

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**



**ESTUDIO BIOQUÍMICO DEL VENENO DEL ESCORPIÓN  
*Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897)**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO  
CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA**

**PRESENTADO POR  
BACH. LUZ ROSALINA TINCOPA MARCA**

**LIMA- PERÚ  
2007**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, bajo el asesoramiento del Mg. Blgo. Enrique Escobar Guzmán.

Dedicatoria.

A mi madre.

# Agradecimientos

Expreso mi sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado de una u otra manera en el desarrollo de mi tesis y en especial a:

A mi madre, mis hermanos y mi tío Janio por darme su apoyo.

A mi asesor Enrique Escobar Guzmán, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y guiarme en el desarrollo del mismo.

A la profesora Martha Valdivia Cuya por darme todas las facilidades de uso de equipos de su laboratorio.

Al señor Lelis Rivera y su esposa Ana González por brindarme todas las facilidades para realizar las colectas de los grillos.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM: Verónica Céspedes, Catherina Ramos, Dora Velásquez y en especial a mi amigo Carlos Rivera, por su ayuda y amistad.

A Roland Schafleitner y Amelié Gaundin por su comprensión.

A Lina Bernaola, Isaac Rodríguez y Percy Rojas por sus sugerencias.

## ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINAS
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES.....	6
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. Material biológico.....	9
2. Equipos.....	9
3. Colecta y mantenimiento de los escorpiones.....	10
4. Obtención del veneno.....	10
5. Separación cromatográfica de las proteínas del veneno.....	10
6. Cuantificación de proteínas.....	11
7. Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (PAGE- SDS.....	11
8. Toxicidad sobre <i>Mus musculus</i> .....	12
9. Toxicidad sobre <i>Gryllus</i> sp.....	12
10. Actividad de fosfolipasa.....	12
11. Actividad proteolítica.....	13
12. Actividad de hialuronidasa.....	13
13. Actividad hemolítica.....	14
14. Actividad anticoagulante.....	14

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
1. Contenido proteico.....	15
2. Separación de las proteínas.....	15
3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).....	16
4. Toxicidad sobre <i>Mus musculus</i> .....	16
5. Toxicidad sobre <i>Gryllus</i> sp.....	17
6. Actividad de fosfolipasa.....	18
7. Actividad de proteolítica.....	18
8. Actividad hialuronidasa.....	19
9. Actividad hemolítica.....	20
10. Actividad anticoagulante.....	21
VII. CONCLUSIONES.....	22
VIII. FIGURAS Y TABLAS.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

## I. RESUMEN.

Se ha estudiado el veneno del escorpión *Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897) habiéndose determinado que contiene 47,6% de proteína. Las proteínas del veneno fueron separadas a partir de 12,9 mg de veneno, mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM Sephadex C-25, con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7,0 a temperatura ambiente y a un flujo de 11 mL/h. El perfil cromatográfico mostró la presencia de siete picos proteicos y por PAGE-SDS se diferenciaron por lo menos cinco bandas proteicas en el veneno crudo.

Los ensayos de toxicidad han permitido identificar tres toxinas que afectan a *Mus musculus* y que se encuentran asociadas a los picos IV, V y VII; y asimismo se ha detectado toxicidad sobre *Gryllus* sp., la cual está asociada a los picos IV, V, VI y VII. Entre las actividades enzimáticas se ha determinado la presencia de actividad proteolítica sobre azocoll y caseína relacionada al pico I. También se ha encontrado actividad de hialuronidasa en el pico IV con una actividad específica de 205,6  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ . Finalmente tanto en el veneno crudo como en las fracciones colectadas no se ha encontrado actividad de fosfolipasa, anticoagulante ni hemolítica.

## II. ABSTRACT.

This research has shown that 47,6% of *Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897) venom consists of protein. The venom proteins were separated from 12,9 mg of venom using cationic exchange chromatography in CM Sephadex C-25 with a 0,05 M ammonium acetate buffer pH 7,0 at room temperature and 11 mL/h flow. The chromatography profiles show seven peaks of proteins and by PAGE-SDS, five protein bands were distinguished in the crude venom.

The toxicity assays allowed the identification of three toxins that affect *Mus musculus* which were associated to peaks IV, V and VII. Toxic proteins to *Gryllus* sp. were also found associated to peaks IV, V, VI and VII.

Through the enzymatic activity, the presence of proteolytic activity was found related to the first peak, which has activity over azocoll and casein. Hyaluronidase activity has also been found in the peak IV with a specific activity 205,6  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ . However, the crude venom and collected fractions did not show any phospholipase, anticoagulant, nor hemolytic activity.



### III. INTRODUCCIÓN.

Los escorpiones están dentro de los animales más antiguos sobre la faz de la tierra y cuyas características morfológicas se han mantenido casi inalteradas en el tiempo. Todos los escorpiones son animales venenosos y pertenecen al Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, Clase Arachnida, Orden Scorpionida y se encuentran clasificados en las Familias Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Chaerilidae, Diplocentridae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae, Ischnuridae, Iuridae y Scorpionidae.

La mayoría de escorpiones son activos en la noche, durante el día se ocultan bajo piedras, troncos y grietas o en galerías que cavan ellos mismos en el sustrato. Tienen una actividad estacional marcada y la mayor parte del tiempo se encuentran en sus refugios, saliendo solo para alimentarse y reproducirse (Polis, 1990).

Los escorpiones se encuentran en un nivel intermedio de la cadena alimenticia. Ellos son predadores pero al mismo tiempo también son presas de otros animales. Se alimentan principalmente de insectos, arácnidos y otros animales pequeños que capturan con sus pedipalpos (tenazas) e inmovilizan o matan con su veneno, el cual se encuentra en el telson (aguijón) parte terminal del metasoma (cola). Los escorpiones utilizan el veneno no solo como medio de defensa cuando se encuentran en peligro, sino también como arma para paralizar a sus presas (Polis, 1990).

Químicamente el veneno de escorpión está constituido principalmente por proteínas, las cuales pueden ser toxinas o enzimas. Las toxinas de estos venenos se caracterizan por bloquear canales iónicos de sodio y potasio afectando directamente al sistema nervioso por lo que son las responsables de paralizar a las presas. Estas proteínas son los componentes más estudiados no solo porque sirven como excelentes modelos en estudios de estructura y función biológica, sino también porque pueden ser letales a varios organismos incluyendo al hombre y además porque debido a su especificidad, algunas tienen un potencial uso como bioinsecticidas y antimicrobianos

(Miranda et al., 1970; Torres-Larios et al., 2000; Pimenta et al., 2001; Jiang et al., 2001; Mejri et al., 2003; Bosmans et al., 2005). En general el veneno del escorpión es considerado pobre en actividades enzimáticas si se le compara con el veneno de arañas o serpientes; sin embargo algunas enzimas como hialuronidasa, fosfolipasa A y actividad gelatinolítica se han detectado en ciertos venenos de *Palamneus gravimanus*, *Heterometrus scaber*, *Tityus serrulatus* y *Tityus bahiensis* (Pessini et al., 2001; Almeida et al., 2002; Morey et al., 2006).

Como parte de los trabajos sobre venenos de escorpiones del Perú que realiza el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de nuestra Facultad, regularmente se hacen colectas de escorpiones o se reciben ejemplares vivos de nuevas especies, las cuales se mantienen en cautiverio para estudiar el veneno. En marzo del 2005 recibimos del Dr. José Antonio Ochoa, un lote de 79 escorpiones colectados en Madre de Dios y que correspondería a una nueva especie del género *Tityus*, *Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897).

El escorpión *Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897) conocido por los pobladores de la zona como "escorpión moteado de la amazonia" es un escorpión pequeño, de hasta 35 mm de longitud, de color amarillo con manchitas en el cuerpo que le dan una apariencia moteada. La última porción del metasoma es negruzca, y los ejemplares machos poseen el telson mas abultado en comparación al de las hembras, tal como se muestra en la figura 1. Se encuentran principalmente en el suelo y en pequeñas ramitas a pocos centímetros del suelo. En nuestro país no se ha hecho ningún estudio bioquímico sobre el veneno de alguna especie del género *Tityus*, por lo que esta tesis constituye el primer trabajo de este tipo.

En este sentido los objetivos de este trabajo fueron los siguientes

- Determinar el contenido proteico del veneno.
- Separar por cromatografía las proteínas del veneno.
- Determinar el patrón electroforético del veneno crudo.
- Determinar la toxicidad sobre *Mus musculus* y *Gryllus* sp.
- Determinar la presencia de las siguientes actividades enzimáticas: fosfolipasa, proteasa y hialuronidasa.
- Determinar la presencia de actividad hemolítica y anticoagulante.

#### IV. ANTECEDENTES

El género *Tityus* contiene 128 especies descritas y es el más numeroso de la familia Buthidae (Fet and Lowe, 2000). La distribución de estos escorpiones comprende parte de América Central y Sudamérica, y la letalidad de sus venenos está relacionada con la presencia de toxinas que afectan los canales iónicos de sodio y potasio, aunque también se han identificado toxinas que afectan a canales de calcio y de cloro (Barhanin et al., 1982; Becerril et al., 1997).

Mucha de la información que se tiene sobre el veneno de este género se deriva de los estudios con la especie brasilera *Tityus serrulatus*, la cual es considerada una de las más peligrosas para el ser humano (Couraud et al., 1982). La letalidad de este veneno se debe a la presencia de toxinas y también a una hialuronidasa que permite la rápida difusión del veneno (Pessini et al., 2001). Los efectos sintomáticos del envenenamiento por *T. serrulatus* comprenden dolor en el sitio de la picadura, vómitos, hipersalivación, sudoración excesiva, agitación sicomotora y afecciones cardiorespiratorias que incluyen arritmias cardíacas, hipertensión arterial y edema pulmonar (Freire-Maia et al., 1994).

También se han estudiado los venenos de *Tityus bahiensis* (Becerril et al., 1996; Pimenta et al., 2001), *Tityus stigmurus* (Becerril et al., 1996), *Tityus cambridgei* (Batista et al., 2000; 2002; Murguía et al., 2004), *Tityus zulianus* (Borges et al., 2004), *Tityus fasciolatus* (Wagner et al., 2003), *Tityus discrepans* (D'Suze et al., 2004), *Tityus trivitattus* (Coronas et al., 2003) y *Tityus costatus* (Diego-García et al., 2005).

En los estudios realizados se han purificado muchas toxinas, con una gran especificidad para artrópodos (D'Suze et al., 2004), insectos (Pimenta et al., 2001), mamíferos (Borges et al., 1990), y algunas otras con acción tanto sobre insectos como mamíferos (Pimenta et al., 2001). Además de las toxinas que se han encontrado

también se han hallado algunas actividades enzimáticas como hialuronidasa (Pessini et al., 2001) y la actividad gelatinolítica (Almeida et al., 2002).

En el Perú, los primeros estudios sobre escorpiones se realizaron entre 1965 y 1988, y ellos permitieron conocer acerca de la diversidad de estos arácnidos y también algo sobre el efecto del veneno en *Mus musculus* y *Porcellio laevis*. Sin embargo estos estudios fueron escasos y se realizaron solo con el veneno de tres especies. Además en todos estos trabajos sólo se empleó el veneno total y no se separaron los principios activos (Cáceres, 1965; Aguilar, 1968; Aguilar y Meneses, 1970; Cáceres et al., 1972; Arboleda et al., 1973; Maury, 1974; Francke, 1977; Maury, 1978; Zavaleta et al., 1979; Castro et al., 1981; Zavaleta, 1983; Calderón y Aguilar, 1988).

A partir del año 2000 se han reportado nuevas especies de escorpiones en nuestro país y se ha estudiado su distribución (Acosta y Ochoa, 2000; 2001; Ochoa, 2002; 2004; 2005; Ochoa y Acosta, 2002; 2003), pero recién desde el 2002 se han publicado los primeros trabajos sobre la purificación y caracterización de proteínas de algunos venenos de escorpiones del Perú tales como *Hadruidoidea lunatus*, *Hadruidoidea mauryi*, *Centruroides margaritatus* y *Brachistosternus ehrenbergii*. En estos venenos se han identificado toxinas de naturaleza básica que afectan a *Porcelio laevis*, *Gryllus* sp. y *Mus musculus*. Entre estas podemos mencionar las toxinas H13 y Hm3 de *Hadruidoidea lunatus* y *Hadruidoidea mauryi* respectivamente, las cuales producen parálisis en la extremidad inoculada de ratones albinos, incremento en los niveles de creatina kinasa, lactato deshidrogenasa en el plasma y aumento en la cantidad de calcio intramuscular. Asimismo algunas enzimas como la fosfolipasa se han encontrado en los venenos de *H. lunatus*, *H. mauryi* y *B. ehrenbergii* mas no en el veneno de *C. margaritatus* (Escobar et al., 2002; Escobar et al., 2003a; 2003b; Rivera et al., 2004; Velásquez y Escobar, 2004; Ramos, 2005).

En el mundo se calcula que existen 1500 especies de escorpiones, de las cuales 41 existen en nuestro país y representan a 6 familias: Buthidae, Bothriuridae, Chactidae, Caraboctonidae, Euscorpiidae e Ischnurida. De estas 41 especies, por lo

menos 10 corresponden al género *Tityus* las que se encuentran distribuidas principalmente en la sierra y selva de nuestro país (Ochoa, comunicación personal 2005). Las especies del género *Tityus*, como ya se mencionó, son particularmente importantes porque muchas de ellas son extremadamente peligrosas para el hombre (Borges, 1996; Freire-Maia et al., 1994). En nuestro medio, este trabajo constituye el primer estudio sobre el veneno de una especie del género *Tityus*.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 1. Material biológico.

- Escorpiones de ambos sexos del género *Tityus* sp. procedentes de Madre de Dios.
- Ratones albinos Balb/c de 10g.
- Grillos recolectados en la localidad de Huaura, Lima.
- Arañas del género *Kukulcania* recolectadas en la ciudad universitaria de la UNMSM, para alimentar a los escorpiones.

### 2. Equipos

- Balanza analítica Ohaus.
- pHmetro Corning PH- 25.
- Centrífuga CW-1 Sorval.
- Esterilizador HV Ovens.
- Cámara electroforética C.B.S Scientific. Co. Model MGV-102.
- Fuente poder Techware.
- Equipo cromatográfico.
- Baño maria Thelco.
- Vortex Matheson Scientific.
- Jeringa Hamilton.
- Cocinilla eléctrica Corning.
- Espectrofotómetro Unico.
- Refrigeradora Inresa.
- Congeladora Miray.

### **3. Colecta y mantenimiento de los escorpiones.**

Se utilizaron escorpiones del género *Tityus* sp. colectados por el Dr. José Antonio Ochoa Cámara y el Blgo. Juan Carlos Chaparro Auza en el encuentro de los ríos Los Amigos y Madre de Dios, en el departamento de Madre de Dios. En el laboratorio los escorpiones se mantuvieron juntos en un envase de plástico de 65 x 37 x 30 cm, se les alimentó cada dos semanas con arañas o grillos y constantemente se les proporcionó algodones humedecidos según el método de Candido y Lucas (2004), tal como se muestra en las figuras 1, 2 y 3.

### **4. Obtención del veneno.**

El veneno, obtenido por estimulación eléctrica (20 voltios), fue colectado con capilares y depositado en una placa petri. A continuación el veneno fue desecado en una campana de vacío, tal como se muestra en la figura 4, y finalmente se pesó para mantenerlo a -20°C hasta su uso.

Para realizar este trabajo se utilizó 12,9 mg de veneno provenientes de tres extracciones en tres meses sucesivos. En cada extracción se obtuvo 5,7, 4,4 y 2,8 mg de veneno de 74, 56 y 39 escorpiones respectivamente, obteniéndose en promedio 0,076 mg de veneno por cada escorpión.

### **5. Separación cromatográfica de las proteínas del veneno.**

Para la separación cromatográfica, el veneno (12,9 mg) se disolvió en 600 µL de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7, durante 30 minutos con la ayuda de un vortex. Se centrifugó a 6000 rpm por 30 minutos y se separó el sobrenadante. Luego se aplicó 490 µL del sobrenadante a una columna cromatográfica de intercambio catiónico de CM Sephadex C-25 de 13,5 x 1,1 cm equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 7,0 (Escobar et al., 2002). Se colectaron fracciones de 1 mL y las



proteínas retenidas en la columna se eluyeron con el mismo buffer conteniendo NaCl 0,2 M y 0,6 M. La corrida se realizó a temperatura ambiente y a un flujo de 11 mL/h.

## **6. Cuantificación de proteínas.**

Para todos los ensayos el contenido proteico se determinó según el método de Warburg y Christian (1941) que se basa en la propiedad que tienen los anillos aromáticos de algunos aminoácidos como la tirosina y el triptófano de absorber la luz ultravioleta. Solo para determinar el contenido proteico del veneno crudo se utilizó el método de Lowry et al. (1951) para lo cual se mezcló 25  $\mu$ L de la muestra con 475  $\mu$ L de acetato de amonio 0,05 M pH 7, y 2 mL de la solución alcalina (carbonato de sodio al 4%, sulfato de cobre al 2% y tartrato de sodio y potasio al 4% en proporciones de 100:1:1). Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y luego se agregó 0,5 mL del reactivo de Folin Ciocalteus (1:6) para incubar nuevamente por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 750 nm y se calculó la concentración de proteína por comparación a un estándar de albúmina bovina (5mg/mL).

## **7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).**

El perfil electroforético del veneno crudo y las fracciones obtenidas se determinaron por PAGE-SDS de acuerdo al método de Schägger y Von Jagow. Como proteínas estándares se usaron citocromo C (12,4 kDa) y aprotinina (6 kDa).

## **8. Toxicidad sobre *Mus musculus*.**

Ratones albinos de 10 g de peso fueron inoculados intraperitonealmente con 0,1 mL del veneno crudo diluido (15,3 µg) o de las fracciones colectadas. La toxicidad se evaluó durante 3 horas después de la inoculación, en base a la aparición de ciertos síntomas tales como temblores, hipersalivación, hiperlacrimación, dificultad para respirar, parálisis de extremidades y muerte. En total se realizaron dos ensayos y cada uno por triplicado.

## **9. Toxicidad sobre *Gryllus* sp.**

La toxicidad sobre los grillos se evaluó por la inoculación con una jeringa Hamilton, de 5 µL del veneno crudo o 15 µL de las fracciones colectadas en la parte ventral, entre el segundo y tercer par de patas. La toxicidad se determinó por la parálisis o la muerte de los especímenes durante los primeros minutos después de la inoculación.

## **10. Actividad de fosfolipasa.**

Se determinó de acuerdo al método de Marinetti (1965). Se preparó una emulsión de yema de huevo con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7,0 de modo que tuviera una absorbancia inicial aproximada de 0,600 a 920 nm. A 1,5 mL de esta emulsión se le agregó 100 µL del veneno crudo o 10 µL de las fracciones colectadas y se midió la disminución en la absorbancia a 920 nm durante 4 minutos.

## **11. Actividad proteolítica.**

La actividad proteolítica se determinó sobre azocoll según el método de Chavira et al. (1984). El azocoll es un substrato poco soluble, compuesto por colágeno con grupos azo adheridos. La acción proteolítica solubiliza los grupos azo y el medio toma una coloración rojiza la cual se puede leer a 540 nm. La mezcla de reacción contenía 100  $\mu\text{L}$  de azocoll (10 mg/mL), 180  $\mu\text{L}$  de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7,0 y 20  $\mu\text{L}$  del veneno crudo o de las fracciones colectadas. Esta mezcla se incubó a 37 °C por 2 horas y luego la reacción se detuvo con 1,2 mL de NaOH 0,01 M, leyéndose finalmente a 540 nm.

Adicionalmente en la fracción con actividad sobre azocoll, se midió la actividad proteolítica sobre caseína. Para ello se incubó a 37 °C, 20  $\mu\text{L}$  de caseína 8 mg/mL con 10  $\mu\text{L}$  de la fracción durante 15, 30, 60, 120 y 180 minutos. La evaluación de la actividad proteolítica se realizó por PAGE-SDS (Laemmli, 1970).

Finalmente también se midió la actividad proteolítica sobre albúmina y hemolinfa de grillo. Para esta prueba se mezcló, por separado, 5  $\mu\text{L}$  de albúmina bovina 2 mg/mL y hemolinfa de grillo (diluida 1:3) con 5  $\mu\text{L}$  de la fracción con actividad proteolítica. Esta mezcla se incubó a 37°C por 90 minutos y la evaluación de la proteólisis se realizó por PAGE-SDS (Laemmli, 1970).

## **12. Actividad de hialuronidasa.**

La actividad de hialuronidasa del veneno crudo y las fracciones colectadas se determinó por turbidimetría según el método de Di Ferrante (1956). La mezcla de reacción contenía 300  $\mu\text{L}$  de buffer acetato pH 6, 100  $\mu\text{L}$  de ácido hialurónico (0,5 mg/mL en buffer acetato) y 100  $\mu\text{L}$  de las fracciones colectadas o 30  $\mu\text{L}$  de veneno crudo. La mezcla fue incubada durante 20 minutos a 37°C y la reacción se detuvo con 1 mL de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2,5% (diluido en NaOH 2%). La

absorbancia se leyó a 400 nm y la actividad específica se expresó como los  $\mu\text{g}$  de ácido hialurónico hidrolizados por minuto y por mg de proteína.

### **13. Actividad hemolítica.**

La actividad hemolítica del veneno crudo y de las fracciones colectadas se evaluó en forma directa e indirecta según el método de Torres-Larios et al. (2000).

#### **Directa.**

La mezcla de reacción contenía 200  $\mu\text{L}$  de glóbulos rojos al 0,5% en buffer Tris 0,1 M NaCl 0,15 M pH 7,5 y 50  $\mu\text{L}$  del veneno crudo o las fracciones colectadas. Se incubó a 37°C por 2 horas y después se centrifugó a 6000 rpm por 15 minutos. Finalmente se separó el sobrenadante y se leyó a 541 nm.

#### **Indirecta.**

La mezcla de reacción contenía 200  $\mu\text{L}$  de glóbulos rojos al 0,5%, 25  $\mu\text{L}$  de emulsión de yema de huevo (4 veces diluido en buffer Tris 0,1 M NaCl 0,15 M pH 7,5) y 100  $\mu\text{L}$  del veneno crudo o las fracciones colectadas. Se incubó a 37°C durante 2 horas y después se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos. Finalmente se separó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 541 nm.

### **14. Actividad anticoagulante.**

La mezcla de reacción conteniendo 100  $\mu\text{L}$  de plasma humano citratado y 50  $\mu\text{L}$  de veneno crudo o de las fracciones colectadas se incubó a 37°C durante 15 minutos. Luego se agregó 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  0,08 M y se midió el tiempo de coagulación. La actividad anticoagulante se determinó midiendo el retraso en el tiempo de coagulación del plasma, con respecto a un control sin veneno.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **1. Contenido proteico.**

Según el método de Lowry, se ha determinado que el veneno de *Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897) contiene 47,6% de proteína. Este valor contrasta con el hallado en *Centruroides margaritatus* (81%), el cual es otro escorpión de la familia Buthidae, pero se asemeja al hallado en *Brachistosternus ehrenbergii* (40%) (Escobar et al., 2003b; Rivera et al., 2004). Adicionalmente durante las extracciones de veneno, se midió que cada escorpión expulsa en promedio aproximadamente 1 µl de veneno.

### **2. Separación de las proteínas.**

Al pasar el veneno crudo de *Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897) por la columna de CM-Sephadex C-25 a pH 7 se obtuvo un perfil cromatográfico con siete picos proteicos, de los cuales los tres primeros picos salieron con el buffer inicial de corrida. Al agregar NaCl 0,2 M eluyeron tres picos adicionales y finalmente con NaCl 0,6 M se obtuvo un pico más, tal como se muestra en la figura 5.

Considerando este perfil cromatográfico y la carga negativa del gel, se puede decir que las proteínas de los tres primeros picos tienen igual carga que el gel o son eléctricamente neutras, en cambio las proteínas de los cuatro últimos picos están cargadas positivamente y por ello salen solo después de aplicar NaCl, siendo además de naturaleza básica.

Una característica de los venenos de escorpiones es que presentan un alto contenido de toxinas de naturaleza básica, lo cual es aprovechado para separarlas mediante cromatografía de intercambio catiónico (Borges et al., 1990).

### **3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).**

La PAGE-SDS según el método de Schägger y Von Jagow (1987) mostró la presencia de al menos 5 bandas proteicas en el veneno crudo, de las cuales la de menor peso molecular fue la más gruesa y notoria. Este resultado nos indica que la mayoría de proteínas del veneno de *Tityus* sp. son de bajo peso molecular (menor o igual a 6 kDa), lo cual es una característica general de los venenos de escorpiones de la familia Buthidae.

Adicionalmente se analizaron electroforéticamente los picos I y IV. En el pico I se pudo observar las bandas proteicas de alto y mediano peso molecular del veneno crudo pero en menor medida las proteínas de bajo peso molecular. En cambio el pico IV mostró una sola banda proteica de 6kDa. Los demás picos proteicos no se pudieron analizar electroforéticamente debido a la baja concentración proteica. Estos resultados se pueden ver en la figura 6.

En otros venenos de escorpiones del género *Tityus* también se han observado y aislado muchas proteínas de bajo peso molecular; particularmente es notable el veneno de *Tityus costatus* donde se han encontrado por lo menos 84 componentes de bajo peso molecular (Diego-García et al., 2005).

### **4. Toxicidad sobre *Mus musculus*.**

La toxicidad sobre *Mus musculus* se encontró tanto en el veneno crudo como en los picos IV, V y VII de la corrida cromatográfica.

El efecto tóxico del veneno crudo se manifestó por signos de irritabilidad, giros bruscos, saltos descoordinados, secreción lacrimal y retracción de las patas. Asimismo el efecto tóxico del pico IV se manifestó por el exceso de secreción lacrimal, irritación

y convulsiones, mientras que el pico V causó hiperactividad, irritabilidad, pataletas incontroladas y ojos achinados. Finalmente el pico VII produjo pequeños temblores, retracción de las patas traseras, excesiva salivación, lacrimación e inmovilidad de las patas posteriores; a los 45 minutos aproximadamente, los ratones presentaron falla respiratoria y a la hora murieron. La muerte producida por el pico VII fue causada con 0,909  $\mu\text{g/g}$  de ratón.

Estas toxinas detectadas, al igual que muchas otras toxinas de venenos del género *Tityus*, son de naturaleza básica y producen efectos muy parecidos. En algunos venenos de otras familias de escorpiones del Perú también se han encontrado toxinas para roedores tales como la H13, Hm3 y Bel (Escobar et al., 2002; 2003a; Ramos, 2005).

##### **5. Toxicidad sobre *Gryllus* sp.**

Tanto el veneno crudo como las fracciones correspondientes a los picos IV, V, VI y VII, mostraron toxicidad sobre *Gryllus* sp. La cantidad de proteína que afectó a los grillos fue de 51,2  $\mu\text{g}$  en el veneno crudo, y de 0,32 a 2,91  $\mu\text{g}$  para las fracciones colectadas.

La toxicidad en el insecto se manifestó por la lentitud y descoordinación en el caminar, el desplazamiento del cuerpo hacia un lado sin poder levantarse y el encogimiento de las patas delanteras y traseras hasta quedar completamente paralizado, todo lo cual se produjo casi inmediatamente después de la inoculación.

El pico VII mostró la mayor toxicidad pues la parálisis producida fue irreversible, en cambio con los otros picos se observó que 10 minutos después de la parálisis algunos grillos empezaban a recuperarse lentamente. Este efecto temporal o reversible de algunas toxinas no es sorprendente, ya que igual ellas cumplen su función de contribuir a paralizar a la presa para que el escorpión pueda comerla.

Según los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad, los picos IV, V y VII afectan tanto a *Mus musculus* como a *Gryllus* sp., lo cual podría deberse a la presencia de una sola toxina con acción sobre roedores e insectos, o a la existencia de dos toxinas una con acción sobre *Mus musculus* y otra con acción sobre *Gryllus* sp. Así por ejemplo, en el veneno de *Tityus bahiensis* se ha aislado la toxina Tb2-II, la cual afecta tanto a mamíferos como a insectos; mientras la toxina TbIT-I, es específica para insectos (Pimenta et al., 2001).

## **6. Actividad de fosfolipasa.**

Tanto el veneno crudo como las fracciones colectadas no mostraron actividad de fosfolipasa. En este sentido, en comparación a otros venenos de escorpiones de nuestro país, el veneno de *Tityus* sp. se parece al de *Centruroides margaritatus* pero difiere de los venenos de *Hadruidoles lunatus*, *Hadruidoles mauryi* y *Brachistosternus ehrenbergii* donde si se ha encontrado esta actividad (Escobar et al., 2002; 2003b; Velásquez y Escobar, 2004; Rivera et al., 2004).

## **7. Actividad proteolítica.**

Luego de ensayar la actividad enzimática sobre azocoll, se encontró que tanto el veneno crudo como las fracciones del primer pico tenían una ligera actividad proteolítica sobre este sustrato. Adicionalmente al evaluar la actividad proteolítica sobre caseína, mediante PAGE-SDS (Laemmli 1970) se pudo observar una hidrólisis progresiva del sustrato en función del tiempo, la misma que fue evidente desde los 15 minutos de incubación (ver figura 7).

Sin embargo, no se detectó actividad proteolítica sobre albúmina ni hemolinfa de grillo tal como se muestra en la figura 8, donde se puede ver que el patrón



electroforético de la albúmina y la hemolinfa no sufren variación por acción de la proteasa del veneno.

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que el veneno de *Tityus* sp. posee actividad proteolítica sobre caseína y pobre actividad sobre azocoll, pero no tiene actividad sobre albúmina ni hemolinfa de grillo.

A diferencia de *Tityus* sp., los venenos de *T. serrulatus* y *T. bahiensis* también tienen actividad proteolítica pero sin actividad sobre caseína y mas bien con fuerte actividad sobre gelatina (medido en geles de poliacrilamida con gelatina incorporada). Como se sabe tanto la gelatina como el azocoll están constituidos de colágeno pero en el caso del azocoll se trata de colágeno con grupos azo covalentemente unidos. Aunque no se ha medido actividad gelatinolítica en el veneno de *Tityus* sp., quizá la modificación química en el colágeno del azocoll haga que no sea fácilmente reconocido.

Se ha sugerido que las proteasas del veneno podrían actuar como agentes difusores del veneno al incrementar la permeabilidad de los tejidos facilitando así la difusión de las proteínas del veneno; sin embargo la mayoría de venenos de escorpiones carecen de esta actividad lo que indicaría además que los venenos no contribuyen en la digestión proteolítica de la presa. Otra de las hipótesis sobre la función de estas proteasas en los venenos de escorpiones es que estas modifiquen a las toxinas en el proceso de post –traducción (Almeida et al., 2002).

## **8. Actividad de hialuronidasa.**

Esta actividad se encontró en el veneno crudo y en las fracciones correspondientes al pico IV lo cual nos indica que esta enzima es de naturaleza básica. En la tabla I se puede ver que luego de la separación cromatográfica, la hialuronidasa se purificó 3,6 veces con un rendimiento de 6,1%. La presencia de hialuronidasa en

diferentes venenos se ha asociado en general con una mayor capacidad de difusión de la ponzoña, debido a que la hidrólisis del ácido hialurónico, un abundante polisacárido de la matriz extracelular, permitiría una mayor diseminación de los componentes tóxicos del veneno.

Se ha demostrado que la toxicidad de los venenos de escorpiones está relacionada al contenido de hialuronidasa, pues el hecho de tener factores difusores, hacen al veneno más tóxico. Esta convergencia entre toxinas y hialuronidasa parece ser la responsable de la rápida tasa de absorción que tiene el veneno de *Tityus serrulatus* en los tejidos, en comparación a otros venenos del mismo género (Pessini et al., 2001).

Sin embargo cabe señalar que el rendimiento obtenido en este trabajo (6,1%) es bajo en comparación a otras hialuronidasas obtenidas como por ejemplo la de los venenos de *Tityus serrulatus* y *Palamneus gravimanus* (Pessini et al., 2001; Morey et al., 2006).

## **9. Actividad hemolítica.**

No se encontró actividad hemolítica directa e indirecta en el veneno crudo ni en las fracciones colectadas. En general, en algunos venenos de escorpiones se ha visto que ciertos péptidos antibacterianos poseen actividad hemolítica directa, por lo que se podría especular que el veneno de *Tityus* sp. carece de estos péptidos. Por otro lado la actividad hemolítica indirecta normalmente está asociada a la actividad de fosfolipasa; el hecho que en este trabajo se halla determinado que el veneno no posee fosfolipasa, guardaría relación con la ausencia de hemólisis indirecta.

## **10. Actividad anticoagulante.**

La actividad anticoagulante tampoco se encontró en el veneno crudo ni en las fracciones colectadas. Este tipo de actividad es debido a ciertas proteasas que pueden hidrolizar el fibrinógeno o algún otro factor de coagulación y que por lo tanto afectan la coagulación sanguínea; igualmente algunas fosfolipasas que hidrolizan fosfolípidos que participan en la coagulación de la sangre, también retrasan la coagulación. En este sentido se puede decir que la proteasa del veneno de *Tityus* sp. no ataca ningún factor de coagulación.

Muy pocos venenos de escorpiones tienen actividad anticoagulante; dentro de las pocas especies de escorpiones con esta actividad en la literatura tenemos a *Palamneus gravimanus* y *Leiurus quinquestriatus* (Hamilton et al., 1974).

## VII. CONCLUSIONES.

1. El veneno de *Tityus* sp. contiene 47,6% de proteína.
2. El veneno de *Tityus* sp. se separó en siete picos proteicos, mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM Sephadex C-25 a pH 7.
3. La PAGE-SDS del veneno crudo mostró la presencia de cinco bandas proteicas, siendo la más abundante la banda de menor peso molecular (6 kDa).
4. Las tres toxinas con actividad sobre *Mus musculus* se encuentran asociadas a los picos IV, V y VII.
5. Las toxinas que afectan a *Gryllus* sp. se encuentran asociadas a los picos IV, V, VI y VII.
6. El veneno tiene actividad proteolítica y de hialuronidasa, pero carece de actividad de fosfolipasa.
7. No se ha detectado actividad hemolítica ni actividad anticoagulante.

## **VIII. FIGURAS Y TABLAS.**



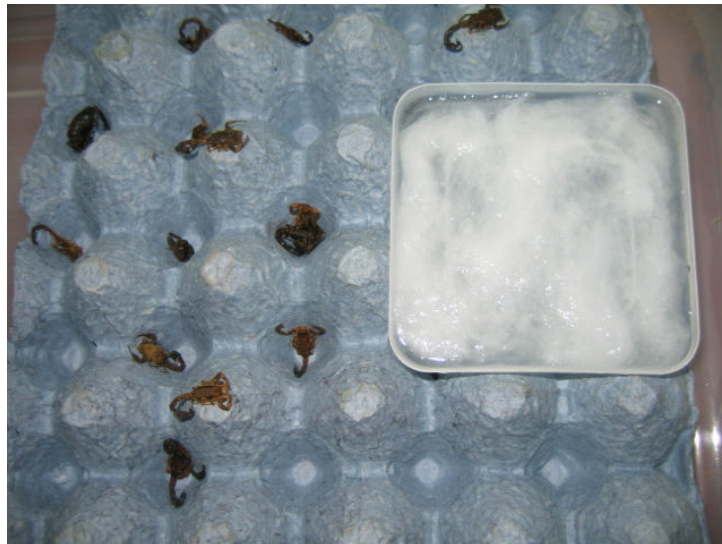
Foto: Juan Carlos Chaparro Auza

**Figura 1. Ejemplar macho de *Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897)**

**A**



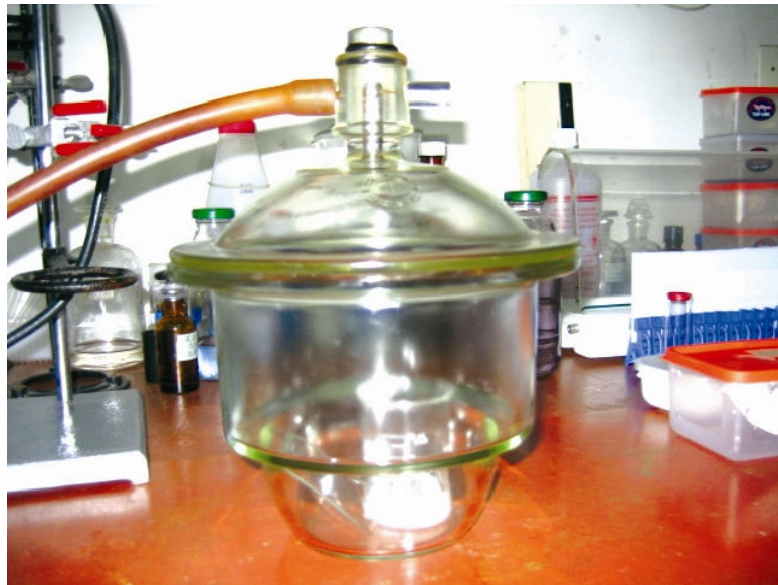
**B**



**Figura 2. Mantenimiento de los escorpiones en el laboratorio. (A) Escorpiones en envase de plástico, cubierto con cartones para evitar que ingrese mucha luz. (B) Escorpiones distribuidos en los cartones y con una fuente de agua constante.**

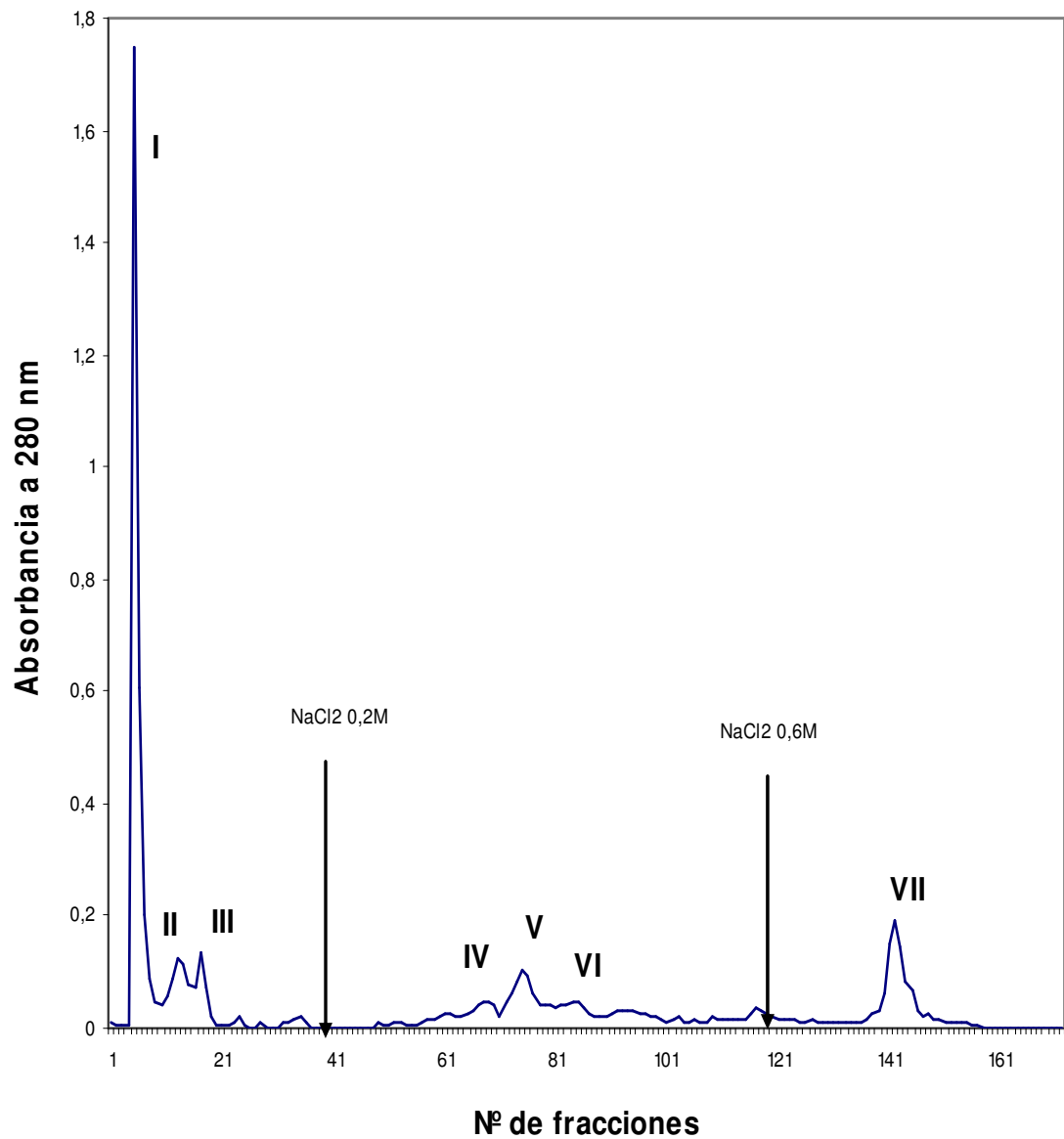


**Figura 3. *Tityus* sp. atacando a un grillo.**

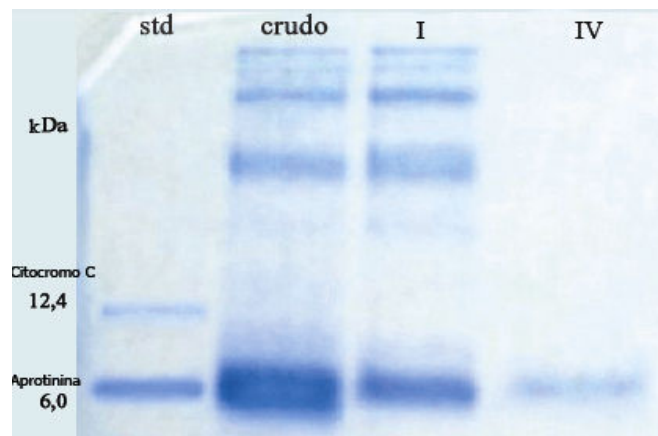


**Figura 4. Deseccación del veneno en una campana de vacío.**

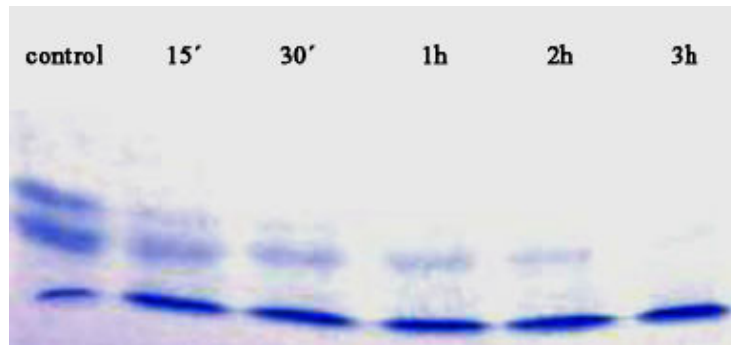




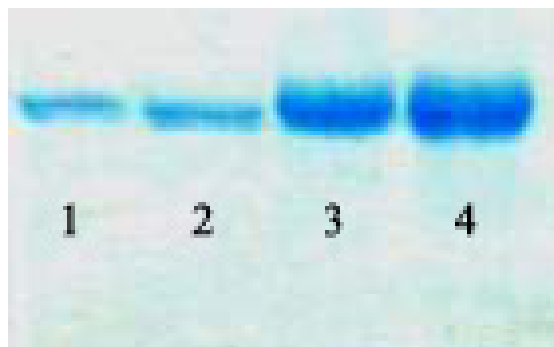
**Figura 5. Cromatografía en CM Sephadex C-25.** Se aplicó 0,490 mL (10,5 mg) de veneno total de *Tityus* sp. a la columna de intercambio catiónico (13,5 x 1,1 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio pH 7,0. Se colectaron fracciones de 1 mL. Los números en romanos indican los siete picos de proteína obtenidos.



**Figura 6. PAGE-SDS del veneno crudo y los picos I y IV.** De izquierda a derecha se puede ver los patrones electroforéticos de: las proteínas estándares (std) (carril 1), el veneno crudo (carril 2), el pico I (carril 3) y el pico IV (carril 4).



**Figura 7. Actividad proteolítica sobre caseína.** Desde los 15 minutos de incubación se notó la hidrólisis de la caseína la cual fue más evidente a mayores tiempos de incubación.



**Figura 8. Actividad proteolítica sobre albúmina y hemolinfa de grillo.** En los carriles 1 y 3 se muestran los controles de albúmina y hemolinfa, mientras que en los carriles 2 y 4 se muestran los incubados de albúmina y hemolinfa con la proteasa respectivamente. Como se puede ver no hay acción proteolítica sobre la albúmina ni la hemolinfa del grillo.

**Tabla 1. Actividad de hialuronidasa.**

Etapa	Proteína total (mg)	Actividad específica ug/min/mg	U.T.A* (UA/min)	Purificación	Rendimiento (%)
Crudo	10.5	56.4	422.7	1	100
CM Sephadex C-25	0.123	205.6	25.9	3.6	6.1

\*U.T.A = Unidades totales de actividad.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Acosta, L. y J. Ochoa. 2000. Nueva especie de *Orobothriurus* Maury del Perú (Scorpiones: Bothriuridae). *Revue Arachnologique* 13: 135-144.
- Acosta, L. and J. Ochoa. 2001. Two news species of *Orobothriurus* Maury 1976 from Argentina and Peru, with comments on the systematics of the genus (Scorpiones: Bothriuridae). *Scorpions 2001 In Memoriam Gary A. Polis. Fet & Selden* (eds.): 203-214.
- Aguilar, P. 1968. Nota sobre los escorpiones de Lima. *Anales Científicos Universidad Agraria La Molina* VI (3): 165-172.
- Aguilar, P. y O. Meneses. 1970. Escorpiones y escorpionismo en el Perú: I, nota preliminar sobre los Scorpionida peruanos. *Anales Científicos Universidad Agraria La Molina* VI (8): Enero, Junio N° 1-2.
- Almeida, F.; A. Pimenta; S. De Figueiredo; M. Santero; M. Martin-Eauclaire; C. Diniz and M. De Lima. 2002. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 40: 1041-1045.
- Arboleda, E.; O. Meneses y P. Aguilar. 1973. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. III: El veneno del “escorpión de Lambayeque”. *Revista Peruana de Entomología*. 16: 78-82.
- Barhanin, J.; J. Giglio; P. Léopold; A. Schmid; S. Sampaio and M. Lazdunski. 1982. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. Tityus  $\gamma$  toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na<sup>+</sup> channel. *Journal of Biological Chemistry* 257: 12553–12558.
- Batista, C.; F. Gómez-Lagunas; S. Lucas and L. Possani. 2000. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K<sup>+</sup>-channels. *FEBS Letters* 486: 117-120.
- Batista, C.; F. Zamudio; S. Lucas; J. Fox; A. Frau; G. Prestipino and L. Possani. 2002. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na<sup>+</sup>-channels. *Toxicon* 40: 557–562.

- Becerril, B.; M. Corona; F. Coronas; F. Zamudio; E. Calderon-Aranda; P. Fletcher; B. Martín and L. Possani. 1996. Toxic peptides and genes encoding toxin  $\gamma$  of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochemical Journal* 313: 753-760.
- Becerril, B.; S. Marangoni and L. Possani. 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon* 35: 821–835.
- Borges, A.; E. Arantes and J. Giglio. 1990. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Venezuelan scorpion, *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon* 28: 1011–1027.
- Borges, A. 1996. Scorpionism in Venezuela. *Acta Biol. Venez.* 16: 65–76.
- Borges, A.; M. Alfonso; C. García; N. Winand; E. Leipold and S. Heinemann. 2004. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel  $\beta$ -toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon* 43: 671-684.
- Bosmans, F.; M. Eauclaire and J. Tytgat. 2005. The depressant scorpion neurotoxin LqqIT2 selectively modulates the insect voltage-gated sodium channel. *Toxicon* 45: 501-507.
- Cáceres, I.; P. Aguilar y O. Meneses. 1972. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. II: Efectos del veneno de escorpión de los pedregales en la costa central. *Revista Peruana de Entomología* 15: 38-43.
- Cáceres, I. 1965. Acción del veneno del escorpión *Hadruidoidea lunatus* en animales de laboratorio. Tesis para Bachiller en Ciencias Biológicas. UNMSM.
- Calderón, S. y P. Aguilar. 1988. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. X: Efecto del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* sobre ratones albinos. *Revista Peruana de Entomología* 30: 91-93.
- Candido, D. and S. Lucas. 2004. Maintenance of scorpions of the genus *Tityus* Koch (Scorpiones, Buthidae) for venom obtention at Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 10: 86-97.

- Castro, G.; A. Zavaleta y R. Castro de la Mata. 1981. Variación estacional del veneno de *Hadruioides lunatus* (Koch) (Scorpionida: Vejovidae) y su actividad paralizante sobre *Porcellio laevis* Koch (Crustacea: Isopoda). Revista Peruana de Entomología 24: 71-74.
- Chavira, R.; T. Burnett and J. Hageman. 1984. Assaying proteinases with azocoll. Anal Biochem. 136: 446-450.
- Coronas, F.; A. De Roodt; T. Olamendi- Portugal; F. Zamudio; C. Batista; F. Gómez-Lagunas and L. Possani. 2003. Disulfide bridges and blockage of *Shaker* B K<sup>+</sup>-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. Toxicon 41: 173–179.
- Couraud, F.; E. Jover; J. Dubois and H. Rochat. 1982. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. Toxicon 20: 9-16
- Diego-García, E.; C. Batista; B. García-Gómez; S. Lucas; D. Candido; F. Gómez-Lagunas and L. Possani. 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. Toxicon 45: 273–283.
- Di-Ferrante, N. 1956. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. Journal of Biological Chemistry 220: 303-306.
- D'Suze, G.; C. Sevcik; M. Corona; F. Zamudio; C. Batista; F. Coronas and L. Possani. 2004. Ardiscretin a novel arthropod-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. Toxicon 43: 263-272.
- Ellman, G.; K. Courtney; V. Andres; and R. Feather-stone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7: 88-95.
- Escobar, E.; C. Rivera; L. Tincopa y D. Rivera. 2002. Purificación Parcial de las toxinas H11, H12 y H13 del veneno del escorpión *Hadruioides lunatus* Koch. 1867 (Scorpionida: Vejovidae). Revista Peruana de Biología. 9: 3-10.
- Escobar, E.; C. Rivera y L. Tincopa. 2003a. Acción de la toxina H13 sobre músculo esquelético. Revista Peruana de Biología. 10: 88-92.

- Escobar, E.; L. Velásquez y C. Rivera. 2003b. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae). *Revista Peruana de Biología* 10: 217-220.
- Fet, V and G. Lowe. 2000. Genus *Tityus* C.L. Koch, 1836. In: Fet, V., Sissom, W.D., Lowe, G., Braunwalder, M.E. (Eds.), *Catalog of the Scorpions of the World*, New York Entomological Society, New York, pp. 228-265.
- Francke, O. 1977. Escorpiones y escorpionismo en el Perú VI: Lista de especies y claves para identificar las familias y los géneros. *Revista Peruana de Entomología*. 20: 73-76.
- Freire-Maia, L.; J. Campos and C. Amaral. 1994. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon* 32: 1009-1014.
- Hamilton, P.; D. Ogston and A. Douglas. 1974. Coagulant activity of the scorpion venoms *Palamneus gravimanus* and *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 12: 291-296.
- Jiang, G.; Y. Xu; X. Zhu; Y. Su and Y. Zhu. 2001. Prokaryotically expressed *Buthus martensii* Karsch insect depressant toxin has insecticidal effects. *Toxicon* 39: 469-476.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lowry, O.; N. Rosebrough; A. Farr and R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Marinetti, G. 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 98: 554-565.
- Maury, E. 1974. Escorpiones y escorpionismo en el Perú IV: Revisión del género *Hadruroides* POCOCK 1893 (Scorpiones, Vejovidae). *Revista Peruana de Entomología*. 17: 9-21.
- Maury, E. 1978. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. VII: Nuevos hallazgos y redescipción de *Brachistosternus andinus*. *Revista Peruana de Entomología*. 21: 23-26.



- Mejri, T.; L. Borchani; N. Srairi-Abid; R. Benkhalifa; S. Cestele; I. Regaya; H. Karoui; M. Pelhate; H. Rochat and M. El Ayeb. 2003. BotIT6: a potent depressant insect toxin from *Buthus occitanus tunetanus* venom. *Toxicon* 41: 163-171.
- Miranda, F.; C. Kopeyan; C. Rochat; H. Rochat and S. Lissitzky. 1970. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis* Hector, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestreatus*. *Eur. J. Biochem* 16: 514-523.
- Morey, S.; K. Kiran and J. Gadag. 2006. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 47: 188-195.
- Ochoa, J. 2005. Patrones de distribución de escorpiones de la región andina en el sur peruano. *Revista Peruana de Biología* 12: 49-68.
- Ochoa, J y L. Acosta. 2002. Two New Andean Species of *Brachistosternus* Pocock (Scorpiones: Bothriuridae). *Euscorpius*, Occasional Publications in Scorpology 2: 1-13.
- Ochoa, J y L. Acosta. 2003. Una nueva especie de *Orobothriurus* (Scorpiones: Bothriuridae) del Santuario Nacional Ampay, Apurímac, Perú. *Revista Peruana de Entomología* 43: 1-6.
- Ochoa, J. 2002. Nueva especie de *Brachistosternus* Pocock (Scorpiones: Bothriuridae) del sur del Perú. *Revista Peruana de Biología* 9: 55 – 63.
- Ochoa, J. 2004. *Brachistosternus ninapo* una nueva especie (Scorpiones: Bothriuridae) de los Andes occidentales en el sur del Perú. *Revista Peruana de Biología* 11: 139-148.
- Pessini, A.; T. Takao; E. Cavalheiro; W. Vichnewski; S. Sampaio; J. Giglio and E. Arantes. 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39: 1495-1504.
- Pimenta, A.; M. Martin-Euclaire; H. Rochat; S. Figueiredo; E. Kalapothakis; L. Afonso and M. De Lima. 2001. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon* 39: 1009–1019.

- Polis, G. 1990. *The Biology of Scorpions*. GA polis. Stanford, California, Stanford University Press, 224-321, 414-445.
- Ramos, C. 2005. Aislamiento y caracterización parcial de una toxina (Be1) del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* (Gervais, 1841) “Escorpión de los arenales”. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo. Lima, UNMSM.
- Rivera, C.; L. Tincopa; C. Ramos; W. Manya y E. Escobar. 2004. Estudio preliminar del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* Gervais, 1841 (Scorpiones: Bothriuridae). Libro de resúmenes de la XIII Reunión Científica ICBAR. p.72.
- Schägger, H. and G. Von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem* 166: 368- 379.
- Torres-Larios, A.; G. Gurrola; F. Zamudio and L. Possani. 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European Journal of Biochemistry* 267: 5023-5031.
- Velásquez, L. y E. Escobar. 2004. Purificación y caracterización parcial de una toxina (Hm3) del veneno de *Hadruidoidea mauryi* (Francke y Soleglad, 1980) (Scorpiones, Iuridae). *Revista Peruana de Biología* 11: 153-160.
- Wagner, S.; M. Castro; J. Barbosa; W. Fontes; E. Schwartz; A. Sebben; O. Rodrigues; M. Sousa and C. Schwartz. 2003. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon* 41: 737–745.
- Warburg, O und W. Christian. 1941. Isolierung und kristallisation der gärungsferments enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421.
- Zavaleta, A.; E. Bustamante y R. Castro. 1979. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. Acción del veneno de *Hadruidoidea lunatus* sobre intestino aislado de rata. *Revista Peruana de Entomología* 22: 75-79.
- Zavaleta, A. 1983. El veneno del escorpión: Bioquímica y Farmacología. *Boletín de Lima*, N°. 30: 75- 90.