adultos y complicaciones cardiorrespiratorias y muerte en un niño. Sin embargo, todos estos síntomas no pueden ser adjudicados a la especie de estudio *T. asthenes* ya que podemos decir que en el municipio de Buenaventura se encuentran otras 5 especies: *Tityus sastrei*, *Tityus sp.*, *Ananteris sp.*, *Tarsoporosus anchicaya* y *Chactas mauriesi* (figura 7).

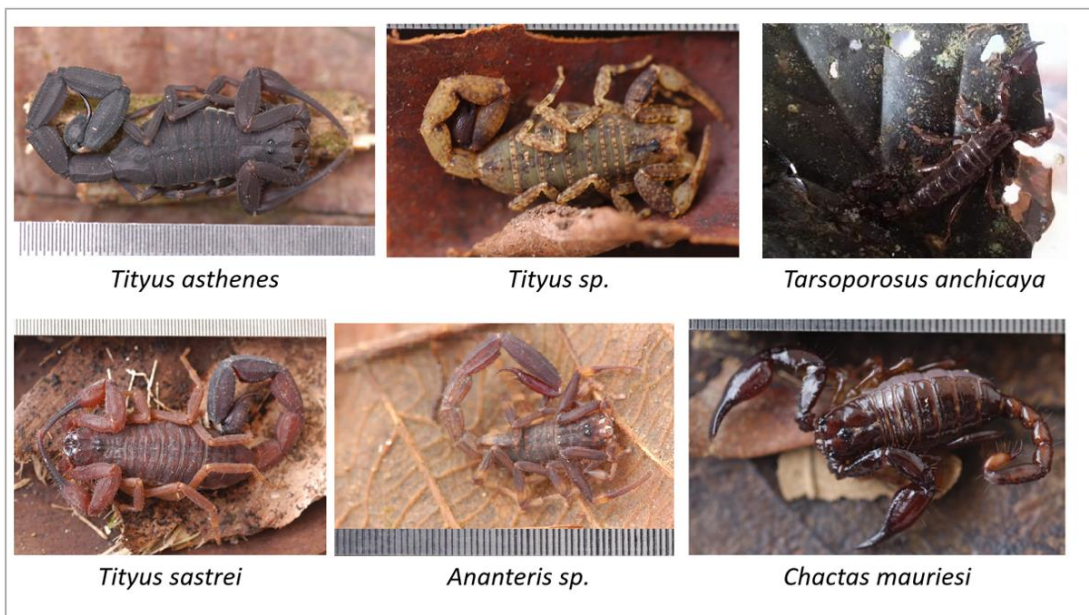


Figura 7. Especies de escorpiones observadas en los diferentes muestreos de las dos localidades del municipio de Buenaventura, Colombia.

Hay una gran riqueza de escorpiofauna en el municipio de Buenaventura al igual que ocurre con especies de mamíferos (Rojas et al. 2012), anfibios y reptiles (Castro and Vargas 2008), esto quizás debido a que esta área natural representa la mayor parte del departamento y a la exuberancia de sus bosques (Castro & Vargas 2008). Los factores determinantes de la

distribución de la escorpiofauna puede resultar clave para la comprensión de sus posibles modificaciones y de cómo esas poblaciones de escorpiones pueden causar gran impacto en las comunidades humanas, es por esto que el conocimiento de la ecología, la biología y la distribución de las especie es el paso inicial para comenzar el diseño de programas de vigilancia y control epidemiológico.

5.2. Perfil transcriptómico de la glándula productora de veneno

La transcriptómica es el estudio del conjunto completo de transcriptos y su cantidad en una etapa específica de desarrollo o estado fisiológico de un organismo vivo, se puede describir como una lista completa de todas las clases de moléculas de RNA, es decir, que codifican o no codifican cuando se expresan en una célula, tejido u órgano en particular (Wang, Gerstein, and Snyder 2009). La interpretación adecuada del transcriptoma puede revelar los componentes moleculares de las células y tejidos, sus funciones y efectos biológicos, descifrar las señales ambientales y su relación con el genoma funcional (Jazayeri, Melgarejo, and Romero 2015).

La metodología RNA-seq es una técnica molecular que usa secuenciación de nueva generación para conocer secuencias de nucleótidos de transcriptos de RNA que se producen en una muestra en un momento dado (Conesa et al. 2016). Esta técnica ha tenido un desarrollo acelerado y se ha convertido en el método de elección para el estudio y la caracterización de los transcriptomas dinámicos, aprovechando las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (Raiol et al. 2014). La capacidad de RNA-Seq para descubrir isoformas de mRNA no caracterizadas previamente y nuevas clases de RNA no codificantes representa el motivo por el cual esta tecnología de rápido desarrollo se usa actualmente, asumiendo un papel clave en el análisis del RNA (Wang et al. 2009; Jazayeri et al. 2015).

La secuenciación del RNA de la glándula productora de veneno de *T. asthenes* generó una librería de DNAC con 19359053 fragmentos crudos o reads. El reporte del control de calidad de las secuencias fue satisfactorio y al no tener un genoma de referencia para el género *Tityus* se procedió con el ensamblaje *de novo*, el cual produjo un total de 48759 secuencias de reads ensamblados. Con la herramienta TopHat se presentó un porcentaje de mapeo del 90,3%, lo que corresponde a 44047 transcriptos. Después de este procedimiento los primeros tres mil transcriptos más abundantes según la herramienta htseq-count fueron seleccionados para ser analizados con secuencias de escorpiones del género *Tityus* reportadas en la base de datos no redundante (nr) del NCBI, dando como resultado 218 transcriptos putativos del escorpión *T. asthenes*.

El uso de una librería de DNAC obtenida de las glándulas productora de veneno del telson de la especie *T. asthenes* para identificar secuencias putativas es reportada aquí por primera vez, sin embargo, esta información no corresponde al universo de los componentes presentes en las glándulas de veneno, es la representación de las tres mil secuencias más abundantes o con mayor conteo, de las cuales 218 fueron homólogas a componentes reportados para otras especies del género *Tityus*. Los parámetros con que se describió esta homología entre las secuencias fueron el porcentaje de homología y el E-valor.

En la figura 8 se muestra la clasificación y abundancia de los transcritos putativos organizados en nueve diferentes categorías para representar el perfil de los componentes de la glándula de veneno siendo la categoría metaloproteinasas la más abundante (37%) seguida por la categoría funciones desconocidas (17%). Las cisteínas péptidasas y péptidos potenciadores de bradiquinina (BPP) fueron las menos abundantes. De esta última categoría se encontró un solo representante, sin embargo, esta secuencia fue la que presentó mayor conteo el cual fue de 730742 calculado mediante la herramienta htseq-count (Figura 9). Las toxinas estuvieron representadas únicamente por sodiotoxinas (NaScTx) y potasiotoxinas (KScTx), con un 15% y 10% de porcentaje de abundancia respectivamente.

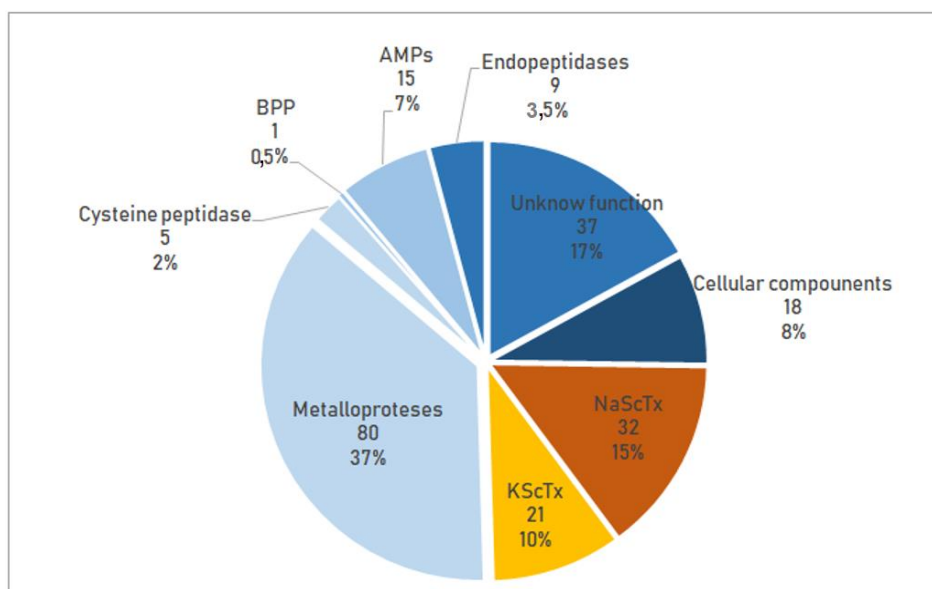


Figura 8: Porcentaje y abundancia de los transcritos que corresponden a componentes putativos del veneno de *T. asthenes* clasificados en nueve categorías.

El perfil de transcritos putativos estimados para la especie *T. asthenes* es congruente con los resultados de estudios de otras especies del género *Tityus* que afectan la salud humana (Almeida et al. 2012; Alvarenga et al. 2012; Oliveira et al. 2015; Oliveira et al. 2018). En los estudios citados anteriormente las metaloproteinasas fueron las que presentaron mayor porcentaje de abundancia. Desde el inicio de 1940 se detectó que el veneno de *Tityus* presentaba actividad proteolítica, pero tan solo Fletcher y colaboradores en 2010 describieron una metaloproteinasa dependiente de Zinc en el escorpión *T. serrulatus*. De las metaloproteinasas reportadas en nuestro estudio, el 87.5% hicieron match con las metaloproteinasas descritas por Carmo y colaboradores (2014) en el escorpión *T. serrulatus*, específicamente con los precursores denominados TsMS1 hasta TsMS8, principalmente con la denominada TsMS3 (46%).

Las metaloproteinasas descritas por Carmo et al. (2014) pertenecen a la familia ADAM (por sus siglas in inglés “A Desintegrin and Metalloprotease”) las cuales dependen de Zinc y son comúnmente encontradas en serpientes, ya que causan efectos de degradación de tejidos y afectaciones en los procesos de coagulación de la sangre, sin embargo estos problemas no son observados en las picaduras de especies de *Tityus*, al igual q no ha sido reportado para nuestra especie de estudio. Otro rol que ha sido descrito para estas proteínas fue la irregularidad de la secreción pancreática (Ortiz et al. 2014). Sin embargo, aún no es claro si la alta expresión de metaloproteinasas observadas en el transcriptoma corresponda al nivel real de estas proteínas en la solución del veneno.

La siguiente categoría en abundancia fueron los componentes putativos del veneno con funciones desconocidas, siendo todas estas proteínas desconocidas descritas para la especie *T. discrepans* (D’Suze, Sandoval, and Sevcik 2015) estuvo representado por 12 clústeres y un total de 37 transcritos putativos. La categoría componentes celulares presentó transcritos que codifican para proteínas como citocromo oxidasa y proteínas ribosomales de varias especies de *Tityus* y además transcritos del genoma secuenciado de la mitocondria reportado para la especie *T. serrulatus* (Martins et al. 2016). Los péptidos antimicrobianos (AMPs) generalmente no son tan abundante, sin embargo tienen un papel importante en la protección contra bacterias, protozoarios, virus y hongos, constituyendo el principal sistema de defensa en este caso de la glándula y en escorpiones además se ha evidenciado que algunos de estos péptidos pueden potenciar la acción neurotóxica del veneno (Almeida et al. 2012; U. Oliveira et al. 2015). Se encontraron diferentes proteasas, entre las cuales se incluyen la categoría cisteína peptidasa y dentro de la categoría endopeptidasas están las serina proteinasas, trypsina like y cathepsina like, todas descritas para la especie *T. serrulatus* (Fuzita et al. 2015).

Actualmente se ha incrementado la cantidad de péptidos similares a potenciadores de bradiquinina (BPP) descritas para especies del género *Tityus* (D'Suze et al. 2009, Almeida et al. 2012; Alvarenga et al. 2012; Oliveira et al. 2015; Oliveira et al. 2018). En este estudio se identificó para la especie *T. asthenes* un transcripto que codifica para un precursor similar a BPP, este se muestra en la figura 9 el cual fue denominado TasBPP. Este fue el transcripto putativo con mayor conteo dentro del estudio. Presentó un porcentaje de homología igual a 93.5% y un e-valor de 1.03E-97 con el precursor TdBPP de la especie *T. discrepans* (D'Suze et al. 2009), además un 57% de homología con el precursor meuTx20 de la especie *Mesobuthus eupeus* (Baradaran et al. 2018), la función real de los péptidos nativos mencionados anteriormente aún es desconocida (figura 9).

La función de BPP ha sido descrita para la especie *T. serrulatus* donde se evidenció un efecto hipotensivo en ratas normotensas (Verano-Braga et al. 2008). Estos péptidos usualmente inhiben la enzima convertidora de angiotensina (ACE) potenciando el vasodilatador bradiquinina (BK), lo cual conduce a una reducción de la presión sanguínea sistémica (Almeida et al. 2012).

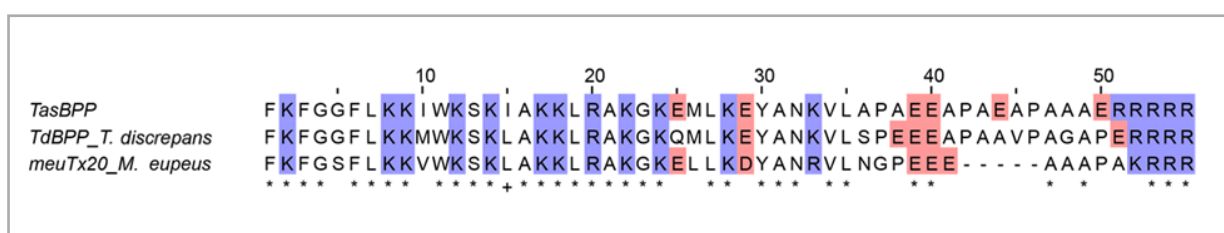


Figura 9: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos que codifica el péptido similar a potenciadores de bradiquinina (BPP) con secuencias homologas reportadas en NCBI. Se omite el péptido señal. En azul se muestran los residuos básicos y en rojo los residuos ácidos.

5.3. Búsqueda de similitud y anotación de funciones de transcriptos de toxinas putativas moduladoras de canales iónicos

Las toxinas moduladoras de canales son los componentes más estudiados del veneno de escorpiones debido a su relevancia médica en intoxicación en humanos. Su interacción con canales iónicos resulta en una cascada neurofisiopatológica de eventos que pueden en algunos casos llevar a la muerte. Se ha evidenciado que las toxinas de canales de Na⁺ y K⁺ son las que participan principalmente en esta intoxicación (Romero-Gutiérrez et al. 2018), y a su vez son las toxinas más abundantes y diversas en los venenos de escorpiones peligrosos para la salud humana, lo que se relaciona con lo encontrado para nuestro estudio con la especie *T. asthenes*.

En el análisis transcriptómico de *T. asthenes* los transcriptos putativos que codifican toxinas moduladoras de canales iónicos fueron 53 y pertenecen a toxinas de canales de Na⁺ y K⁺. Este resultado es congruente con los análisis transcriptómicos que se han publicado hasta el momento para especies de la familia Buthidae (Zhong et al. 2017; Deng et al. 2018, Romero-Gutiérrez et al. 2018). La Mayoría de estas secuencias presentaron un rango de longitud entre 237 a 285 pb (figura 10) similar a lo reportado en la literatura (Schwartz et al. 2007, Almeida et al. 2012, Valdez-Velazquez et al. 2013).

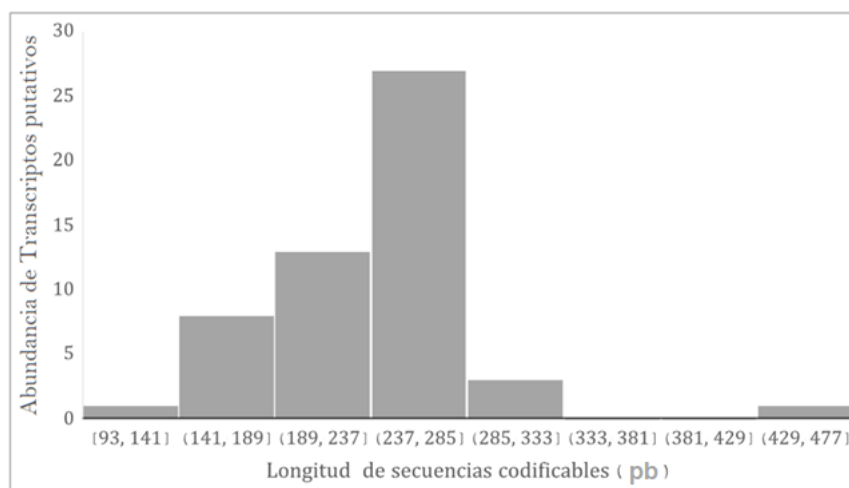


Figura 10: Histograma de la abundancia de cada rango de longitud de transcriptos de toxinas putativas del transcriptoma de la glándula de veneno del escorpión *T. asthenes*. Cada rango en la coordenada X es de 48 pb.

En la figura 11 se representa la distribución de cada transcripto putativo considerando los valores del logaritmo negativo en base diez del E-valor (-Log₁₀E-Value) en función del valor del conteo. Esto con el propósito de tener una aproximación de las secuencias con mayor homología en BLAST y con mayor abundancia relativa, correspondiendo a aquellas que se posicionan en la parte superior derecha del diagrama. En esta área es posible observar una mayor cantidad de secuencias de NaScTx en comparación con las KScTx.

La toxicidad en mamíferos por picadura de escorpiones ha sido relacionada directamente con el contenido de NaScTx (Romero-Gutiérrez et al. 2018), ya que estas afectan los canales de Na⁺ de las células eléctricamente excitables, facilitando la despolarización de su membrana y la liberación de neurotransmisores, afectando el normal funcionamiento de varios órganos, lo cual podría llevar en casos extremos a dificultad respiratoria y falla cardíaca, las dos causas más comunes de muerte por picadura de escorpión (Adolfo Borges and Graham 2016).

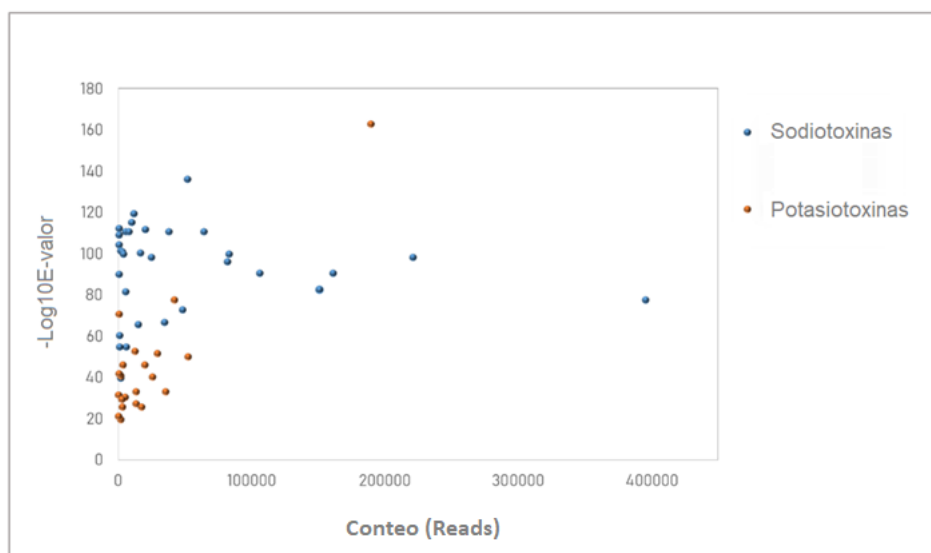


Figura 11. Distribución de las secuencias anotadas como toxinas putativas que modulan canales de Na^+ y K^+ obtenidas del análisis transcriptómico de la glándula de veneno de *T. asthenes*. 53 secuencias homólogas fueron analizadas y se muestra la cantidad de reads de cada una en el eje X y el logaritmo negativo en base diez del E-Valor en el eje Y.

De acuerdo a la nomenclatura reportada en otros análisis transcriptómicos de la glándula productora de veneno de varios escorpiones (Romero-Gutiérrez et al. 2018; U. Oliveira et al. 2018; Deng et al. 2018), el nombre que se les ha dado a nuestros transcriptos de toxinas putativas en las tablas 1, 2, 3, y 5 son anotadas con las iniciales de *Tityus asthenes* (Tas), seguidas por tres o cuatro letras que definen la clase de péptido que codifican putativamente (NaTx o KTx), luego tres letras dependiendo de la clasificación (alfa o beta) y finalmente el número del transcripto. En dichas tablas se determinó para la secuencia de aminoácidos que el subrayado corresponde a péptidos señal, la letra normal indica el propéptido y en negrita se denota el péptido maduro u ORF. Además, cabe notar que todos los transcriptos putativos de toxinas presentaron más del 68% de homología con secuencias de especies del género *Tityus*, obteniendo en promedio un 85% de homología.

Es importante tener en cuenta que de las 35 especies de *Tityus* reportadas en la base de datos del NCBI, solo se encontraron homólogas con secuencias de toxinas de seis especies (tablas 1, 2, 3 y 5). La mayor abundancia de estas homólogas se obtuvo con las NaScTX de *T. obscurus* y las KScTX de *T. discrepans*, especies que habitan hacia la región norte de la amazonia. Previamente Guerrero-Vargas y colaboradores (2012) mediante análisis filogenéticos para NaScTXs mostraron que existen diferencias entre el veneno de las especies del género *Tityus* como *T. pachyurus*, *T. obscurus*, *T. discrepans* y *T. zulianus* que viven hacia el norte del Amazonas, con las especies que viven hacia el sur del Amazonas tales como *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. costatus* y *T. fasciolatus*. Estas diferencias

geográficas y medioambientales en los escorpiones no solo contribuyen con procesos de especiación para el género, si no que además se ve reflejada en la diversidad de componentes del veneno de escorpiones. Nuestros resultados indican que el veneno de *T. Asthenes* tiene un veneno con un perfil mas similar a los escorpiones que viven al norte de la amazonia, coincidente con su ubicación.

5.3.1. Toxinas moduladoras de canales de Na⁺.

Las toxinas que modulan la actividad de los canales de Na⁺ se encuentran principalmente en escorpiones de la familia Buthidae (99%) y son responsables de los síntomas neurotóxicos durante el envenenamiento (Satibañez et al. 2016). En este estudio 32 secuencias putativas fueron NaScTX y el 72% de estas están relacionadas con secuencias de la especie *T. obscurus* Gervais, 1843 (tabla 1 y 2), también considerada como *T. cambridgei* Pocock, 1897, por lo que se consideran sinónimos y se deja el nombre *T. obscurus* en todo el documento, así en algunos artículos no se presente de esta manera (Guerrero et al, 2012). Las sodiotoxinas se agruparon en 10 contigs los cuales son formados por dos o más secuencias homólogas y 5 singlets que significa que contiene un solo transcripto por secuencia homóloga.

En diferentes estudios se ha mencionado que la acción de las α -NaScTx, producen inhibición en el proceso de inactivación, promoviendo los estados de prolongada despolarización en las células (Rodríguez de la Vega and Possani 2005; Cordeiro et al. 2015; Deuis et al. 2017; Romero-Gutiérrez et al. 2018). Se anotaron 19 transcriptos putativos clasificados como α -NaScTx, estos presentaron similar longitud del ORF donde el promedio fue de 85 aminoácidos (aa) los cuales se describen en la tabla 1. Se observa que el 100% de los transcriptos fueron homólogos a secuencias de la especie *T. obscurus* (Guerrero-Vargas et al. 2012).

Las α -NaScTx se agruparon en 6 contigs y 2 singlets, los respectivos alineamientos se observan en la figura 12. En esta figura no necesariamente cada clúster está conformado por un contig, en algunos casos se han incluido los alineamientos de varios contigs y/o singlets para detallar similitudes con diferentes precursores homólogos (de igual manera se organizaron los alineamientos en las figuras 13 y 14).

Los transcriptos denominados TasNaTxAlp01 y TasNaTxAlp02 conforman un contig que presentaron homología con el precursor To10. El contig conformado por los transcriptos TasNaTxAlp03, TasNaTxAlp04 y TasNaTxAlp05 fue homólogo con To14. El transcripto putativo denominado TasNaTxAlp19 es un single homólogo de la secuencia del precursor To9. Estos alineamientos se muestran en la figura 12-A.

El alineamiento de la figura 12-B está conformado por un singlet denominado TasNaTxAlp06 homólogo al precursor To4. El contig homólogo con To5 está conformado por TasNaTxAlp07, TasNaTxAlp08, TasNaTxAlp09 y TasNaTxAlp10, donde las secuencias en aminoácidos de TasNaTxAlp09 y TasNaTxAlp10 son iguales a TasNaTxAlp07 y difieren en secuencias de nucleótidos, por lo que estos dos transcriptos no se muestran en el alineamiento. Finalmente, TasNaTxAlp15, TasNaTxAlp16, TasNaTxAlp17 y TasNaTxAlp18 fueron homólogos con To8, siendo la secuencia de aminoácidos de TasNaTxAlp17 y TasNaTxAlp18 iguales por lo que esta última no se muestra en la figura.

El contig conformado por TasNaTxAlp11 y TasNaTxAlp12 se alineó en Blast con la secuencia del precursor To6 y TasNaTxAlp13 y TasNaTxAlp14 resultaron homólogos a la secuencia de To7, los cuales se presentan en la figura 12-C. En los diferentes alineamientos se observa que las secuencias de transcriptos putativos son muy conservadas entre ellas y con respecto a las secuencias homólogas encontradas en *T. obscurus* (figura 12). Los transcriptos presentaron un péptido maduro de longitud entre 72-98 aa. TasNaTxAlp08, TasNaTxAlp11 y TasNaTxAlp12 no presentaron péptido señal, TasNaTxAlp13 presentó un péptido señal de longitud de 33 residuos y las demás secuencias presentaron péptido señal de longitud entre 19-20 residuos (Tabla 1).

En los alineamientos se observa que los transcriptos presentan un alto nivel de conservación del patrón de cisteínas las cuales son importantes en el plegamiento. Estas toxinas presentan una estructura tridimensional conservada conformada por una α -hélice y dos o tres hojas betas antiparalelas estabilizadas por entre dos y cuatro puentes disulfuros (Rodríguez de la Vega and Possani 2005; Cordeiro et al. 2015). Las diferencias que haya en su plegamiento van a conferir especificidad biológica a las toxinas con respecto a sus blancos moleculares. En el caso de las sodiotoxinas putativas identificadas se presentaron ocho residuos de cisteínas que probablemente formen cuatro puentes disulfuro.

Los estudios estructurales de las sodiotoxinas muestran que 17 aminoácidos son importantes para el reconocimiento de los canales de Na^+ , algunos de estos están ubicados en la región N-terminal y otros en la región C-terminal

(Rodríguez de la Vega and Possani 2005). En nuestro estudio se observa en las sodiotoxinas identificadas, la presencia de residuos básicos en la región C-terminal y de residuos con cadenas laterales con presencia de grupos aminos. Las secuencia del alineamiento 12-C no presentan estas características, esto ha sido denominado como inconsistencia en la conservación de la “superficie funcional” en las α -NaScTx (Rodríguez de la Vega and Possani 2005).

Guerrero-Vargas y colaboradores (2012) mencionan que algunas de las sodiotoxinas presentan el C-terminal amidado lo cual parece corresponder a un modificación postraducciona en muchas de las sodiotoxinas descritas. Igualmente, reportaron que cuando las secuencias de aminoácidos terminan con Gly seguidas de residuos básicos, se supone que estos residuos de la región carboxi-terminal son removidos con una carboxipeptidasa, después de lo cual el péptido restante mostraría la mayor parte del C-terminal amidado. La importancia de la amidación del C-terminal fue demostrado también en dos alfa toxinas clonadas mostrando mayor toxicidad en mamíferos (Benkhadir et al. 2004), por lo que se plantea un importante papel atribuido a la secuencia C-terminal de las sodiotoxinas en su interacción con los receptores.

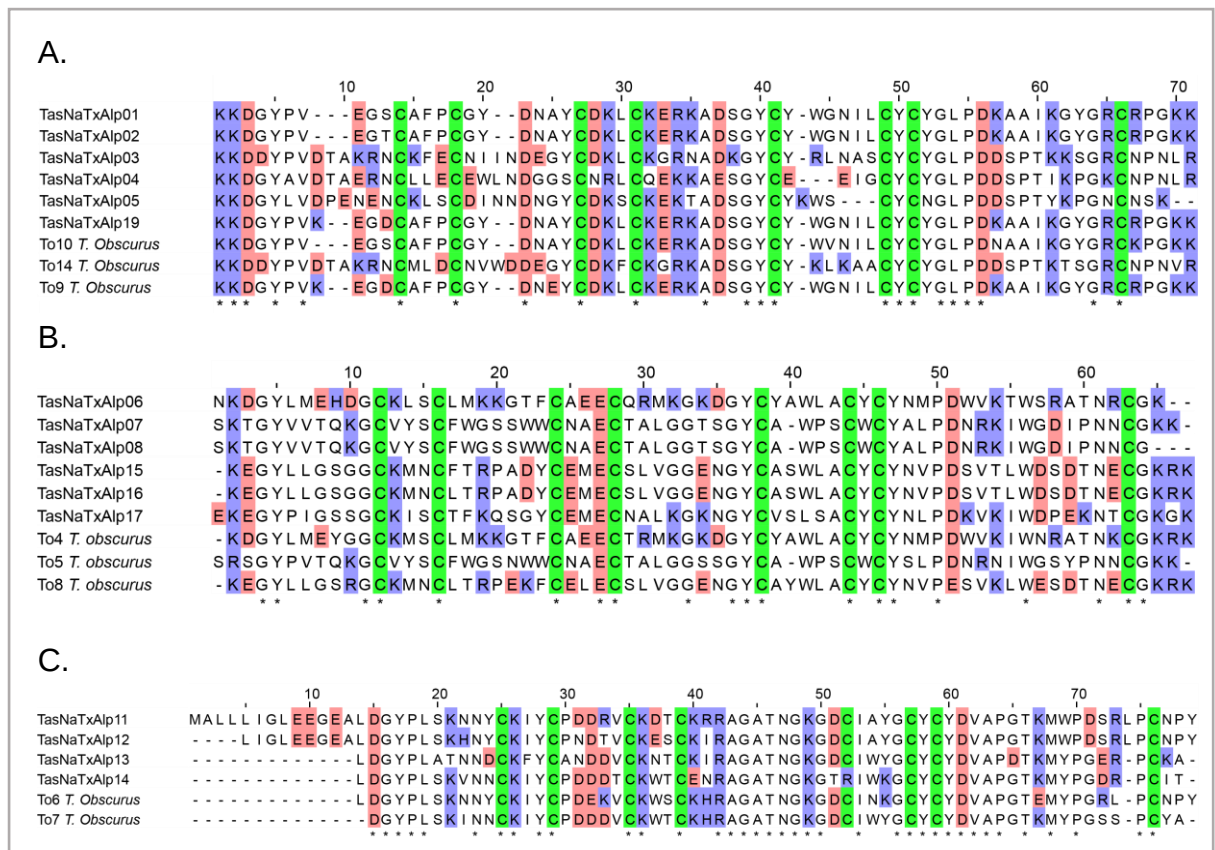


Figura 12: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los transcritos putativos que codifican α -NaScTx en el transcriptoma de *T. asthenes* con secuencias homólogas del NCBI. En todos los alineamientos se ha omitido el péptido señal. Los residuos de cisteína se resaltan en verde y los aminoácidos cargados positivamente y negativamente se resaltan en azul y rojo, respectivamente.

De todas las secuencias observadas en los alineamientos, únicamente se ha confirmado la actividad electrofisiológica de To4. Esta se evaluó con la técnica de “patch-clamp” en configuración whole-cell, en células HEK que expresaban los canales Nav1.1 - Nav1.6 y en células CHO que expresaban el canal Nav1.7. Se observó una disminución de la corriente máxima de Na⁺, siendo mayor esta disminución en los canales Nav1.1, seguida por la observada en los Nav1.7, Nav1.4 y Nav1.2, respectivamente. Este efecto fue dependiente de la dosis de To4 empleada. La disminución de la corriente máxima fue discreta en los Nav1.3, Nav1.5 and Nav1.6 (Duque et al. 2017). Estos autores también reportan un desplazamiento en la probabilidad de apertura hacia potenciales más negativos para los canales Nav1.1, empleando 500nM de To4 (Duque et al. 2017). El transcripto putativo TasNaTxAlp06 identificado en el presente estudio presenta una homología del 90.6% con la secuencia To4.

Tabla 1: Transcriptos de *T. asthenes* que codifican toxinas putativas tipo alfa que actúan sobre canales de Na⁺. En la secuencia de aminoácido el subrayado es: péptidos señal y en negrita: péptido maduro.

Nombre Transcripto	Secuencia de aminoácidos	Longitud peptido maduro (aa)	Descripción Función de homólogo	Organismo /BLASTN ID	% Homología
TasNaTxAlp01	<u>MNYLALIAVASLLTAGTES</u> KK DGY P VEGSCAFPCGYDNAYCDKLCKERKADSG YCYWGNILCYCYGLPDKAAIKGYGRCRPG KK	65	Precursor αNaScTxs	T. obscurus/ HE585231	95.294
TasNaTxAlp02	<u>MNYLALIAVASLLTAGMES</u> KK DGY P PVEGTCAFP CGYDNAYCDKLCKERKADS GYCYWGNILCYCYGLPDKAAIKGYGRCR GKK	65	Precursor αNaScTxs	T. obscurus/ HE585231	94.51
TasNaTxAlp03	<u>MNCLILIFVVFLA</u> FGVECK DDYPV DTAKRNCKFECNIINDEGYCDKLCKGRNA DKGYCYRLNASCYCYGLPDDSPTKKSGRC NPNLR	70	Precursor αNaScTxs	T. obscurus/ HE585237	88.848
TasNaTxAlp04	<u>MNCLMLIFVVFLA</u> FGVECK DDGYA VDTAERNCLLECEWLNDGGSCNRLCQEK KAESGYCEEIGCYCYGLPDDSPYKPGKCN PNLR	68	Precursor αNaScTxs	T. obscurus/ HE585237	81.784
TasNaTxAlp05	<u>MNCLILIFVVFLA</u> FGIECK DDGYLV DPENENCKLSCDINNDNGYCDKSCKEKTA DSGYCYKWSCYCNGLPDDSPYKPGKCN SK	66	Precursor αNaScTxs	T. obscurus/ HE585237	80.297
TasNaTxAlp06	<u>MKRFILEISCF</u> FLIDMVVECK NDGYL MEHDGCKLSCLMKKGTFCAEECQRMKG KDGICYAWLACYCYNMPDWWKTWSRA TNRCGK	65	Inhibe corriente de Na ⁺ sobre canales Nav1.1-Nav1.7	T. obscurus/ HE585227	90.588
TasNaTxAlp07	<u>MKAIIFFIGCLMLIDL</u> VAG SKTGYVV TQKGCYVSCFWGSSWWCNAECTALGGT SGYCAWPSCWCYALPDNRKIWDIPNN CGKK	65	Precursor αNaScTxs	T. obscurus/ HE585228	92.157
TasNaTxAlp08	MPLVITNFIFFHNYLVYRPF FGYLAGRST NTMARRSSPMFPLMLCIPHYTTRTSPRS NCIRSLFESPHIQF	63	Precursor αNaScTxs	T. obscurus/ HE585228	91.373
TasNaTxAlp09	<u>MKAIIFFIGCLMLIDL</u> VAG SKTGYVV TQKGCYVSCFWGSSWWCNAECTALGGT SGYCAWPSCWCYALPDNRKIWDIPNN CGKK	65	Precursor αNaScTxs	T. obscurus/ HE585228	91.085

Tabla 1: Continuación.

TasNaTxAlp10	<u>MKAIIFFIGCLVLTDLVAGSKTGYVV</u> TQKGCYVSCFWGSSWWCNAECTALGGT SGYCAWPSCWCYALPDNRKIWDIPNN CGKK	65	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585228	90.98
TasNaTxAlp11	MALLIGLEEALDGYPLSKNNYCKIYCP DDRVCKDTCKRRAGATNGKGDCAIYGCY CYDVAPGTMWPDRLPCNPY	79	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585229	86.22
TasNaTxAlp12	LIGLEEALDGYPLSKHNYCKIYCPNDTV CKESCKIRAGATNGKGDCAIYGCYCYDVA PGTKMWPDRLPCNPY	75	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585229	87.391
TasNaTxAlp13	<u>MPPPPQSHTIDKMSIFPIVLALLLI</u> <u>GLEEGEALDGYPLATNNDCKFYCANDD</u> VCKNTCKIRAGATNGKGDCAIYGCYCYD VAPDTKMYPGERPCKA	65	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585230	88.235
TasNaTxAlp14	<u>MSIFAILLALLLIGLDEGAALDGYPLS</u> KVNNCKIYCPDDDTCKWTCEENRAGATN GKGTRIWKGCYCYDVAPGTMYPGDRP CIT	64	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585230	90.598
TasNaTxAlp15	<u>MKRFVLFISCFFLIGMVVECKEGYLL</u> GSGGCKMNCFTRPADYCEMECSLVGGE NGYCASWLACYCYNVPDSVTLWDSDTN ECGKRK	66	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585231	93.462
TasNaTxAlp16	<u>MTRFVLFISCFFLIGMVVECKEGYLL</u> GSGGCKMNCLTRPADYCEMECSLVGGE NGYCASWLACYCYNVPDSVTLWDSDTN ECGKRK	66	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585231	93.462
TasNaTxAlp17	<u>MTRFVLFISCFFLIGMVVKCEKEGYP</u> IGSSGCKISCTFKQSGYCEMECNALKGKN GYCVSLSACYCYNLPDKVKIWDPEKNTCG KGK	67	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585231	78.03
TasNaTxAlp18	<u>MTRFVLFISCFFLIGMVVKCEKEGYP</u> IGSSGCKISCTFKQSGYCEMECNALKGKN GYCVSLSACYCYNLPDKVKIWDPEKNTCG KGK	67	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585231	78.03
TasNaTxAlp19	<u>MNYLALIAVASLLTAGTESKKDGYP</u> VKEGDCAFPCGYDNAYCDKLCKERKADS GYCYWGNILCYGLPDKAAIKGYGRCP GKK	66	Precursor α NaScTxs	T. obscurus/ HE585232	96.124

Las β -NaScTx comúnmente afectan la activación de los Na_v , induciendo una reducción en el pico de la amplitud de la I_{Na} , y la dependencia del voltaje de activación hacia potenciales de membrana más negativos que el respectivo control, lo que causa un incremento de potenciales espontáneos y repetitivos (Cordeiro et al. 2015; Duque et al. 2017). Las β -NaScTx también estuvieron altamente representadas en el estudio con un total de 13 transcriptos putativos (tabla 2), los cuales se agruparon en 4 contigs y 3 singlets.

En la figura 13 se muestran los alineamientos de los transcriptos de las β -NaScTx obtenidos para *T. asthenes*, con secuencias homólogas reportadas en el NCBI para diferentes especies de escorpiones (Borges et al. 2004; D'Suze et al. 2009; Guerrero-Vargas et al. 2012), se observa que en todas las secuencias se conserva el patrón de cisteínas que es igual a ocho y al igual que en las α -NaScTx probablemente formen cuatro puentes disulfuro. Además, la mayoría de los transcriptos putativos presentan residuos básicos en la región C-terminal o residuos con cadenas laterales con presencia de grupos aminos. En la tabla 2 se muestra que a excepción de TasNaTxBet10 todos los transcriptos presentaron péptido señal y por el contrario TasNaTxBet10 fue el único que presentó un propéptido de 20 residuos de aminoácidos, además la mayoría presentaron una longitud del ORF alrededor de 85 aa, menos TasNaTxBet07 y TasNaTxBet08 que presentaron 100 y 101 residuos respectivamente.

La figura 13-A está conformada por transcriptos con secuencias homólogas del esorpión *T. obscurus* y se presentan dos contig y un singlet (Guerrero-Vargas et al. 2012). El primero lo integran los transcriptos TasNaTxBet01 y TasNaTxBet02, que tienen homología con el precursor Tc48a, el cual inhibe casi por completo la I_{Na} en la línea celular F-11 (Batista et al. 2004) (tabla 2). El segundo contig es formado por TasNaTxBet04 y TasNaTxBet05, que comparten la misma secuencia de aminoácidos y son homólogos a To12, por lo que sólo se muestra TasNaTxBet04. El singlet denominado TasNaTxBet03 tiene homología con el precursor Tc49b, el cual inhibe casi por completo la I_{Na} en las células granulares del cerebelo de rata (Batista et al. 2002) (tabla 2).

La figura 13-B está conformada por un contig con TasNaTxBet06 y TasNaTxBet07 que son homólogos del precursor de la toxina Na1 del esorpión *T. discrepans* (D'Suze, Sandoval, and Sevcik 2015). El transcripto TasNaTxBet06 presentó un péptido señal de 19 residuos, mientras que para TasNaTxBet07 no fue detectado. El transcripto TasNaTxBet07 presenta codones de parada al inicio de la secuencia, sin embargo, esto puede deberse a la presencia de un propéptido que no fue detectado mediante el programa SpiderP o durante la construcción de la librería. Sin embargo, también se debe tener en cuenta el proceso de reclutamiento de toxinas en la historia del taxón y tener presente que en Eucariotas los codones de parada deben estar

acompañados de otras señales de terminación y en algunos casos estos pueden aparecer como consecuencia de economía informática. En el alineamiento se conserva el patrón de cisteínas, además presentan gran cantidad de aminoácidos conservados. También se observan variaciones en la composición de los residuos del C-terminal para las diferencias secuencias en el alineamiento.

En la figura 13-C se muestra el alineamiento del singlet TasNaTxBet08 con el precursor Tpa8 del escorpión *T. pachyurus* (Guerrero-Vargas et al. 2012). El precursor Tpa8 es el primer registro de una beta toxina clasificada como anti-insecto del Nuevo Mundo (Guerrero-Vargas et al. 2012) con la cual el transcripto TasNaTxBet08 presentó un porcentaje de homología del 88.8%. La especie *Leiurus quinquestriatus* Ehrenberg, 1928 de la familia Buthidae pertenece al Viejo Mundo, presenta gran número de estudios e incluso se ha aplicado la investigación de su secuencia Lqh IT1-b en el aprovechamiento y mejoramiento de insecticidas (Regev et al. 2003). El precursor IsomTx1 del escorpión *Isometrus vittatus* de Pakistan despolariza el axón aislado de cucaracha y aumenta la permeabilidad axonal de Na⁺ (Coronas et al. 2003). Por estas características se clasifica como una toxina anti-insectos.

En la figura 13-D el alineamiento está formado por dos contigs, el primero con los transcriptos TasNaTxBet09, TasNaTxBet10 y TasNaTxBet11 que resultaron homólogos con el precursor Tz1 de la especie *T. zulianus* González-Sponga, 1981. Se ha reportado que Tz1 induce un desplazamiento hacia potenciales más negativos en el umbral de activación de los canales Nav1.4, lo cual produciría actividad eléctrica espontanea durante el potencial de reposo de las fibras musculares (Borges et al. 2004). El segundo contig está formado por TasNaTxBet12 y TasNaTxBet13, los cuales resultaron homólogos al precursor Tz2 de *T. zulianus*. El codón correspondiente al último residuo en el mRNA de Tz2 no codifica un residuo de Gly que permite la amidación postraducciona (Borges et al. 2006). Borges y colaboradores sugirieron que esta modificación puede relacionarse con que Tz2 sea una toxina poco tóxica, lo cual se ha reportado para otras secuencias homólogas a ella. Esta similitud del C-terminal se visualiza en las secuencias de nuestros transcriptos.

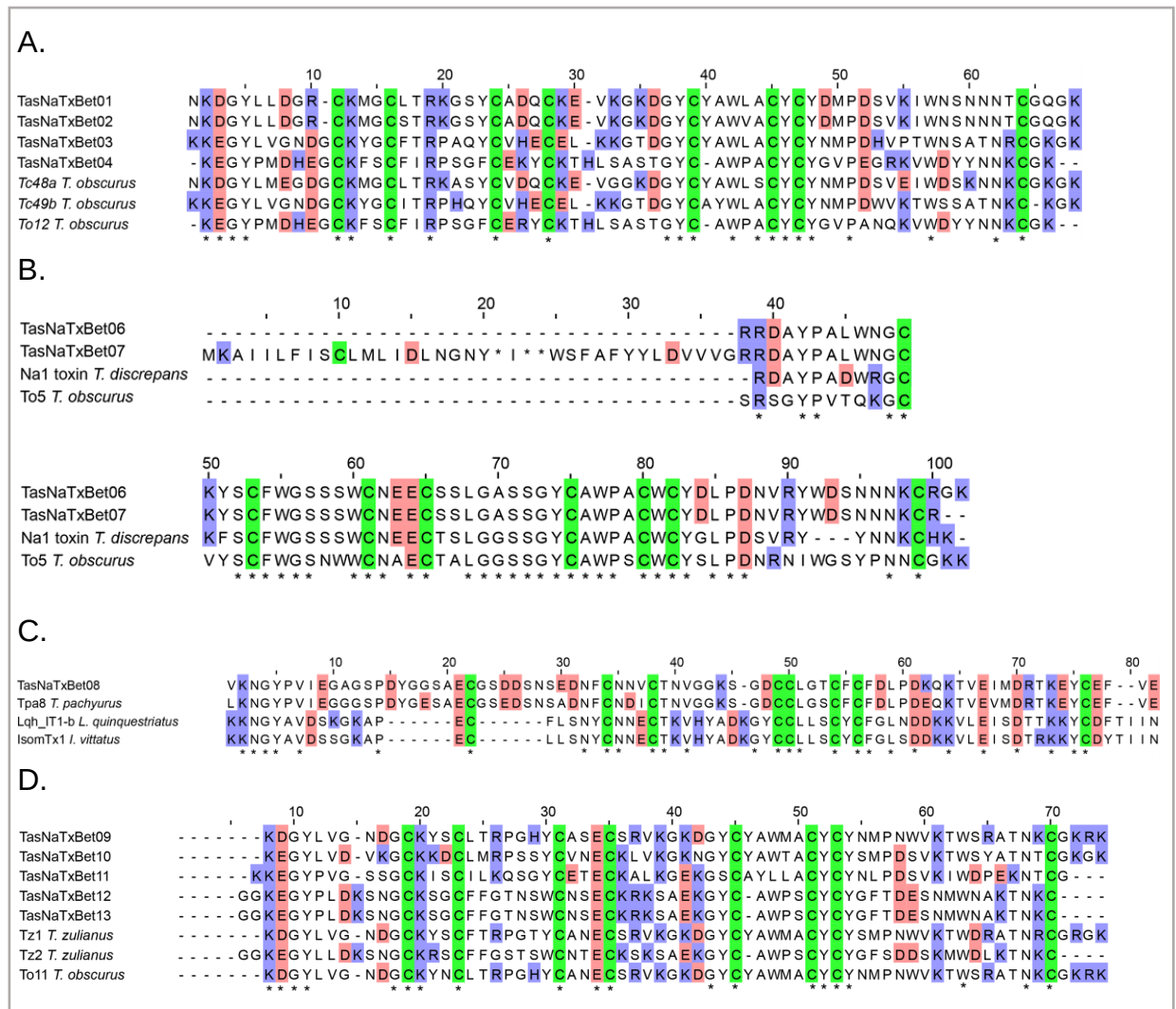


Figura 13: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los transcritos putativos que codifican β -NaScTx en el transcriptoma de *T. asthenes* con secuencias homólogas del NCBI. En todos los alineamientos se ha omitido el péptido señal. Los residuos de cisteína se resaltan en verde y los aminoácidos cargados positivamente y negativamente se resaltan en azul y rojo, respectivamente.

Tabla 2: Transcritos de *T. asthenes* que codifican toxinas putativas tipo beta que actúan sobre canales de Na⁺. En la secuencia de aminoácido el subrayado es: péptidos señal; sin cambio y más pequeña: propéptido y en negrita: péptido maduro.

Nombre Transcrito	Secuencia de aminoácidos	Longitud peptido maduro (aa)	Descripción de Función de homólogo	Organismo /BLASTN ID	% Homología
TasNaTxBet01	<u>MTRFVL</u> FISCLFLIGMVVKC NKDGYLLDGRCKMGCLTRKGSYC ADQCKEVKGKDGICYAWLACYCY DMPDSVKIWNSNNNTCGQGK	66	β-NaScTxs. Afecta la permeabilidad de Na ⁺ en las líneas de células F-11	T. obscurus/ HE585225	90.152
TasNaTxBet02	<u>MIRFVL</u> FISCLFLIGMVVKCN KDGYYLLDGRCKMGCTRKGSYCA DQCKEVKGKDGICYAWVACYCY DMPDSVKIWNSNNNTCGQGK	66	β-NaScTxs. Afecta la permeabilidad de Na ⁺ en las líneas de células F-11	T. obscurus/ HE585225	90.114
TasNaTxBet03	<u>MTRFVL</u> FISCFLLIGMIVECKK EGYLVGNDGCKYGCFTPAQYCV HECELKKGTDGYCYAWLACYCYN MPDHVPTWNSATNRCGK GK	67	β-NaScTxs a concentración de 100 nM elimina casi por completo corriente de Na ⁺ de células granulares de rata	T. obscurus/ HE585224	89.098
TasNaTxBet04	<u>MKRLIL</u> FICGFMIGVIVAKE GYPMDEHGCKFSCFIRPSGFCEKY CKTHLSASTGYCAWPACYCYGVP EGRKVWDYNNKCGK	64	Precursor de β-NaScTxs.	T. obscurus/ HE585235	94.444
TasNaTxBet05	<u>MKRLIL</u> FICGFMIGVIVAKE GYPMDEHGCKFSCFIRPSGFCEKY CKTHLSASTGYCAWPACYCYGVP EGRKVWDYNNKCGK	64	Precursor de β-NaScTxs.	T. obscurus/ HE585235	94.444
TasNaTxBet06	<u>MKAIL</u> FISCLMLIDVVVGRR DAYPALWNGCKYSCFWGSSSWC NEECSSLGASSGYCAWPACWCYD LPDNVRYWDSNNNKCRGK	65	Precursor de β-NaScTxs.	T. discrepans/ FN392277	86.475
TasNaTxBet07	<u>MKAIL</u> FISCLMLIDLNGNY* ***W SFAFYLDVVVGRRDAYPALWNG CKYSCFWGSSSWCNEECSSLGASS GYCAWPACWCYDLPDNVRYWD SNNNKCR	87	Precursor de β-NaScTxs.	T. discrepans/ FN392277	84.158
TasNaTxBet08	<u>MVK</u> SQMKLVIFFLFVSLIGV <u>ESV</u> KNGYPVIEGAGSPDYGGS CGSDDSNSEDNFCNNVCTNVGGK SGDCCLGTCFCFDLPDKQKTVEIM DRTKEYCEFE	79	Precursor de β-NaScTxs. Posible anti-insecto.	T. pachyurus/ HE585243	88.816
TasNaTxBet09	<u>MTRFVL</u> FISCLFLIGMVVECK DGYLVGNDGCKYSCLTRPGHYCA SECSRVKGKDGICYAWMACYCY NMPNWVKTWSRATNKCGKRK	66	β-NaScTxs. Cambia el umbral de activación de los canales NaV1.4	T. zulianus/ AY874060	90.113
TasNaTxBet10	<u>MKR</u> FVLISCFLLIGMIVECKE GYLV DVKGCKKDCLMRPSSYCVNECKL VKGKNGYCYAWTACYCYSMPDS VKTWSYATNTCGK GK	66	β-NaScTxs. Cambia el umbral de activación de los canales NaV1.4	T. zulianus/ AY874060	83.442
TasNaTxBet11	<u>MTRFVL</u> FISCFLLIGMVVKCK KEGYLVGSSGCKISCLKQSGYCET ECKALKGEKGSAYLLACYCYNLP DSVKIWDPEKNTCG	64	β-NaScTxs. Cambia el umbral de activación de los canales NaV1.4	T. zulianus/ AY874060	76.033
TasNaTxBet12	<u>MKEMILLISCLMLIEVVVG</u> GKEGYPLDKSNGCKSGCFFGTNS WCNSECKRKS AEGYCAWPSCYCY YGFTDESNMWNAKTNKC	64	Precursor de β-NaScTxs.	T. zulianus/ DQ075241	88.179
TasNaTxBet13	<u>MKEMILLISCLMLIAE</u> VVVG GGKEGYPLDKSNGCKSGCFFGTNS WCNSECKRKS AEGYCAWPSCYCY YGFTDESNMWNAKTNKC	65	Precursor de β-NaScTxs.	T. zulianus/ DQ075241	88.065

5.3.2. Toxinas moduladoras de canales de K⁺.

Los estudios en fisiología fueron cruciales para conocer el papel que juegan las toxinas de escorpiones en el mecanismo de acción de los canales celulares. La aplicación de las toxinas de escorpión para el estudio de los canales de K⁺ comenzó hace más de 35 años empleando el “clamp” de voltaje en el axón gigante de calamar. Se examinaron varios péptidos de escorpiones y se encontró la actividad de un polipéptido que disminuye específicamente la permeabilidad al K⁺ sin afectar la cinética de los canales (Carbone et al. 1982). Esta toxina fue el primer péptido corto aislado purificado del veneno del escorpión *Centruroides noxius* Wood, 1863, denominada noxiustoxina (Possani 1982).

En análisis transcriptómicos previos se ha evidenciado que las KScTx son componentes abundantes tanto en los venenos de especies Buthidae como no-Buthidae (Possani and Rodríguez de la Vega 2006; Deng et al. 2018). En el análisis transcriptómico de *T. asthenes* hemos identificado 21 transcritos putativos de KScTx, entre las cuales el 76% estuvieron relacionadas con secuencias de la especie *T. discrepans*. Se agruparon las posibles potasiotoxinas en 3 contigs que resultaron ser homólogos con secuencias descritas como α -KScTx y 2 singlets correspondientes a diferentes secuencias descritas como β -KScTx.

En los alineamientos de la Figura 14 se observan los transcritos homólogos a α -KScTx, estos presentan seis residuos de cisteína altamente conservados, lo cual indica que tendrían tres puentes disulfuro. En la tabla 4 se observa que todos los transcritos presentaron, en su secuencia, un péptido señal de entre 18-28 residuos, seguido de un ORF de longitud entre 59-68 aa. Las α -KScTx aisladas en estudios previos comparten en su mayoría una “diada” funcional que consiste de un residuo de lisina (K) y un residuo hidrofóbico; principalmente tirosina (Y), fenilalanina (F) o leucina (L), separados por una distancia de 6-7 Å (Cid-uribe et al. 2018). El residuo de Lys interactúa con los carbonilos de residuos ácidos presentes en el poro del canal, mientras que el aminoácido hidrofóbico interactúa con un clúster de residuos aromáticos en la región del poro (Banerjee et al. 2013).

En los alineamientos de *T. asthenes* de la Figuras 14 A-B se observa que la mayoría de los transcritos presentan estos residuos conservados, los cuales están señalados con una flecha, mostrando que el residuo hidrofóbico fue tirosina (Y). Aunque estos aminoácidos tienen un rol importante en la interacción con los canales de K⁺, se conoce que hay otros residuos que están presentes en el sitio de unión, que le otorgan selectividad a la toxina y aumentan su afinidad. Estos residuos varían en número, ubicación y naturaleza de una toxina a otra (Banerjee et al. 2013; Kuzmenkov et al. 2018).

Los transcritos putativos TaskTxAlp01, TaskTxAlp02, TaskTxAlp03 y TaskTxAlp04 presentados en la figura 14-A están alineados con varias toxinas, una de estas fue el precursor α -KTx 4.5 del escorpión *T. costatus*, presentando un porcentaje de homología entre 75-79%, esta toxina fue caracterizada como un bloqueador de canales de potasio (Diego-García et al. 2005). La segunda es la toxina α -KTx1.16, también denominada MeKTx11-1 del escorpión *Mesobuthus eupeus*, Koch, 1839 (Kuzmenkov et al. 2015), los transcritos presentaron en BlastN e-valores menores a E-0.7 y porcentajes de homología entre 40-64%. α -KTx1.16 ha sido de interés por su actividad en canales de mamíferos Kv1.2 y en menor proporción del canal Kv1.3, esto fue evaluado mediante la técnica de clamp de voltaje, expresando estos canales en oocitos de *Xenopus* (Kuzmenkov et al. 2018).

El contig de la figura 14-A además presentó homología con la toxina denominada charybdotoxina (CTX), también conocida como α -KTx1.13 del escorpión *Leiurus quinquestriatus*. Presentó en BlastP e-Valores menores de E-0.6 y porcentajes de homología entre 43-53%. La CTX ha sido importante para la ciencia pues se ha usado para modelar las interacciones ligando-receptor (unión de la toxina a los canales de K⁺) y ayudó a lograr una comprensión más profunda de la estructura y propiedades funcionales de los canales de K⁺ como se muestra en la figura 16 (Kuzmenkov et al. 2015).

CTX se ha usado para calcular la energía libre de unión con el canal Kv1.3 y con el canal Kv1.2 mediante cristalografía y simulaciones de dinámica molecular, para investigar el mecanismo y la energía de desunión entre la toxina y el canal (Khabiri et al. 2011). Igualmente, se ha demostrado mediante cristalografía la importancia del aminoácido Lys27 (señalado con una flecha en figura 14-A) en la afinidad de CTX por los canales Kv. Este residuo interactúa directamente en el filtro de selectividad con los iones que conducen la corriente de K⁺ (Banerjee et al. 2013). De los transcritos de *T. asthenes*, únicamente TaskTxAlp03 no presentó este residuo en la posición 27. Este transcrito a su vez presentó el menor porcentaje de homología con la CTX y también menor e-valor.

La figura 14-B presenta el alineamiento del contig conformado por los transcritos TaskTxAlp05, TaskTxAlp06, TaskTxAlp07, TaskTxAlp08, TaskTxAlp09, TaskTxAlp10, TaskTxAlp11, TaskTxAlp12 y TaskTxAlp13, los cuales resultaron homólogos al precursor Discrepin del escorpión *T. discrepans*, también llamado α -KTx15.6 (D'Suze et al. 2004, 2009) y al precursor α -KTx15.9 del escorpión *L. mucronatus*, el cual se adicionó en el alineamiento (Ruiming et al. 2010). Cabe señalar que TaskTxAlp05 y TaskTxAlp06 difieren entre ellos en su secuencia de nucleótidos, pero tienen igual secuencia de aminoácidos.

Mediante técnicas electrofisiológicas se determinó que los canales Kv4.3 son el blanco molecular de la toxina Discrepin, además que el residuo básico Lys13 (señalado con una flecha en la figura 14-B), que está localizado en la α -hélice de la toxina, es importante para bloquear estos canales de K⁺ (Picco et al. 2014). En nuestro estudio se puede observar que este residuo Lys13 está presente en dos transcriptos putativos TasKTxAlp05 y TasKTxAlp06, pudiendo favorecer un mecanismo de bloqueo similar en el canal Kv4.3. Otras investigaciones se han realizado generando mutantes de Discrepin para modelar estructuras de toxinas, dando soporte a la idea de que los residuos básicos mejoran la actividad bloqueadora de canales (Romeo et al. 2008).

La toxina α -KTx15.9 del escorpión *L. mucronatus* corresponde a un bloqueador de canales de K⁺, en el cual la ubicación de los residuos YP en el C-terminal parecen tener un papel importante bloqueando la actividad de canales de K⁺ tipo HERG (Huys et al. 2004). Estos residuos estuvieron presentes en los transcriptos TasKTxAlp05, TasKTxAlp06, TasKTxAlp08 y TasKTxAlp10. Únicamente el transcripto TasKTxAlp13 no presentó ninguna de las características mencionadas: ni la diada funcional y tampoco el residuo YP en el C-terminal.

El potencial farmacológico de las toxinas de escorpión de naturaleza básica (punto isoelectrico > 7) moduladoras de canales de K⁺ ha sido estudiado ampliamente (Kuzmenkov et al. 2015; Banerjee et al. 2013; D'Suze et al. 2004; Picco et al. 2014). Por el contrario, el potencial farmacológico de las toxinas de naturaleza acídica (punto isoelectrico < 7) moduladoras de canales de K⁺ ha sido menos estudiado (Chen et al. 2012). En la tabla 3 se observa que los transcriptos con asterisco estarían dentro de la clasificación de toxinas ácidas, la mayoría de estas se presentan en el alineamiento de la figura 14-C.

Tabla 3: Toxinas putativas moduladoras de canales de K⁺ tipo alfa con sus valores de punto isoelectrico (pI). Según la clasificación, las toxinas putativas marcadas con asterisco se clasificarían como secuencias de naturaleza acídica y las demás corresponderían a secuencias de naturaleza básica.

Transcripto putativo	Valor pI	Transcripto putativo	Valor pI
TasKTxAlp01	9.93	TasKTxAlp11	9.10
TasKTxAlp02	9.42	TasKTxAlp12	9.18
TasKTxAlp03	9.08	TasKTxAlp13	6.78*
TasKTxAlp04	9.77	TasKTxAlp14	6.43*
TasKTxAlp05	9.13	TasKTxAlp15	6.27*
TasKTxAlp06	9.13	TasKTxAlp16	6.27*
TasKTxAlp07	9.13	TasKTxAlp17	6.27*
TasKTxAlp08	9.08	TasKTxAlp18	8.83
TasKTxAlp09	9.1	TasKTxAlp19	8.83
TasKTxAlp10	8.87		

Los transcriptos TaskTxAlp14, TaskTxAlp15, TaskTxAlp16, TaskTxAlp17, TaskTxAlp18 y TaskTxAlp19 formaron un contig de homólogos al precursor α -KTx18.3 también denominado TdK3 de *T. discrepans* (D'Suze et al. 2009) y al precursor Tc32 de la subfamilia α -KTx18.1 del escorpión *T. obscurus* (Batista et al. 2002). Los transcriptos TaskTxAlp15, TaskTxAlp16 y TaskTxAlp17 difieren en su secuencia de nucleótidos, pero tienen igual secuencia de aminoácidos, al igual que los transcriptos TaskTxAlp18 y TaskTxAlp19, razón por la cual no se presentaron todos los transcriptos en el alineamiento que se observa en la figura 14-C.

La toxina Tc32 presenta afinidad específica por los canales K⁺ de los linfocitos T de humanos, teniendo una alta afinidad por canales Kv1.3 y en menor proporción por los canales Shaker B. Considerando su secuencia primaria única y su afinidad por los canales iónicos Kv1.3 y Shaker B, esta toxina se ha clasificado en una nueva subfamilia de péptidos específicos para los canales de K⁺ (Batista et al. 2002). En cuanto a su mecanismo de acción, se piensa que los residuos serina, fenilalanina y lisina señalados con una flecha en la figura 14-C deben tener un papel importante. En la toxina del escorpión *T. discrepans* estos residuos corresponden a fenilalanina y lisina y en la de *T. obscurus* residuos de serina y lisina. Estos mismos residuos se encuentran conservados en los transcriptos putativos mostrados en la figura 14C, con excepción de los transcriptos putativos TaskTxAlp18 y TaskTxAlp19, los cuales podrían presentar un mecanismo de acción diferente o diferir en sus blancos moleculares o ambas.

Empleando técnicas electrofisiológicas, se evidenció que la configuración de los residuos de naturaleza acídica Asp19 y Asp33 de la toxina BmKTX separados a una distancia de ~5 Å de un residuo de Lys, interactúan bloqueando canales Kv1.3 en linfocitos T de humanos (Han et al. 2008). Estos canales juegan un importante papel en la regulación del potencial de membrana de reposo y en la señalización por Ca⁺² (Chen et al. 2014). Algunos de los transcriptos de la figura 14-C presentan varios residuos de Lys a la misma distancia aproximada de residuos de Asp, lo que sugiere que probablemente presenten actividad como bloqueadores de canales de K⁺ en linfocitos T.

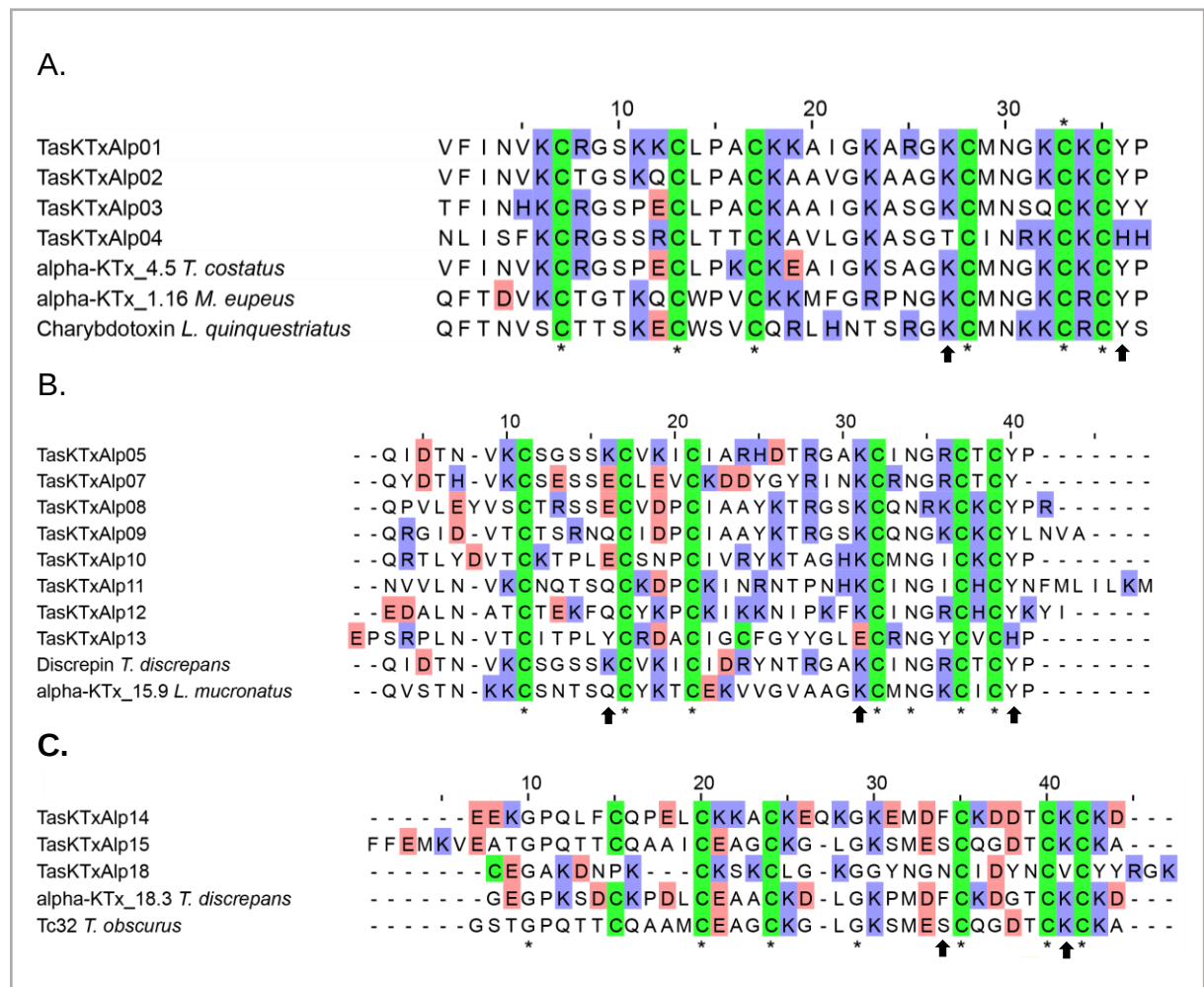


Figura 14: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los transcritos putativos que codifican α -KScTx en el transcriptoma de *T. asthenes* con secuencias homólogas del NCBI. En todos los alineamientos se ha omitido el péptido señal. Los residuos de cisteína se resaltan en verde y los aminoácidos cargados positivamente y negativamente se resaltan en azul y rojo, respectivamente.

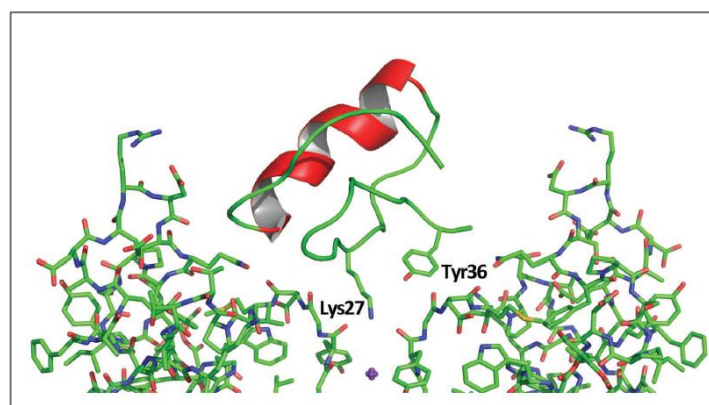


Figura 15. Estructura espacial del complejo de canales $K_v1.2$ - $K_v2.1$ con CTX, mostrando el residuo de Lys27 dentro del poro del canal y el residuo aromático Tyr36 de la diada funcional. Tomado de; (Kuzmenkov *et al.* 2015).

Tabla 4. Transcritos de *T. asthenes* que codifican toxinas putativas tipo alfa que actúan sobre canales de potasio. En la secuencia de aminoácido el subrayado es: péptidos señal y en negrita: péptido maduro.

Nombre Transcripto	Secuencia de aminoácidos	Longitud peptido maduro (aa)	Descripción de Función de homólogo	Organismo/ BLASTN ID	% Homología
TaskTxAlp01	<u>MKVYYYVILMVFILCSMVDLSQQ</u> VFINVKCRGSKKCLPACKKAIGKARGKC MNGKCKCYP	37	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales Kv1.2	<i>T. costatus</i> / AAW72455	78.924
TaskTxAlp02	<u>MKVYYYVILMVFILCSMVDLSQQ</u> VFINVKCTGSKQCLPACKAAVGKAAGK CMNGKCKCYP	37	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales Kv1.2	<i>T. costatus</i> / AAW72455	78.475
TaskTxAlp03	<u>MKVYYYVILMVFILCSMFDLSHPT</u> FINHKCRGSPECLPACKAAIGKASGKC MNSQCKCY	37	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales Kv1.2	<i>T. costatus</i> / AAW72455	78.919
TaskTxAlp04	<u>MKLVYVILMVFILCSMFDLSQQ</u> NLISFKCRGSSRLTCKAVLGKASGTCT NRKCKCHH	37	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales Kv1.2	<i>T. costatus</i> / AAW72455	75
TaskTxAlp05	<u>MKAIFYGMLMIFILFSICYISVDSQ</u> IDTNVVKSGSSKCVKICIARHDTGAKC INGRCTCYP	38	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61912	93.548
TaskTxAlp06	<u>MKTIFYSLIVFVLCSCMCYISVDS</u> QIDTNVVKSGSSKCVKICIARHDTGAKC CINGRCTCYP	38	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61912	90.86
TaskTxAlp07	<u>MKAIFYGMLMIFLLCSMCYISVD</u> SQYDTHVKCSSESECLEVKDDYGYRI NKCRNGRCTCY	37	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61912	84.492
TaskTxAlp08	<u>MKTIFYGILMIFVLCSCMCYISVDS</u> QPVLEYVSCTRSSECDPCIAAYKTRGS KCQNRKCKCYP	40	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61912	79.365
TaskTxAlp09	<u>MKAIFYGMLMIFILCSMCYISVHS</u> QRGIDVTCTSRNQCIDPCIAAYKTRGSK CQNGKCKCYLNVA	41	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61912	76.63
TaskTxAlp10	<u>MKAIFYGILMIFVLCSCMCYISVDS</u> QRTLYDVTCKTPLECSNPICVRYKTAGH KCMNGICKCYP	39	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61912	75
TaskTxAlp11	<u>MKAIFYGILMIFVLCSCMCYISVDS</u> NVVLNVKCNQTSQCKDPCKINRNTPN HKCINGICHCHYNFMLILKM	45	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61912	77.049
TaskTxAlp12	<u>MKAIFYGMLVIFVLCSCMCYISVH</u> SEDALNATCTEKFCYKPKIKKNIPKF KCINGRCHCYKI	40	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61912	75
TaskTxAlp13	<u>MRAFYSMILIFVLCSCMCYISVHSE</u> PSRPLNVTCITPLYCRDACIGCFGYGLE CRNGYCVCHP	40	α -KScTxs. Bloqueador irreversible de canales Kv4.3	<i>T. discrepans</i> / CAY61913	87.5
TaskTxAlp14	<u>MHESGVAFILISMVLINSIFETTV</u> EAEKGPQLFCQPELCKKACKEQKGKE MDFCDDTCKCKD	38	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales hKv1.3 y ShakerB	<i>T. discrepans</i> / CAY61914	80.513
TaskTxAlp15	<u>MHFTGIVLILISMALIDSFEMKVE</u> ATGPQTTCQAAICEAGCKGLGKSMESC QGDTCCKA	43	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales hKv1.3 y ShakerB	<i>T. discrepans</i> / CAY61914	73.913
TaskTxAlp16	<u>MHFTGIVLILISMALIDSFEMKVE</u> ATGPQTTCQAAICEAGCKGLGKSMESC QGDTCCKA	43	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales hKv1.3 y ShakerB	<i>T. discrepans</i> / CAY61914	73.37
TaskTxAlp17	<u>MHFTGIVLILISMALIDSFEMKVE</u> ATGPQTTCQAAICEAGCKGLGKSMESC QGDTCCKA	43	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales hKv1.3 y ShakerB	<i>T. discrepans</i> / CAY61914	73.37
TaskTxAlp18	<u>MHESGVVLILISMILINSIFFDMK</u> VEACEGAKDNPKCKSKCLGGGYNG NCIDYNVCYYRGK	36	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales hKv1.3 y ShakerB	<i>T. discrepans</i> / CAY61914	82.292
TaskTxAlp19	<u>MHESGVVLILISMILINSIFFDMK</u> VEACEGAKDNPKCKSKCLGGGYNG NCIDYNVCYYRGK	36	Precursor α -KScTxs. Bloqueador de canales hKv1.3 y ShakerB	<i>T. discrepans</i> / CAY61914	82.292

Se encontraron dos transcritos putativos homólogos a secuencias de la familia β -KScTxn. Estos transcritos putativos presentan una longitud de entre 59-75 residuos de aminoácidos y contienen seis cisteínas, las cuales formarían tres puentes disulfuro (tabla 5). Presentan dos estructuras dominantes; una alfa-hélice en el N-terminal y un C-terminal rico en cisteínas, con una estructura consenso de motivo $CS_{\alpha/\beta}$ (Diego-García et al. 2007).

El transcripto putativo TaskTxBet01 presentó alta homología con el precursor KIK, también conocido como Beta-Ktxn de la especie *T. discrepans*, (figura 16-A) (Diego-García et al. 2008) y con el precursor AaTXK β de la especie *Androctonus australis*, Linnaeus (1758) (Legros et al. 1998). Se han reportado diferentes variantes de esta última toxina, siendo la mayoría de ellas reconocidas como bloqueadoras de varios canales de K⁺ (Legros et al. 1998), sin embargo, se ha identificado una variante que no presenta el residuo de Lys en el N-terminal y que es activadora de los canales K_v7.4 (Landoulsi et al. 2013). En el alineamiento con BlastN el transcripto putativo TaskTxBet01, mostró que este también carece del residuo de Lys en su N-terminal, indicando un posible papel activador de los canales K_v7.4.

Por otro lado el transcripto TaskTxBet02 presentó homología con el precursor KIK, también referenciado como Beta-Ktxn de la especie *T. trivittatus* (figura 12-B) (Diego-García et al. 2007). El transcripto putativo TaskTxBet02 se debe a una secuencia parcial, por lo que es necesario continuar con la búsqueda para encontrar la secuencia completa de la especie *T. asthenes*. A pesar que estas toxinas están presentes en varias de las especies de *Tityus* y de otras especies de la familia Buthidae y Scorpionidae su función biológica no es ampliamente estudiada, por lo que han sido considerados “péptidos huérfanos” (Diego-García et al. 2007).

El precursor KIK de la especie *T. stigmurus* inhibe las corrientes de K⁺ en los canales K_v1.1, K_v1.2 y K_v1.3, sin embargo, los ensayos realizados con el precursor KIK aislado de *T. trivittatus* no mostraron actividad sobre ninguno de estos canales, por lo que la función de varias de estas toxinas sigue siendo pobremente caracterizada, pese a esto y considerando la ubicuidad de esta toxinas en las especies del género *Tityus* (Diego-García et al. 2007; Diego-García et al. 2008), se sugiere que ellas deben tener un importante papel en la biología del veneno.

Tabla 5: Transcritos de *T. asthenes* que codifican toxinas putativas tipo beta que actúan sobre canales de potasio. En la secuencia de aminoácido el subrayado es: péptidos señal y en negrita: péptido maduro.

Nombre Transcrito	Secuencia de aminoácidos	Longitud peptido maduro (aa)	Descripción de Función de homólogo	Organismo/ BLASTN ID	% Homología
TasKTxBet01	<u>MERKLALLLLGMITLASCGLRE</u> KHVQSLVSMIPDETLRNILKAVVHKV AKTQFGCPAYGGYCDNHQCQDIEKHE GKCHGFKCKCEKS	68	Precursor de β -KScTx	T. discrepans/ ABE98263	92.051
TasKTxBet02	MRKNHHLRPQFFIDSTRERARRQADR DDSN	25	Precursor de β -KScTx	T. trivittatus/ EU089740	68.8

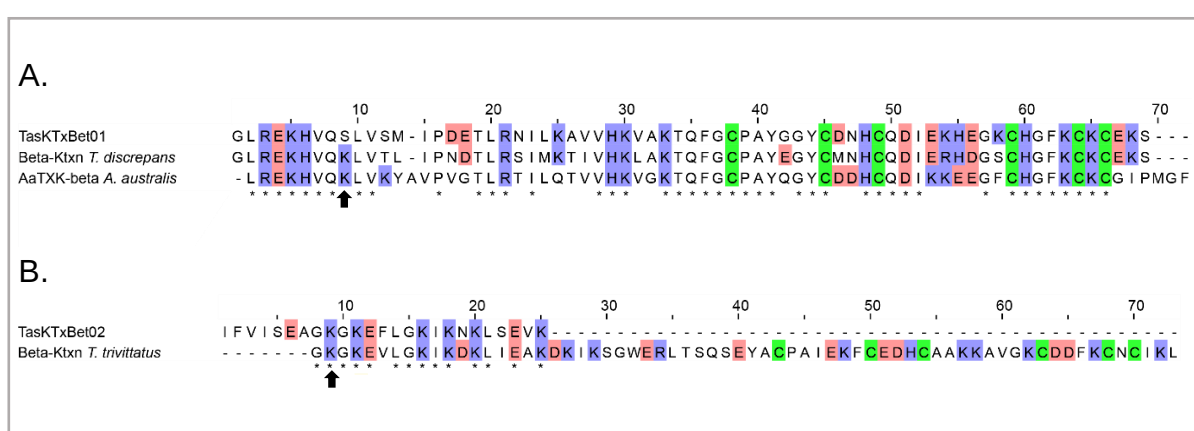


Figura 16. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los transcritos putativos que codifican β -KScTx en el transcriptoma de *T. asthenes* con secuencias homólogas del NCBI. En todos los alineamientos se ha omitido el péptido señal. Los residuos de cisteína se resaltan en verde y los aminoácidos cargados positivamente y negativamente se resaltan en azul y rojo, respectivamente.

Al hacer una comparación de las homologías entre las secuencias de los transcritos putativos hallados en este trabajo para las NaScTx y la KScTx, se puede discernir que las secuencias de las KTx han alcanzado un grado mayor de estabilidad coevolutiva entre predador-presa, ya que la conservación de los motivos y dominios de los peptidos en esas toxinas muestran un mayor grado de conservación. Este hallazgo debe ser validado en estudios posteriores de filogenia comparativa aplicando metodos de parsimonia y reloj molecular asociados a análisis fisiopatológicos en biomodelos, con el fin de establecer la importancia del consenso secuencial de las KTx.

5.4. Test de Irwin con veneno entero de *Tityus asthenes* en modelo murino.

Se empleó el test de Irwin para evaluar el efecto neurotóxico del veneno de *T. asthenes* en mamíferos ya que los estudios de toxicidad indican que se debe iniciar con una fase observacional. Pese a que la evaluación del test de Irwin implica un cierto grado de subjetividad, al hacer las observaciones de forma sistemática se pudo obtener información relevante sobre los signos que presentaron los ratones (n=5) con una dosis de 6,1 mg de veneno/kg ratón por vía IP, equivalente a la DL50 reportada por Gómez y colaboradores (2010). No se conoce cuál es el volumen o cantidad promedio de veneno inyectado por el escorpión *T. asthenes* durante una picadura accidental o a sus presas, sin embargo, hemos estimado que el peso promedio de veneno entero extraído por individuo mediante estimulación eléctrica del telson es de 6,41 mg.

En la figura 17 se muestran las alteraciones en 12 características evaluadas que se observaron a los 15, 30 y 60 minutos después de la inyección intraperitoneal del veneno de *T. asthenes*. Se grafica la frecuencia absoluta (escala del lado izquierdo) y el porcentaje de ratones afectados para cada variable (escala del lado derecho). A los 15 minutos se observó que 100% de los ratones presentaron diarrea, piloerección y un comportamiento más pasivo de lo normal, un 80% mostró ataxia y fasciculaciones (especialmente en las patas anteriores), un 60% mostró temblores finos en el cuerpo y parálisis muscular, un 40% pelaje mojado y sialorrea y un 20% bradipnea. No hubo disnea ni pérdida del reflejo corneal.

A los 30 minutos algunos signos decrecieron y otros aumentaron. El porcentaje de ratones con diarrea cayó a 0% y la piloerección a un 60%, mientras que el comportamiento pasivo se mantuvo en un 100% de los animales. La ataxia y las fasciculaciones se siguieron presentando en un 80% de los biomodelos, mientras que la parálisis muscular y la bradipnea aumentaron en frecuencia, presentándose ahora en un 80% de los ratones. A este tiempo el pelaje mojado y la piloerección estuvieron presentes en un 60% de los animales, y se presentó disnea en un 40% de ellos. A los 30 minutos no se observó sialorrea, ni pérdida del reflejo corneal.

A los 60 minutos de observación se muestra que hubo un 100% de animales con comportamiento pasivo, parálisis muscular, bradipnea, disnea y pérdida del reflejo corneal. 80% mostró ataxia, fasciculaciones y pelaje mojado. Un 60% temblores finos en el cuerpo, un 40% piloerección y un 20% de diarrea. A este tiempo no se observó sialorrea.

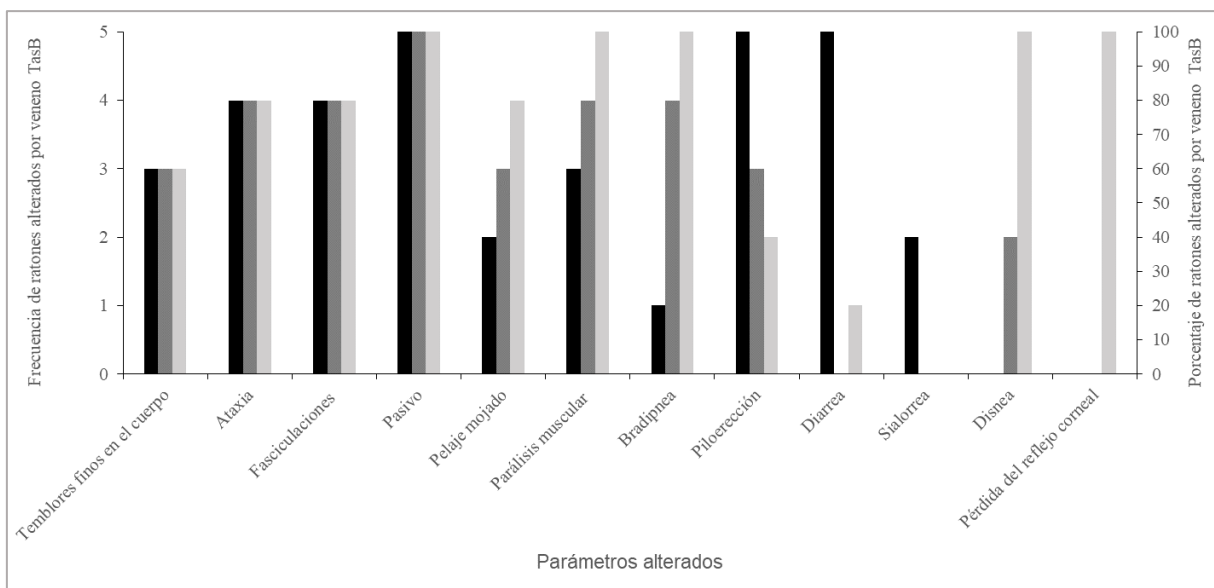


Figura 17: Test de Irwin mostrando la frecuencia absoluta y el porcentaje de ratones (n=5) que presentaron alteraciones fisiológicas o en su comportamiento, luego de la inyección IP de 6,1 mg de veneno/kg ratón del veneno de *T. asthenes*. Tiempos de observación: barra negra: 15 minutos, barra gris oscuro: 30 minutos y barra gris claro: 60 minutos.

Los signos asociados a un incremento de las respuestas adrenérgicas no se pueden observar, ya que infortunadamente el test de Irwin no permite hacer un seguimiento de los signos cardiovasculares, por lo que no fue posible hacer un mejor seguimiento a los efectos sobre este sistema simpático. Sin embargo, llama la atención que en ningún momento se observó agitación, ni se observaron convulsiones y más bien por el contrario todos los biomodelos tuvieron tendencia a la pasividad, lo cual indicaría un posible predominio del efecto colinérgico. Sin embargo, los efectos tardíos observados también pueden ser consecuencia de un posible efecto adrenérgico.

Con respecto a la afectación de los sistemas sensorial y motor somático la ataxia periférica y las fasciculaciones se observaron desde el principio en la mayoría de los animales y su alteración se mantuvo constante hasta los 60 minutos de observación. Con respecto a este sistema somático, la parálisis muscular y la pérdida del reflejo corneal fueron en aumento en la medida que aumento el tiempo de exposición al veneno. La alteración tan frecuente en este último signo a los 60 minutos de exposición al veneno podría indicar la pérdida de conciencia, la cual podría ser consecuencia de importantes trastornos cardiovasculares (a los cuales no se les hizo seguimiento), combinados con los trastornos respiratorios relacionados con bradipnea y disnea, que aumentaron en frecuencia con el aumento de la exposición al veneno.

Tabla 6: Cambios fisiológicos y comportamentales observados en porcentajes de ratones (n=5) durante el test de Irwin. Registros en un grupo control (vehículo PBS inyectado IP) y un grupo experimental (dosis igual a 6,1 mg de veneno/kg ratón inyectada IP) con veneno de *T. asthenes* de Buenaventura.

Parámetro alterado	Observaciones	Ratones control (%)	Ratones con dosis a los 15 min	Ratones con dosis a los 30 min	Ratones con dosis a los 60 min
Pasivo	Reducción en la actividad del animal (hipoactividad)	0	100*	100	100
Piloerección	Leve erección del pelo, principalmente en el lomo.	0	100*	60	40
Sialorrea	Exceso en la secreción de saliva	0	40*	0	0
Ataxia	Movimientos descoordinados y desbalance del cuerpo	0	80	80*	80
Pelaje mojado	Presenta su pelaje mojado sin estar activos.	0	40	60*	80
Parálisis muscular	Parálisis flácida en la cola y extremidades posteriores	0	60	80	100
Fasciculaciones	Pequeñas e involuntarias contracciones musculares	0	80	80	80
Bradipnea	Reducción en la frecuencia respiratoria	0	20	80	100
Disnea	Dificultad respiratoria que se traduce en falta de aire	0	0	40	100
Temblores finos	En las extremidades anteriores	0	60	60	60
Diarrea	Exceso en la defecación de los animales con consistencia líquida	0	100	0	20
Pérdida del reflejo corneal	Disminución en la reacción del parpado	0	0	0	100
Taquicardia	Incremento de la frecuencia cardíaca	NA	NA	NA*	NA
Lagrimo	Secreción continua de lágrimas	0	0	0*	0
Cianosis	Coloración azul de la piel y de las mucosas	0	0	0	0*
Taquipnea	Aceleración del ritmo respiratorio.	0	0	0	0*
Muerte	Cese de sus actividades fisiológicas	0	0	0	0*

En asterisco (*) se indican los parámetros alterados reportados por Gómez y colaboradores (2010) para la misma especie en la localidad de Mutatá, Colombia. NA (no aplica) indica parámetro que no fue medido en nuestra investigación.

El veneno de los escorpiones es una secreción apocrina compuesta de proteínas y péptidos de bajo peso molecular que ejercen su acción sobre canales iónicos dependientes de voltaje de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} , aumentando la excitabilidad eléctrica celular y causando liberación de neurotransmisores (catecolaminas y acetilcolina) en las terminaciones postganglionares causando efectos locales y sistémicos que pueden poner en peligro la vida de los humanos (Gomes et al. 2002). Cabe señalar que la gravedad del accidente escorpiónico depende de varios factores, entre los que se destacan la especie, el tamaño del escorpión, la cantidad de veneno inoculado, la sensibilidad del paciente al veneno, el lugar de la picadura, además del peso corporal del individuo, siendo más vulnerables los niños, las mujeres gestantes y los ancianos (Chippaux 2012).

Se considera que en los humanos la severidad del envenenamiento se debe principalmente a las α -NaScTx que se unen al sitio receptor 4 en los Na_v , inhibiendo la inactivación de estos canales (Cupo, 2015). Así mismo, las β -NaScTx contribuyen uniéndose al sitio 3 de los Na_v , aumentando su activación por el desplazamiento de su curva de activación hacia potenciales más negativos (Cupo, 2015). De otro lado la mayoría de las KScTx bloquean varios tipos de canales de K^+ (Cupo, 2015). Estos efectos sobre los canales de Na^+ y K^+ son sinérgicos y causan despolarización prolongada e intensa de los nervios periféricos, toda vez que se considera que estas toxinas no atraviesan la barrera hemato-encefálica (Cupo 2015). Esto a su vez induce liberación de acetilcolina, norepinefrina y epinefrina desde los terminales parasimpáticos y simpáticos, respectivamente (Isbister & Bawaskar, 2014; Cupo, 2015). También se presentan importantes efectos somatosensoriales y motores somáticos debido a la activación de los nervios somáticos periféricos (Isbister & Bawaskar, 2014; Cupo, 2015).

Las manifestaciones clínicas más tempranas son debidas a efectos colinérgicos y adrenérgicos. La liberación de acetilcolina induce miosis, bradicardia, arritmias cardíacas, hipotensión arterial, aumento de las secreciones lacrimales, salivares, nasales, gástricas, pancreáticas y bronquiales. Así mismo, contribuye a la diaforesis, piloerección, temblores y espasmos musculares, y aumento de los niveles de amilasa sérica (Isbister & Bawaskar, 2014; Cupo, 2015). La liberación de catecolaminas induce midriasis, arritmias cardíacas, taquicardia, hipertensión arterial, edema pulmonar agudo, falla cardíaca y choque. También puede inducir hiperglicemia, leucocitosis e hipocalemia (Isbister & Bawaskar, 2014; Cupo, 2015). Los principales efectos neurológicos de origen periférico son actividad muscular descoordinada, movimientos oculomotores anormales, trastornos visuales, fasciculaciones y espasmos en la cara, la lengua y las extremidades. Estos trastornos musculares pueden contribuir de manera importante al compromiso respiratorio observado (Isbister and Bawaskar 2014).

Cabe resaltar, que los efectos más graves que se presentaron a los 60 minutos de observación, fueron, bradipnea y disnea, fasciculaciones fuertes especialmente en la cara y el abdomen, pérdida de sensibilidad y movilidad ante estímulos, sin embargo, pese a esto ninguno de los ratones murió con la dosis reportada como DL50 para la población de *T. asthenes* de Mutatá-Antioquia (Gómez et al. 2010). Por el contrario, como se muestra en la tabla 6, indicando con asterisco, las características reportadas por Gómez y colaboradores (2010) cianosis y taquipnea se presentaron justo antes de la muerte, características que no fueron observadas en nuestro estudio con el veneno de *T. Asthenes* de la localidad de Buenaventura. Lo anterior permite sugerir que el veneno de *T. asthenes* presentaría una DL50 por encima de la reportada para la población de Mutatá (Antioquia).

Estos hallazgos confirmarían la variedad de componentes que se presentan en los venenos de poblaciones de escorpiones de la misma especie, como ya ha sido previamente reportado en la literatura (Abdel-Rahman et al. 2010; F. Oliveira et al. 2013; Rodríguez-Ravelo et al. 2013; Pucca et al. 2014; Pardal et al. 2014). Hay varias teorías que respaldan este hecho: (1) una es que la alta diversidad de toxinas a nivel intraespecífico es debido a que los escorpiones evolucionan para adaptarse a nuevos ambientes alterando la estructura primaria y abundancia de sus péptidos y proteínas (Oliveira et al. 2013), y (2) otra es que estos procesos durante el envenenamiento se han desarrollado en respuesta a la presión de selección en la interacción predador-presa (Housley et al. 2017).

6. CONCLUSIONES

El escorpión *T. asthenes* con distribución en el bosques pluvial del municipio de Buenaventura, es una especie arbórea, puede observarse en el tronco y hojas de los árboles y no en el suelo como otras especies de escorpiones. Esta información es relevante para que los habitantes de esta zona puedan evitar accidentes por escorpionismo, por lo que es importante conocer la diversidad y ecología de las especies de nuestro país.

Por primera vez se muestran los resultados del transcriptoma de la glándula de veneno del escorpión *T. asthenes*, la cual está conformada por 44047 transcriptos. De los cuales se anotaron las funciones de 218 transcriptos putativos para la especie, entre los que se destacan 54 nuevas secuencias de peptidos putativos nunca antes reportadas en las bases de datos de genes del mundo. De las cuales 32 son nuevas secuencias de toxinas putativas para canales de sodio, 21 para canales de potasio, además de una secuencia potenciadora de bradiquinina la cual presentó la mayor cantidad de reads en el conteo.

La importancia de estudios de transcriptómica es que abre un sin número de posibilidades a nuevos descubrimientos, en nuestro caso es importante en un futuro realizar estudios de proteómica de secuencias de interés para conocer la acción de proteínas y péptidos del veneno de *T. asthenes* principalmente su acción sobre canales iónicos. Además esta investigación sirve de base para búsqueda de utilidades en los campos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades

Las sodiotoxinas putativas encontradas para *T. asthenes*, presentaron una longitud promedio del ORF de 67 residuos de aminoácidos y fueron homólogas a toxinas clasificadas como anti-insecto y anti-mamífero. En mamífero se anotó la función sobre canales Nav1.4 de músculo esquelético de rata, además canales Nav1.7 y en humanos fue descrito su efecto en canales Nav1.1-1.7.

Las α -KScTx putativas para *T. asthenes*, presentaron una longitud promedio del ORF de 39 residuos de aminoácidos y fueron homólogas a toxinas reportadas en la literatura como bloqueadoras de canales de potasio en mamífero como Kv1.2, Kv1.3, Kv4.3, ShakerB y canales HERG. Esto fue evaluado en células del cerebelo de ratas, en linfocitos T de humanos, entre otros.

Los transcriptos putativos de sodiotoxinas de *T. asthenes* fueron homólogos con toxinas presentes principalmente en el escorpión *T. obscurus* y en menor proporción de *T. pachyurus*, *T. discrepans* y *T. zulianus*, los cuales presentan

una distribución geográfica en la región amazónica o hacia el norte de esta. Se há evidenciado una relación filogenética entre estas especies, lo cual explica que las barreras geográficas y medioambientales no solo contribuyen con procesos de especiación para el género, sino que además se ve reflejada en la diversidad de componentes del veneno de escorpiones.

Con el veneno entero de la población de *T. asthenes* del municipio de Buenaventura, Valle, no se presentaron muertes en ninguno de los modelos murinos evaluados con la DL50 reportada para la población de Mutatá, Antioquia, además durante el test de Irwin se observaron diferencias en las respuestas fisiológicas del envenenamiento para las dos poblaciones. Por lo que se evidencia que las variaciones en la diversidad de péptidos no solo se ve reflejada a nivel interespecífico para el género *Tityus*, si no además a nivel intraespecífico para poblaciones de *T. asthenes*.

Se evidenciaron efectos neurotóxicos en los ratones evaluados mediante el test de Irwin, con el veneno entero del escorpión *T. asthenes* de Buenaventura. Esto confirma que neurotoxinas encontradas en el transcriptoma están siendo traducidas en péptidos en el veneno entero del escorpión y se recomiendan ser analizadas en un futuro por técnicas de proteómica, para conocer específicamente cuales de estas son las responsables de dichos efectos.

7. LITERATURA CITADA

- Abdel-Rahman, M, M A Omran, I M Abdel-Nabi, O Nassier, and B J Schemerhorn. 2010. "Neurotoxic and Cytotoxic Effects of Venom from Different Populations of the Egyptian Scorpion *Maurus Palmatus*." *Toxicon* 55: 298–306.
- Abdel-rahman, Mohamed A, Veronica Quintero-Herna, and Lourival D Possani. 2016. "Scorpion Venom Gland Transcriptomics and Proteomics: An Overview." In *Venom Genomics and Proteomics*, 105–24. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6416-3>.
- Almaaytah, Ammar, and Qosay Albalas. 2014. "Scorpion Venom Peptides with No Disulfide Bridges: A Review." *Peptides* 51: 35–45.
- Almeida, Diego D, Katia C Scortecci, Leonardo S Kobashi, Lucymara F Agnez-lima, and Silvia R B Medeiros. 2012. "Profiling the Resting Venom Gland of the Scorpion *Tityus Stigmurus* through a Transcriptomic Survey Profiling the Resting Venom Gland of the Scorpion *Tityus Stigmurus* through a Transcriptomic Survey." *BMC Genomics* 13 (362): 2–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-362>.
- Alvarenga, Érika R, Thaís M Mendes, Bárbara F Magalhães, Flávia F Siqueira, Arthur E Dantas, Tatiana M Barroca, Carolina C Horta, and Evanguedes Kalapothakis. 2012. "Transcriptome Analysis of the *Tityus Serrulatus* Scorpion Venom Gland." *Open Journal of Genetics* 2: 210–20.
- Avellaneda, Dora. 2011. "EVALUACIÓN EXPERIMENTAL EN ROEDORES, DE LA TOXICIDAD DE LA PROCAÍNA EN ALGUNOS ESQUEMAS DE UTILIZACIÓN COMO NEURAL TERAPÉUTICO." Universidad Nacional de Colombia.
- Banerjee, Anirban, Alice Lee, Ernest Campbell, and Roderick Mackinnon. 2013. "Structure of a Pore-Blocking Toxin in Complex with a Eukaryotic Voltage-Dependent K + Channel." *Biophysics and Structural Biology | Neuroscience* 2: 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.00594>.
- Baradaran, Masoumeh, Amir Jalali, Maryam Naderi-soorki, Mahmoud Jokar, and Hamid Galehdari. 2018. "First Transcriptome Analysis of Iranian Scorpion , *Mesobuthus Eupeus* Venom Gland." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 17 (4): 1488–1502.
- Batista, Cesar V F, Luis del Pozo, Fernando Z Zamudio, Sandra Contreras, Baltazar Becerril, Enzo Wanke, and Lourival D Possani. 2004. "Proteomics of the Venom from the Amazonian Scorpion *Tityus Cambridgei* and the Role of Prolines on Mass Spectrometry Analysis of Toxins." *Journal of Chromatography* 803: 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.002>.
- Batista, Cesar V F, Fernando Z Zamudio, Sylvia Lucas, Jay W Fox, Andrea Frau, Gianfranco Prestipino, and Lourival D Possani. 2002. "Scorpion Toxins from *Tityus Cambridgei* That Affect Na Channels." *Toxicon* 40: 557–62.
- Benkhadir, K, Riadh Kharrat, Amor Cestèle, Sandrine Mosbah, Hervé Rochat, Mohamed El Ayeub, and Habib Karoui. 2004. "Molecular Cloning and Functional Expression of the Alpha-Scorpion Toxin BotIII: Pivotal Role of the C-Terminal Region for Its Interaction with Voltage-Dependent Sodium Channels." *Peptides* 25 (2): 151–61.

- Borges, A, M J Alfonzo, C C Garcia, N J Winandb, E Leipold, and Stefan H Heinemann. 2004. "Isolation , Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel b -Toxin from the Venezuelan Scorpion, Tityus Zulianus." *Toxicon* 43: 671–84. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.02.022>.
- Borges, A, R. J Miranda, and J. M Pascale. 2012. "Scorpionism in Central America, with Special Reference to the Case of Panamá." *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 18 (2): 130–43.
- Borges, Adolfo, Eldredge Bermingham, Nimiadina Herrera, Marcelo J Alfonzo, and Oris I Sanjur. 2010. "Toxicon Molecular Systematics of the Neotropical Scorpion Genus Tityus (Buthidae): The Historical Biogeography and Venom Antigenic Diversity of Toxic Venezuelan Species Q" 55: 436–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.011>.
- Borges, Adolfo, Carmen C Garcia, Elizabeth Lugo, Marcelo J Alfonzo, Michael J Jowers, and Huub Camp. 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: 240–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.10.011>.
- Borges, Adolfo, and Matthew R Graham. 2016. "Phylogenetics of Scorpions of Medical Importance." In *Venom Genomics and Proteomics*, edited by P Gompalonokrishnanone and J J Cleverte, Toxinology:81–104. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6649-5>.
- Borges, Adolfo, Melva Morales, Wilmer Loor, and Miguel Delgado. 2015. "Scorpionism in Ecuador: First Report of Severe and Fatal Envenoming Cases from Northern Manabí by Tityus Asthenes Pocock." *Toxicon* 105: 56–61.
- Bosmans, F, and J Tytgat. 2007. "Voltage-Gated Sodium Channel Modulation by Scorpion α -Toxins." *Toxicon* 49: 142–158.
- Brito, Gabriel, and Adolfo Borges. 2015. "A Checklist of the Scorpions of Ecuador (Arachnida : Scorpiones), with Notes on the Distribution and Medical Significance of Some Species." *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 21 (23): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0023-x>.
- Brown, Christopher A, and Daniel J O'Connell. 2000. "Plant Climbing Behavior in the Scorpion Centruroides Vittatus." *The American Midland Naturalist Journal* 144: 406–18.
- Cao, Zhijian, Yingliang Wu, Pei Hao, Zhiyong Di, Yawen He, Xiaojuan Chen, Weishan Yang, et al. 2013. "The Genome of Mesobuthus Martensii Reveals a Unique Adaptation Model of Arthropods." *Nature Communications* 4 (2602): 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms3602>.
- Carbone, E, E Wanke, G Prestipino, L D Possani, and A Maelicke. 1982. "Selective Blockage of Voltage-Dependent K⁺ Channels by a Novel Scorpion Toxin ." *Nature* 296: 90–91.
- Castagné, Vincent, Froger-Colléaux, Elise Esneault, Martine Hernier, Anne Marie, Lemaire, and Roger D. Porsolt. 2013. "Central Nervous System (CNS) Safety Pharmacology Studies." In *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*, 17–72.
- Castro, Fernando, and Fernando Vargas. 2008. "Anfibios y Reptiles En El Departamento Del Valle Del Cauca, Colombia." *Biota Colombiana* 9 (2): 251–77.

- Catterall, William A, Alan L Goldin, and Stephen G Waxman. 2005. "International Union of Pharmacology . XLVII . Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels." *PHARMACOLOGICAL REVIEWS* 57 (4): 397–409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4.and>.
- Catterall, William A, and Ning Zheng. 2015. "Deciphering Voltage-Gated Na and Ca Channels by Studying Prokaryotic Ancestors." *Trends in Biochemical Sciences*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.002>.
- Charry, Héctor. 2006. "Accidentes Por Picadura de Escorpion." In *Memorias Del Primer Simposio de Toxinología Clínica "César Gómez Villegas"*, Bogotá, 1–26.
- Chen, Zong-yun, Dan-yun Zeng, You-tian Hu, Ya-wen He, Na Pan, Jiu-ping Ding, Zhi-jian Cao, et al. 2012. "Structural and Functional Diversity of Acidic Scorpion Potassium Channel Toxins." *PLOS ONE* 7 (4): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035154>.
- Chen, Zongyun, Youtian Hu, Jun Hu, Weishan Yang, Jean-marc Sabatier, Michel De Waard, Zhijian Cao, Wenxin Li, Song Han, and Yingliang Wu. 2014. "Biochemical and Biophysical Research Communications Unusual Binding Mode of Scorpion Toxin BmKTX onto Potassium Channels Relies on Its Distribution of Acidic Residues." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 447 (1): 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.101>.
- Chippaux, J, and M Goyffon. 2008. "Epidemiology of Scorpionism: A Global Appraisal." *Acta Tropica* 107: 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>.
- Chippaux, Jean Phelippe. 2012. "Emerging Options for the Management of Scorpion Stings." *Drug Design, Development and Therapy* 6: 165–74.
- Chowell, G, P Días-Dueñas, A Alemán, and V Fet. 2006. "Epidemiological and Clinical Characteristics of Scorpionism in Colima , Mexico (2000 – 2001)." *Toxicon* 47: 753–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.004>.
- Cid-uribe, Jimena I, Carlos E Santibáñez-lópez, Erika P Meneses, Cesar V F Batista, Juana M Jiménez-vargas, Ernesto Ortiz, and Lourival D Possani. 2018. "The Diversity of Venom Components of the Scorpion Species Paravaejovis Schwenkmeyeri (Scorpiones : Vaejoidea) Revealed by Transcriptome and Proteome Analyses." *Toxicon* 151: 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.085>.
- Conesa, Ana, Pedro Madrigal, Sonia Tarazona, David Gomez-cabrero, Alejandra Cervera, Andrew Mcpherson, Wojciech Szcze, et al. 2016. "A Survey of Best Practices for RNA-Seq Data Analysis." *Genome Biology* 17 (13): 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>.
- Cordeiro, Francielle A, Fernanda G Amorim, Fernando A P Anjolette, and Eliane C Arantes. 2015. "Arachnids of Medical Importance in Brazil : Main Active Compounds Present in Scorpion and Spider Venoms and Tick Saliva." *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 21 (24): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0028-5>.
- Coronas, F V, M Stankiewicz, C V F Batista, S Giraud, J M Alam, L D Possani, D Mebs, and M Pelhate. 2003. "Primary Structure and Electrophysiological Characterization of Two Almost Identical Isoforms of Toxin from Isometrus Vittatus (Family: Buthidae) Scorpion Venom." *Toxicon* 41 (8): 989–97.

- Cupo, P. 2015. "Clinical Update on Scorpion Envenoming." *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48 (6): 642–49.
- D'Suze, Gina, Cesar V F Batista, Andrea Frau, Fernando Z Murgia, Anna Rosa Zamudio, Lourival D Sevcik, Carlos Possani, and Gianfranco Prestipino. 2004. "Discrepin, a New Peptide of the Sub-Family α -Ktx15, Isolated from the Scorpion *Tityus Discrepans* Irreversibly Blocks K⁺ Channels of Cerebellum Granular Cells." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430 (2): 256–63.
- D'Suze, Gina, Moisés Sandoval, and Carlos Sevcik. 2015. "Characterizing *Tityus Discrepans* Scorpion Venom from a Fractal Perspective: Venom Complexity , Effects of Captivity , Sexual Dimorphism , Differences among Species." *Toxicon* 108: 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.034>.
- D'Suze, Gina, Elisabeth F Schwartz, B. I García-Gómez, Carlos Sevcik, and Lourival D Possani. 2009. "Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of Genes from a cDNA Library of the Scorpion *Tityus Discrepans*." *Biochimie* 91: 1010–19. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.05.005>.
- Dardevet, Lucie, Dipti Rani, Tarek Abd, El Aziz, Ingrid Bazin, Jean-marc Sabatier, Mahmoud Fadl, Elisabeth Brambilla, and Michel De Waard. 2015. "Chlorotoxin: A Helpful Natural Scorpion Peptide to Diagnose Glioma and Fight Tumor Invasion." *Toxins* 7: 1079–1101. <https://doi.org/10.3390/toxins7041079>.
- DeBin, J. A, J. E Maggio, and G. R Strichartz. 1993. "Purification and Characterization of Chlorotoxin, a Chloride Channel Ligand from the Venom of the Scorpion." *The Journal of Physiology* 264: 361–369.
- Deng, Yuchen, Jiawei Gu, Zhenpeng Yan, Mengdi Wang, Chaoqun Ma, Jiafeng Zhang, Guixian Jiang, et al. 2018. "De Novo Transcriptomic Analysis of the Venomous Glands from the Scorpion *Heterometrus Spinifer* Revealed Unique and Extremely High Diversity of the Venom Peptides." *Toxicon* 143: 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.12.051>.
- Deuis, Jennifer R, Alexander Mueller, Mathilde R Israel, and Irina Vetter. 2017. "The Pharmacology of Voltage-Gated Sodium Channel Activators." *Neuropharmacology* 127: 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.014>.
- Diego-García, Elia, Figen Caliskan, and Jan Tytgat. 2014. "The Mediterranean Scorpion *Mesobuthus Gibbosus* (Scorpiones , Buthidae): Transcriptome Analysis and Organization of the Genome Encoding Chlorotoxin-like Peptides." *BMC Genomics* 15 (295): 1–16.
- Diego-Garcia, Elia, Cesar V F Batista, Blanca I Garcia-Gómez, Sylvia Lucas, Denise M Candido, Froylan Gómez-lagunas, and Lourival D Possani. 2005. "The Brazilian Scorpion *Tityus Costatus* Karsch: Genes, Peptides and Function." *Toxicon* 45: 273–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.10.014>.
- Diego-garcia, Elia, Elisabeth F Schwartz, Gina D D'Suze, Sergio A Román, Cesar V F Batista, Blanca I García, Ricardo C Rodríguez de la Vega, and Lourival D Possani. 2007. "Wide Phylogenetic Distribution of Scorpine and Long-Chain b-KTx-like Peptides in Scorpion Venoms: Identification of 'Orphan' Components." *Peptides* 28: 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.06.012>.
- Diego-García, Elia, Y Abdel, Elisabeth F Schwartz, Ricardo C Rodríguez de la Vega, J Tytgat, and Lourival D Possani. 2008. "Cytolytic and K⁺ Channel Blocking Activities of B-KTx and Scorpine-like Peptides Purified from Scorpion Venoms." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 187–200. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7370-x>.

- Diego-García, Elia, Steve Peigneur, Elke Clynen, Tessa Marien, Lene Czech, Liliane Schoofs, and Jan Tytgat. 2012. "Molecular Diversity of the Telson and Venom Components from *Pandinus Cavimanus* (Scorpionidae Latreille 1802): Transcriptome, Venomics and Function." *Proteomics* 12 (2): 313–28.
- Doyle, D A. 1998. "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity." *Science* 280 (5360): 69–77.
- Duque, H M, C B F Mourão, D V Tibery, E A Barbosa, L A Campos, and E F Schwartz. 2017. "To4, the First *Tityus Obscurus* β -Toxin Fully Electrophysiologically Characterized on Human Sodium Channel Isoforms." *Peptides* 95: 95.
- Flórez, Eduardo. 2001. "Escorpiones de La Familia Buthidae (Chelicerata: Escorpiones) de Colombia." *Biota Colombiana* 2 (1): 25–30.
- Fuzita, Felipe J, Martijn W H Pinkse, José S L Patane, Maria A Juliano, Peter D E M Verhaert, and Adriana R Lopes. 2015. "Biochemical , Transcriptomic and Proteomic Analyses of Digestion in the Scorpion *Tityus Serrulatus* : Insights into Function and Evolution of Digestion in an Ancient Arthropod." *PLOS ONE* 15: 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123841>.
- García, Silvia. 2017. "IMPLICACIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO ACTIVADOS POR CALCIO EN LA PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR."
- Gómez, Juan P, and Rafael Otero. 2007. "Ecoepidemiología de Los Escorpiones de Importancia Médica En Colombia." *Facultad Nacional Salud Pública* 25 (1): 50–60.
- Gómez, Juan P, Rafael Otero Patiño, Vitelbina Núñez, Mónica M Saldarriaga, Abel Díaz Cadavid, and María P Velásquez. 2002. "Aspectos Toxinológicos , Clínicos y Epidemiológicos Del Envenenamiento Producido Por El Escorpión *Tityus Fuhrmanni* Kraepelin." *MEDUNAB* 5 (15): 159–66.
- Gómez, Juan P, Juan C Quintana, Patricia Arbeláez, Jorge Fernández, Juan F Silva, Jacqueline Barona, Juan C Gutiérrez, Abel Díaz, and Rafael Otero. 2010. "Picaduras Por Escorpión *Tityus Asthenes* En Mutatá , Colombia : Aspectos Epidemiológicos , Clínicos y Toxinológicos." *Biomédica* 30 (1): 126–39.
- Gomez, M V, and C R Diniz. 1966. "Separation of Toxic Components from the Brazilian Scorpion *Tityus Serrulatus* Venom." *Memorias Del Inst. Butantan*, 1966.
- Guerrero-Vargas, Jimmy A, Caroline B F Mourao, Veronica Quintero-Hernández, Lourival D Possani, and Elisabeth F Schwartz. 2012. "Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus Pachyurus* and *Tityus Obscurus* Novel Putative Na⁺ Channel Scorpion Toxins" 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030478>.
- Guerrero-vargas, Jimmy Alexander, Javier Roberto Rodríguez, Santiago Ayerbe, Eduardo Florez, and Jose Toribio. 2015. "Scorpionism and Dangerous Species of Colombia." In *Scorpion Venoms*, 245–72. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6404-0>.
- Han, S, H Yi, S J Yin, Z Y Chen, H Liu, Z J Cao, Y L Wu, and W X Li. 2008. "Structural Basis of a Potent Peptide Inhibitor Designed for Kv1.3 Channel, a Therapeutic Target of Autoimmune Disease." *Biological Chemistry* 283: 19058–19065.

- He, Yawen, Ruiming Zhao, Zhiyong Di, Zhongjie Li, Xiaobo Xu, Wei Hong, Yingliang Wu, Huabin Zhao, Wenxin Li, and Zhijian Cao. 2013. "Molecular Diversity of Chaerilidae Venom Peptides Reveals the Dynamic Evolution of Scorpion Venom Components from Buthidae to Non-Buthidae." *Proteomics* 89: 1–14.
- Housley, David M, Gary D Housley, Michael J Liddell, and Ernest A Jennings. 2017. "Scorpion Toxin Peptide Action at the Ion Channel Subunit Level." *Neuropharmacology* 127: 46–78.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.004>.
- Huys, Isabelle, Chen-qi Xu, Cheng-zhong Wang, Helene Vacher, Marie-france Martin-eauclaire, Cheng Chi, and Jan Tytgat. 2004. "BmTx3 , a Scorpion Toxin with Two Putative Functional Faces Separately Active on A-Type K + and HERG Currents." *BIOCHEMISTRY* 378: 745–52.
- IGAC, Instituto Geográfico Agustín Codazzi –. 1997. "Bases Conceptuales y Guía Metodológica Para La Formulación Del Plan de Ordenamiento Territorial Departamental."
- Isbister, G. K, and H. S Bawaskar. 2014. "Scorpion Envenomation." *New England Journal of Medicine* 371 (5): 457–63.
- Izquierdo, Ledys María, and Javier R Rodríguez. 2012. "Cardiovascular Dysfunction and Pulmonary Edema Secondary to Severe Envenoming by Tityus Pachyurus Sting . Case Report." *Toxicon* 60: 603–6.
- Jazayeri, Seyed Mehdi, Luz Marina Melgarejo, and Hernán Mauricio Romero. 2015. "RNA-SEQ : A GLANCE AT TECHNOLOGIES AND METHODOLOGIES." *ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA* 20 (2): 23–35.
- Karbat, Izhar, Roy Kahn, Lior Cohen, Nitza Ilan, Nicolas Gilles, Gerardo Corzo, Oren Froy, et al. 2007. "The Unique Pharmacology of the Scorpion A-like Toxin Lqh3 Is Associated with Its Flexible C-Tail." *FEBS Journal* 274: 1918–31.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05737.x>.
- Kazemi-Lomedasht, Fatemeh, Vahid Khalaj, Kamran Bagheri, Mahdi Behdani, and Delavar Shahbazzadeh. 2017. "The First Report on Transcriptome Analysis of the Venom Gland of Iranian Scorpion, Hemiscorpius Lepturus." *TOXICON* 125: 123–30.
- Khabiri, M, A Nikouee, L Cwiklik, S Grissmer, and R Ettrich. 2011. "Charybdotoxin Unbinding from the MKv1.3 Potassium Channel: A Combined Computational and Experimental Study." *The Journal of Physical Chemistry B* 115 (39): 11490–500.
- Kuzmenkov, A I, E V Grishin, and A A Vassilevski. 2015. "Diversity of Potassium Channel Ligands : Focus on Scorpion Toxins." *BIOCHEMISTRY* 80 (13): 1764–99.
- Kuzmenkov, I A, O V Nekrasova, S Peigneur, V M Tabakmakher, A M Gigolaeva, A F Fradkova, K S Kudryashova, et al. 2018. "KV1.2 Channel-Specific Blocker from Mesobuthus Eupeus Scorpion Venom: Structural Basis of Selectivity." *Neuropharmacology* 143: 228–38.
- Landoulsi, Zied, Francesco Miceli, Angelo Palmese, Angela Amoresano, Gennaro Marino, Mohamed El Ayeb, Maurizio Taglialatela, and Rym Benkhalifa. 2013. "Subtype-Selective Activation of Kv7 Channels by AaTXKb, a Novel Toxin Variant from the Androctonus Australis Scorpion Venom." *Molecular Pharmacology* 84: 763–73.

- Legros, C, C Ceard, P. E. Bougis, and M Eauclaire. 1998. "Evidence for a New Class of Scorpion Toxins Active against K⁺ Channels." *FEBS Letters* 431: 375–80.
- Lourenço, W R, and Eduardo Flórez. 1989. "Los Escorpiones (Chelicerata) de Colombia. La Fauna de La Isla Gorgona. Aproximación Biogeográfica." *Caldasia* 16 (76): 66–70.
- Luna-ramírez, Karen, Verónica Quintero-hernández, Víctor Rivelino Juárez-Gonzalez, and Lourival D Possani. 2015. "Whole Transcriptome of the Venom Gland from Urodacus Yaschenkoi Scorpion." *PLOS ONE* 28: 1–33. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127883>.
- Luna-ramírez, Karen, Veronica Quintero-hernández, Leonel Vargas-Jaimes, Cesar V F Batista, Kenneth D Winkel, and Lourival D Possani. 2013. "Characterization of the Venom from the Australian Scorpion Urodacus Yaschenkoi: Molecular Mass Analysis of Components , CDNA Sequences and Peptides with Antimicrobial Activity." *Toxicon* 63: 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.11.017>.
- Ma, Yibao, Yong Zhao, Weiping Zhang, Yawen He, Yingliang Wu, Zhijian Cao, Lin Guo, and Wenxin Li. 2010. "Molecular Diversity of Toxic Components from the Scorpion Heterometrus Petersii Venom Revealed by Proteomic and Transcriptome Analysis." *Proteomics* 10: 2471–85. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900763>.
- Marinkelle, C J, and H L Stahnke. 1965. "TOXICOLOGICAL AND CLINICAL STUDIES ON CENTRUROIDES (GERVAIS), A COMMON SCORPION IN WESTERN COLOMBIA." *Med. Ent.* 2 (2): 197–99.
- Martins, A. P, A. O Carmo, F. O Mesquita, R. J Pimenta, A. T Chagas, and E Kalapothakis. 2016. "Many Unique Characteristics Revealed by the Complete Mitochondrial Genome of the Scorpion Tityus Serrulatus." *The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis* 27 (5): 3628–29.
- Mosbah, Amor, Riadh Kharrat, Ziad Fajloun, Jean-guillaume Renisio, Eric Blanc, Jean-marc Sabatier, Mohamed El Ayeb, and Herve Darbon. 2000. "A New Fold in the Scorpion Toxin Family, Associated With an Activity on a Ryanodine-Sensitive Calcium Channel." *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 40: 436–42.
- Nagalakshmi, Ugrappa, Karl Waern, and Michael Snyder. 2010. "RNA-Seq : A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis." *Current Protocols in Molecular Biology* 89: 1–13. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0411s89>.
- Olamendi-portugal, Timoteo, Blanca García, Ignacio López-González, Jurg Van Der Walt, Karin Dyason, Chris Ulens, Jan Tytgat, Ricardo Felix, Alberto Darszon, and Lourival D Possani. 2002. "Two New Scorpion Toxins That Target Voltage-Gated Ca²⁺ and Na⁺ Channels." *ScienceDirect - Biochemical and Biophysical Research Communications* 299: 562–68.
- Oliveira, Fagner, Márcia Mortari, Fabiana Carneiro, Jimmy Guerrero-vargas, Daniel M Santos, Adriano M C Pimenta, and Elisabeth F Schwartz. 2013. "Another Record of Signi Fi Cant Regional Variation in Toxicity of Tityus Serrulatus Venom in Brazil : A Step towards Understanding the Possible Role of Sodium Channel Modulators." *Toxicon* 73: 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.021>.

- Oliveira, Ursula, Denise Maria Candido, Valquiria Coronado, and Loila Junqueira. 2015. "The Transcriptome Recipe for the Venom Cocktail of Tityus Bahiensis Scorpion." *Toxicon* 95: 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.12.013>.
- Oliveira, Ursula, Milton Yutaka, Maria B Viana, Andria de Paula Santos-da-Silva, Hipócrates Menezes, Andreia Souza-Imberg, Denise M Candido, Norma Yamanouye, Valquiria A Coronado, and Inacio Junqueira-de-Azevedo. 2018. "Proteomic Endorsed Transcriptomic Profiles of Venom Glands from Tityus Obscurus and T. Serrulatus Scorpions." *PLOS ONE* 13 (3): 1–23.
- Ortiz, Ernesto, Georgina Gurrola, Elisabeth F Schwartz, and Lourival D Possani. 2015a. "Scorpion Venom Components as Potential Candidates for Drug Development." *TOXICON* 93: 125–35.
- Ortiz, Ernesto, Georgina Gurrola, Elisabeth Schwartz, and Lourival D Possani. 2015b. "Scorpion Venom Components as Potential Candidates for Drug Development." *Toxicon* 93: 125–35.
- Ortiz, Ernesto, Martha Rendón-Anaya, Solange Rego, Elisabeth F Schwartz, and Lourival D Possani. 2014. "Antarease-like Zn-Metalloproteases Are Ubiquitous in the Venom of Different Scorpion Genera." *Biochimica et Biophysica Acta* 1840: 1738–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.012>.
- OSSO, and Fundación la Minga. 2000. "EVALUACIÓN DE AMENAZAS NATURALES Y BASES PARA LA MITIGACIÓN DE RIESGOS EN EL ÁREA URBANA DE BUENAVENTURA."
- Otero, R, E Navio, F A Céspedes, M J Núñez, L Lozano, D Fernández, E R Moscoso, et al. 2004. "Scorpion Envenoming in Two Regions of Colombia: Clinical , Epidemiological and Therapeutic Aspects." *Tropical Medicine and Hygiene* 98: 742–50. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2003.12.018>.
- Otero, R, F. L Uribe, and A Sierra. 1998. "Envenenamiento Escorpiónico En Niños." *Actualizaciones Pediátricas* 8: 88–92.
- Pardal, P P, E A Ishikawa, J L Vieira, J S Coelho, R C Dórea, P A Abati, M M Quiroga, and H M Chalkidis. 2014. "Clinical Aspects of Envenomation Caused by Tityus Obscurus (Gervais, 1843) in Two Distinct Regions of Pará State, Brazilian Amazon Basin: A Prospective Case Series." *Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 20 (1): 3.
- Picco, Cristiana, Gerardo Corzo, Lourival D Possani, and Gianfranco Prestipino. 2014. "Interaction of the Scorpion Toxin Discrepin with Kv4.3 Channels and A-Type K⁺ Channels in Cerebellum Granular Cells." *Biochimica et Biophysica Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.009>. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.009>.
- Pocock, R. I. 1893. "A Contribution to the Study of Neotropical Scorpions." *The Annals and Magazine of Natural History* 6 (68): 77–103.
- Possani, Lourival D, and Ricardo C Rodríguez de la Vega. 2006. "Scorpion Venom Peptides." In *Handbook of Biologically Active Peptides*, 339–55.
- Possani, Lourival Domingos. 1982. "THE PRIMARY STRUCTURE OF NOXIUSTOXIN: A K⁺ CHANNEL BLOCKING PEPTIDE, PURIFIED FROM THE VENOM OF THE SCORPION CENTRUROIDES NOXIUS HOFFMANN." *Carlsberg Research Communications - Springer* 47: 285–89.

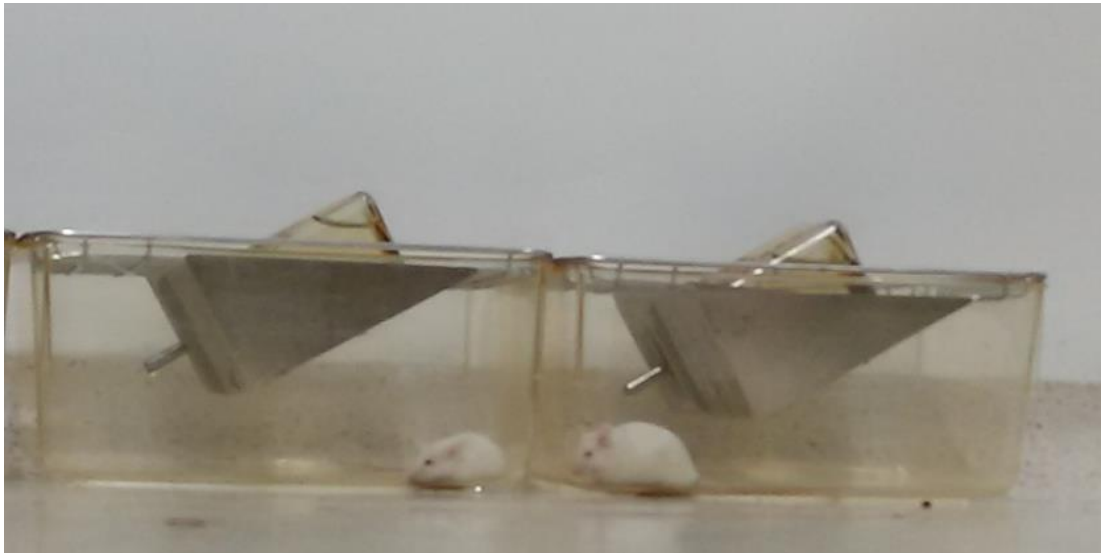
- Pucca, M B, F G Amorim, F A Cerni, K D Bordon, I A Cardoso, F A P Anjolette, and E C Arantes. 2014. "Influence of Post-Starvation Extraction Time and Prey-Specific Diet in Tityus Serrulatus Scorpion Venom Composition and Hyaluronidase Activity." *Toxicon* 90: 326–36.
- Quintero-Hernández, V, J.M Jiménez-Vargas, G.B Gurrola, H.H.F Valdivia, and L.D Possani. 2013. "Scorpion Venom Components That Affect Ion-Channels Function." *Toxicon* 15 (76): 328–42.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.012>.Scorpion.
- Raiol, Tainá, Daniel Paiva Agostinho, Kelly Cristina, Simi Rodrigues, Maria de Souza, De Souza Silva, Maria Emilia Walter, Ildinete Silva-pereira, and Marcelo Brígido. 2014. "Transcriptome Analysis Throughout RNA-Seq." In *Transcriptomics in Health and Disease*, 49–57. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11985-4>.
- Regev, Avital, Hadassah Rivkin, Bora Inceoglu, Eduard Gershburg, Bruce D Hammock, Michael Gurevitz, and Nor Chejanovsky. 2003. "Further Enhancement of Baculovirus Insecticidal Efficacy with Scorpion Toxins That Interact Cooperatively." *FEBS Journal* 537: 106–10.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00104-2).
- Rodríguez-Ravelo, R, F I Coronas, F Z Zamudio, L González-Morales, G E López, A R Urquiola, and L D Possani. 2013. "The Cuban Scorpion Rhopalurus Junceus (Scorpiones, Buthidae): Component Variations in Venom Samples Collected in Different Geographical Areas." *Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 19: 13.
- Rodríguez de la Vega, Ricardo, and Lourival D Possani. 2005. "Overview of Scorpion Toxins Specific for Na C Channels and Related Peptides : Biodiversity , Structure – Function Relationships and Evolution." *Toxicon* 46: 831–44.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.006>.
- Romeo, Stefania, Gerardo Corzo, Attilio Vasile, Honoo Satake, Gianfranco Prestipino, and Lourival D Possani. 2008. "A Positive Charge at the N-Terminal Segment of Discrepin Increases the Blocking Effect of K + Channels Responsible for the I A Currents in Cerebellum Granular Cells" 1780: 750–55.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.012>.
- Romero-Gutiérrez, María, Carlos Eduardo Santibáñez-López, Juana María Jiménez-Vargas, Cesar Vicente Ferreira, Ernesto Ortiz, and Lourival D Possani. 2018. "Transcriptomic and Proteomic Analyses Reveal the Diversity of Venom Components from the Vaejovid Scorpion Serradigitus Gertschi." *Toxins* 10 (359): 1–25. <https://doi.org/10.3390/toxins10090359>.
- Roodt, Adolfo, Fredy Coronas, Nestor Lago, María González, Rodrigo D Laskowicz, C Beltramino, Silvina Saavedra, et al. 2010. "General Biochemical and Immunological Characterization of the Venom from the Scorpion Tityus Trivittatus of Argentina." *TOXICON* 55: 307–19.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.014>.
- Roux, Sylvain, Evelyne Sablé, and Roger D Porsolt. 2004. "Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and Its Effects on Behavior And." *Current Protocols in Pharmacology (2004)* 27: 1–23.
<https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1010s27>.
- Ruiming, Zhao, Ma Yibao, He Yawen, Di Zhiyong, Wu Yingliang, Cao Zhijian, and Li Wenxin. 2010. "Comparative Venom Gland Transcriptome Analysis of the Scorpion Lychas Mucronatus Reveals Intraspecific Toxic Gene Diversity and New Venomous Components." *BMC Genomics* 11: 452–67.

- Sabatier, Jean-Marc, and Michel De Waard. 2013. "Animal Toxins." In *Handbook of Biologically Active Peptides*, 407–15.
- Santibáñez-López, C E, J I Cid-Urbe, F Z Zamudio, C V Batista, E Ortiz, and L D Possani. 2017. "Venom Gland Transcriptomic and Venom Proteomic Analyses of the Scorpion *Megacormus Gertschi* Díaz-Najera, 1966 (Scorpiones: Euscorpiidae: Megacorminae)." *Toxicon* 133: 95–109.
- Santibáñez-lópez, Carlos E, Jimena I Cid-uribe, Cesar V F Batista, Ernesto Ortiz, and Lourival D Possani. 2016. "Venom Gland Transcriptomic and Proteomic Analyses of the Enigmatic Scorpion *Superstitionia Donensis* (Scorpiones : Superstitioniidae), with Insights on The." *Toxins* 8 (367): 1–24. <https://doi.org/10.3390/toxins8120367>.
- Schwartz, Elisabeth F, Elia Diego-garcia, Ricardo C Rodríguez de la Vega, and Lourival D Possani. 2007. "Transcriptome Analysis of the Venom Gland of the Mexican Scorpion *Hadrurus Gertschi* (Arachnida : Scorpiones)." *BMC Genomics* 12: 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-119>.
- Skutelsky, O. 1996. "Predation Risk and State-Dependent Foraging in Scorpions: Effects of Moonlight on Foraging in the Scorpion *Buthus Occitanus*." *Animal Behaviour* 52: 49–57.
- Trapnell, Cole, Adam Roberts, Loyal Goff, Geo Pertea, Daehwan Kim, David R Kelley, Harold Pimentel, Steven Salzberg, John Rinn, and Lior Pachter. 2012. "Differential Gene and Transcript Expression Analysis of RNA-Seq Experiments with TopHat and Cufflinks Differential Gene and Transcript Expression Analysis of RNA-Seq Experiments with TopHat and Cufflinks." *Nature Protocols* 7 (3): 562–78. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>.
- Verano-Braga, T, C Rocha-Resende, D M Silva, D Ianzer, M F Martin-Eauclaire, P E Bougis, M E Lima, R A S Santos, and A M C Pimenta. 2008. "Tityus Serrulatus Hypotensins: A New Family of Peptides from Scorpion Venom." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 515–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.104>.
- Waard, Michel De, and Jean Sabatier. 2006. "Structure-Function Strategies to Improve the Pharmacological Value of Animal Toxins." In *Handbook of Biologically Active Peptides*, 415–20.
- Wang, Zhong, Mark Gerstein, and Michael Snyder. 2009. "RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics." *Nature Reviews Genetics* 10 (1): 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484.RNA-Seq>.
- Zhong, Jie, Xian Chun Zeng, Xin Zeng, Yao Nie, Lei Zhang, Shifen Wu, and Aorigele Bao. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.004>.
- Zhu, Shunyi, Bin Gao, André Aumelas, Carmen Rodríguez, Humberto Lanz-mendoza, Steve Peigneur, Elia Diego-garcia, Marie-france Martin-eauclaire, Jan Tytgat, and Lourival D Possani. 2010. "MeuTXKβ1 , a Scorpion Venom-Derived Two-Domain Potassium Channel Toxin-like Peptide with Cytolytic Activity." *Biochimica et Biophysica Acta Journal* 1804 (4): 872–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.017>.

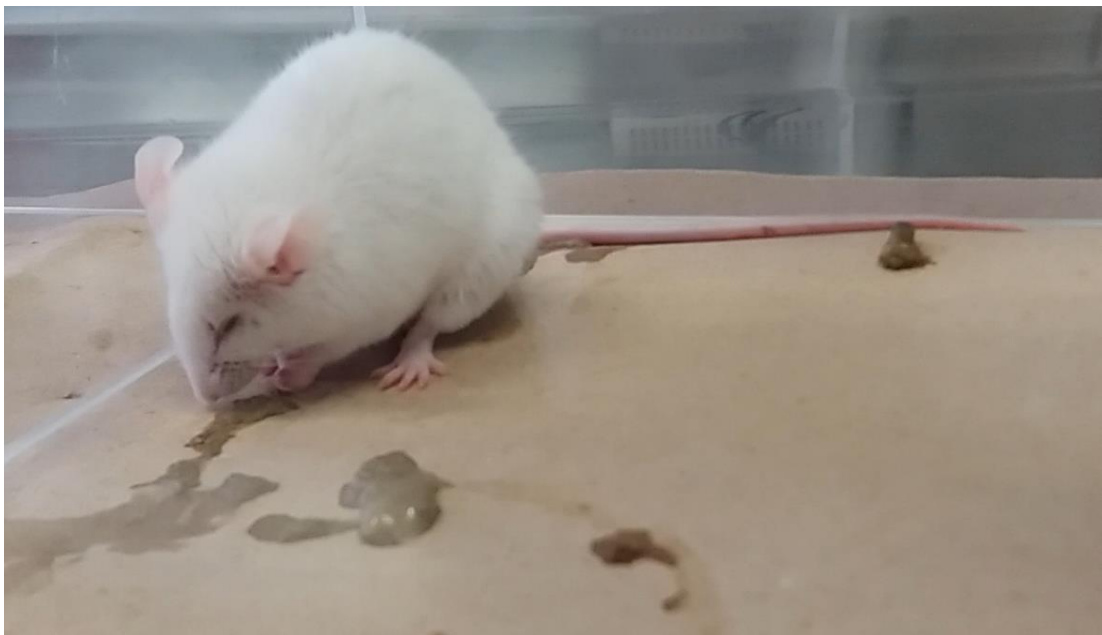
ANEXOS.

Anexo 1. Imágenes de preparación y resultados del Test de Irwin. A) Disposición de cada individuo para estandarización y registro de resultados y B) Observación de un ratón adulto con dosis de veneno de *T. asthenes* al cabo de 60 minutos.

A.



B.



Anexo 2. Tabla modificada del Test de Irwin.

Fecha/Hora Administración:	Responsable:								
Sustancia:									
	Tiempo								
Peso: 1) 2) 3)	15			30			60		
Marca:									
1) 2) 3)	Animal								
Parámetro de respuesta	1	2	3	1	2	3	1	2	3
↓ SNC									
Ataxia (Descordinación del movimiento)									
Pérdida reflejo de enderezamiento									
Analgesia (Ausencia de dolor)									
Anestesia									
Pérdida reflejo corneal (No parpadeo al estimular la cornea)									
Parálisis extremidades anteriores									
Parálisis extremidades posteriores									
↑ SNC									
Temblores finos en el cuerpo									
Temblores fuertes en el cuerpo									
Fasiculaciones (Contracciones musculares involuntarias en miembros)									
Convulsiones tónicas (rigidez de los músculos del cuerpo)									
Convulsiones fásicas									
Reacción de alarma									

Ojos									
Enoftalmia (globo ocular interno)									
Exoftalmia (globo ocular externo)									
Ptosis palpebral (descenso del párpado superior)									
Tamaño de la pupila									
Nistagmus (mvto involuntario del ojo)									
Lacrimación									
Orejas									
Palidéz									
Hiperemia (irrigación sanguínea)									
Cianosis (coloración azul de la piel)									
Efectos generales									
Salivación									
Erección de la cola									
Piloerección									
Micción (orinar)									
Diarrea									
Priapismo (erección del pene sin apetito sexual)									
Signo de robichaud (deshidratación)									
Movimientos circulares									
Respiración (T en segundos)									
Efectos subjetivos									
Agresión									
Pasivo									
Temeroso									
Muerte necropsia									
Otras observaciones									

