

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROTÓXICA Y ANTIMICROBIANA DEL
VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus* sp. (Buthidæ) DEL MUNICIPIO DE POPAYÁN,
CAUCA.

HARRY MORALES DUQUE

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROTÓXICA Y ANTIMICROBIANA DEL
VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus sp.* (Buthidæ) DEL MUNICIPIO DE POPAYÁN,
CAUCA

HARRY MORALES DUQUE

Proyecto de Grado para optar al título de Biólogo

Director

M.Sc. JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS

Codirector

M.Sc. JOSÉ TORIBIO BELTRÁN VIDAL

Asesora

Microbióloga. FABIOLA EUGENIA GONZÁLEZ CUÉLLAR

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011

Nota de aceptación

Director _____

M.Sc Jimmy Alexander Guerrero Vargas

Jurado _____

Médico Toxinólogo Santiago Ayerbe González

Jurado _____

M.Sc Gerardo Andrés Torres Rodríguez

Popayán, 10 de Febrero de 2011.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad del Cauca por haberme formado como profesional gracias a la educación recibida de sus docentes y compañeros y la calidad humana que ahora hace parte de mí.

Agradezco al director de este proyecto, MSc. Jimmy Alexander Guerrero Vargas, quien me mostró el camino a realizarlo, y porque pese a las dificultades que se presentaron en la realización del trabajo, se logró el objetivo de culminarlo.

De igual manera, agradezco enormemente a la Bacterióloga Liliana Caldas, por su colaboración voluntaria y desinteresada con el proyecto de grado; al codirector del proyecto, MSc. José T. Beltrán Vidal, por brindar su apoyo en los momentos en que lo necesité; a mi asesora, Bacterióloga Fabiola Gonzales quien realizó un importante aporte en la ejecución del proyecto; a las asesorías del profesor MSC. Silvio Carvajal; al apoyo de los compañeros Marlon Burbano, Alejandro Jiménez, la colaboración de María Chicangana y María Anacona.

También agradezco a todas las personas que compartieron, hicieron parte y facilitaron este triunfo de mi vida; mi grupo de investigación GIHT, al médico Toxinólogo Santiago Ayerbe González, Edwin Coral, Fabián Hurtado, Beatriz Sarmiento, Marcela Torres y Claudia Arenas; a mi familia, Evelin Morales, Katherine Morales, Estiven Morales, a mis sobrinos; y a los demás compañeros y amistades que perseveraron junto a mí.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
1. JUSTIFICACIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	13
3. ANTECEDENTES	15
4. OBJETIVOS	19
4.1. OBJETIVO GENERAL	19
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. COLECTA DE EJEMPLARES	20
5.2. MANTENIMIENTO DE LOS ESCORPIONES	20
5.3. OBTENCIÓN DEL VENENO	21
5.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS	22
5.5. PRUEBA ANTIBACTERIANA POR MICRODILUCIÓN	23
5.5.1. Agente antibacteriano	23
5.5.2. Preparación del veneno a evaluar	24

5.5.3. Turbidez adecuada del inóculo	24
5.5.4. Método de microdilución	24
5.6. PRUEBA ANTIFÚNGICA POR ANTIFUNGIGRAMA PARA LEVADURAS	26
5.6.1. Agente antifúngico	26
5.6.2. Preparación del veneno a evaluar	27
5.6.3. Turbidez adecuada del inóculo	27
5.6.4. Método de antifungigrama para levaduras	28
5.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ESTADÍSTICO ANTIMICROBIANO	29
5.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROMUSCULAR SOBRE EL ANFIBIO <i>Rhinella marina</i> CON EL VENENO TOTAL DE <i>Tityus</i> sp.	29
5.8.1. Preparación músculo gastrocnemio	30
5.8.2. Medición de la prueba	30
5.8.3. Indicadores	30
5.9. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ESTADÍSTICO NEUROTÓXICO	31
6. RESULTADOS	32
6.1. EVALUACIÓN MICROBIANA	32
6.2. ANTIBACTERIANO	33

6.2.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	33
6.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	36
6.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	38
6.3. ANTIFÚNGICO	41
6.3.1. <i>Candida albicans</i>	41
6.3.2. <i>Candida krusei</i>	44
6.3.3. <i>Cryptococcus neoformans</i>	47
6.4. ACTIVIDAD NEUROTÓXICA	49
7. DISCUSIÓN	56
8. CONCLUSIONES	62
9. RECOMENDACIONES	63
10. BIBLIOGRAFÍA	64

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Cautiverio de escorpiones en cajas plásticas aireadas y con algodones humedecidos.	21
2. Extracción de veneno de los escorpiones.	22
3. Representación de una placa de ELISA cultivada con agentes patógenos y sus tratamientos.	25
4. Placa de ELISA con cultivo de levaduras patógenas y los tratamientos.	32
5. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (<i>E. coli</i>).	35
6. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (<i>P. aeruginosa</i>).	37
7. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (<i>S. aureus</i>).	40
8. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (<i>C. albicans</i>).	43
9. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (<i>C. krusei</i>).	46
10. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (<i>C. neoformans</i>).	48
11. Representación de la Contracción muscular asistida (CMA).	50
12. Comportamiento de la CMA durante una hora con sus respectivas tendencias.	51
13. Curva dosis-efecto de CMA vs. tratamiento.	54

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Promedio de crecimiento bacteriano (<i>E. coli</i>) con veneno de <i>Tityus</i> sp.	34
2. Promedio de crecimiento bacteriano (<i>P. aeruginosa</i>) con veneno de <i>Tityus</i> sp.	36
3. Promedio de crecimiento bacteriano (<i>S. aureus</i>) con veneno de <i>Tityus</i> sp.	39
4. Promedio de crecimiento fúngico (<i>C. albicans</i>) con veneno de <i>Tityus</i> sp.	42
5. Promedio de crecimiento fúngico (<i>C. krusei</i>) con veneno de <i>Tityus</i> sp.	45
6. Promedio de crecimiento fúngico (<i>C. neoformans</i>) con veneno de <i>Tityus</i> sp.	47
7. Promedio de contracción muscular CMA con veneno de <i>Tityus</i> sp.	52
8. Promedio de tiempo de contracción muscular (TCM) con veneno de <i>Tityus</i> sp.	53
9. Concentraciones de veneno comparadas significativamente utilizando los parámetros CMA y TCM determinado mediante prueba <i>U de Mann Whitney</i> .	53

RESUMEN

El escorpionismo es frecuente en Colombia y en el municipio de Popayán, Cauca es causado por *Tityus* sp. del cual se desconocen los efectos. En el presente trabajo se determinó el efecto del veneno de *Tityus* sp. sobre la contracción muscular en la preparación de músculo gastrocnemio del anfibio *Rhinella marina* después de aplicar 3 concentraciones (25%, 50% y 75% de DL50 *Tityus pachyurus*) y la actividad antimicrobiana evaluando 8 concentraciones sobre 3 cepas bacterianas y 3 cepas fúngicas. Se utilizaron los parámetros estadísticos *Kruskal-Wallis* y *U de Mann Whitney*. El efecto del veneno fue significativo sobre la contracción muscular asistida **CMA** y el tiempo de contracción muscular **TCM** ($p=0,000$), mostrando mayor efecto la concentración 50% (0.288mg/kg) ($p=0,000$) e indicando una dependencia dosis efecto ($p=0,000$). Con relación a la actividad antimicrobiana el efecto del veneno sobre *Pseudomonas aeruginosa* se ve en todas las concentraciones ($p\leq 0,015$) siendo la de 1 mg/mL la más efectiva ($p=0,000$), para *Staphylococcus aureus* se presenta en todas las concentraciones ($p\leq 0,005$) siendo la de 0,5 mg/mL la más efectiva ($p=0,001$), para *Candida albicans* a partir de la concentración 0.016 mg/mL hasta 1 mg/mL ($p\leq 0,007$) siendo la de 1 mg/mL la mas efectiva ($p=0,001$), para *Candida krusei* a partir de la concentración 0.016 mg/mL hasta 1 mg/mL ($p\leq 0,012$) siendo la de 1 mg/mL la mas efectiva ($p=0,001$), mientras que tanto para *E. coli* como para *Cryptococcus. neoformans* ninguna de las diferentes concentraciones de veneno causó un efecto notorio sobre el crecimiento *in vitro* ($p\geq 0,024$) y no se muestra significancia entre tratamientos ($p\geq 0,047$). Finalmente, se concluye que el veneno del escorpión *Tityus* sp. presentó componentes nocivos sobre la contracción muscular, así como otros con posible aplicación biotecnológica antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

El escorpionismo es un problema de salud que puede causar la muerte en seres humanos, en muchos países del mundo (Gómez *et al.*, 2002; Barona *et al.*, 2004; Barona *et al.*, 2006; Zhu y Gao, 2006; Gómez y Otero, 2007; Andrade *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2007; Guidine *et al.*, 2008; Borja-Oliveira *et al.*, 2008; Cruttenden *et al.*, 2008; Chippaux, 2008; Cologna *et al.*, 2009; Adiguzel, 2010; Fatani, 2010), de los cuales algunos como Brasil y Méjico han tomado medidas al respecto, pero otros tantos se encuentran en proceso de conocimiento acerca del tema. Colombia entre los últimos forja su camino con el aporte de diversos estudios. Por lo tanto, la realización del presente proyecto contribuye con el aporte de una nueva información para el conocimiento global del género *Tityus* de la familia Buthidæ.

En éste trabajo se determinaron los efectos del veneno total mediante prueba de efecto neuromuscular empleando dosis subletales con el objetivo de ver su neurotoxicidad, también se determinó la actividad antibacteriana y antifúngica a diferentes concentraciones (Karalliedde, 1995; Guerrero 2002; Jalali *et al.*, 2007; Borja-Oliveira *et al.*, 2008; Cologna *et al.* 2009; Fatani, 2010) revelando así una aplicación biotecnológica (Zhijian *et al.*, 2006; Zhu y Gao, 2006; Batista *et al.*, 2007; Rates *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2008).

La prueba antibacteriana se llevó a cabo con cepas GRAM positivas y GRAM negativas siguiendo las normas M100-S8 de la NCCLS denominadas ahora CLSI, con la cual se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Lequin *et al.*, 2006). La prueba antifúngica se evaluó por antifungigrama para levaduras, siguiendo el método EUCAST-AFST 2003 según norma M27-A de la CLSI. Por otra parte la actividad neurotóxica se llevó a cabo con la prueba del efecto neuromuscular sobre el músculo gastrocnemio del anfibio *R. marina* (Guerrero, 2002).

1. JUSTIFICACIÓN

En Colombia, a pesar de los pocos reportes, se presentan casos de escorpionismo de leves a graves resultando frecuentes (Otero *et al.*, 2004) y mortales especialmente en niños (Gómez *et al.*, 2002). Los Departamentos más afectados por esta situación son Antioquia y Tolima (Gómez *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2004; Gómez y Otero, 2007), en los que se ha realizado más esfuerzo por solucionar el problema mencionado. Para el Departamento del Cauca como en otros Departamentos del territorio Colombiano, los casos de escorpionismo son ajenos al conocimiento local, nacional y por ende internacional.

Con excepción del aporte realizado por Guerrero (2002) y el análisis proteómico con la caracterización del componente proteico del veneno de *T. pachyurus* en el trabajo de Barona *et al.* (2006), en Colombia, el aislamiento y la caracterización de los venenos de los escorpiones se encuentra nulo (Flórez, 2007). Por lo anterior se hace prioritario realizar investigaciones que contribuyan con el conocimiento de la actividad biológica del veneno escorpiónico (Omran, 2003;) aun no investigadas en Colombia, que puedan ser útiles para futuras aplicaciones biotecnológicas, farmacológicas (Karalliedde, 1995; Zhu y Gao, 2006; Tan *et al.*, 2006; Zhijian *et al.*, 2006; Jalali *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2007; Guerrero *et al.*, 2008; Rates *et al.*, 2008; Verano-Braga *et al.*, 2008; Nencioni *et al.*, 2009; Paneque-Peres *et al.*, 2009; Cologna *et al.* 2009; Adiguzel, 2010; Fatani, 2010) y sobre todo, para la salubridad de los residentes (Andrade *et al.*, 2007; De Roodt *et al.*, 2009). Además del aporte que se proporcione en conocimiento sobre el veneno de *Tityus* sp.

2. MARCO TEÓRICO

Los escorpiones son invertebrados pertenecientes al Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, Clase Arachnida y Orden Scorpionida (Gómez y Otero, 2007). Estos ejemplares se distinguen de los demás arácnidos por presentar pedipalpos desarrollados con una división distinta (opistosoma), la cual termina en el telson que contiene el par de glándulas venenosas y un aguijón inoculador de su veneno (Gómez y Otero, 2007; Flórez, 2007; Chippaux, 2008) ya sea para defensa o para capturar el alimento. Son de actividad nocturna, carnívoros y durante el día se encuentran ocultos. Son de hábitos extra-domiciliarios o intra-domiciliarios (Gómez *et al.*, 2002; Barona *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2004; Flórez, 2007).

La distribución geográfica de estos arácnidos es amplia (Omran, 2003) hasta las latitudes de 50 grados norte y sur (Gómez y Otero, 2007). Se encuentran agrupados en veintidós familias con 1500 especies conocidas aproximadamente (Otero *et al.*, 2004; Zhijian, *et al.*, 2006; Barona *et al.*, 2006; Jalali *et al.*, 2007, Gómez y Otero, 2007; Flórez, 2007; Batista *et al.*, 2007; Nencioni *et al.*, 2009; Cologna *et al.*, 2009; Adiguzel, 2010; Fatani, 2010). La familia de mayor interés toxicológico debido al efecto potente de su veneno (Flórez, 2007) y gran distribución, es Buthidæ estimada en 48 géneros y 500 especies. Dicha familia es de especial cuidado médico (Gómez *et al.*, 2002; Barona *et al.*, 2006) por los accidentes causados a nivel mundial (Omran, 2003; Otero *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2007; Gómez y Otero, 2007; Guidine *et al.*, 2008; Chippaux, 2008; Adiguzel, 2010; Fatani, 2010). Sus géneros más destacados por la acción del veneno son *Androctonus* y *Buthus* (Norte de África), *Buthotus* (Oriente), *Leiurus* (Medio Oriente), *Centruroides* (Norteamérica, Centroamérica y Norte de Suramérica) y el género de nuestro interés *Tityus* (Suramérica) (Otero *et al.*, 2004; Gómez y Otero, 2007; Borja-Oliveira *et al.*, 2008) que se representa en 29 especies para Colombia (Gómez 2002; Otero *et al.*, 2004; Barona *et al.*, 2006) de las cuales, las de mayor importancia medica son *T. asthenes*, *T. pachyurus*, *T. fuhrmanni* (Gómez y Otero, 2007).

El veneno de los escorpiones es una mezcla de componentes proteicos y no proteicos que contiene enzimas, nucleótidos, lípidos, aminos biogénicos y péptidos que causan actividad neurotóxica (Gómez *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2004; Zhu y Gao, 2006; Jalali *et al.*, 2007; Gómez y Otero, 2007; Guerrero *et al.*, 2008; Cruttenden *et al.*, 2008; Rates *et al.*, 2008 De Roodt *et al.*, 2009; Cologna *et al.* 2009; Adiguzel, 2010; Fatani, 2010). Estos últimos de mayor

interés por su efecto, se conforman en 4 familias que los representa según los canales iónicos celulares que afecten: Potasioescorpiotoxinas KScTx, Sodioescorpiotoxinas NaScTx, Cloroescorpiotoxinas ClScTx y Calcioescorpiotoxinas CaScTx (Karalliedde, 1995; Gómez *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2004; Zhu y Gao, 2006; Zhijian *et al.*, 2006; Barona *et al.*, 2006), y se distribuyen en 2 grupos. Un grupo contiene péptidos de cadena corta (con 31-39 aminoácidos), y el otro, los de cadena larga (con 61-70 aminoácidos). Por lo que el veneno de estos ejemplares puede producir algunos síntomas y signos como taquicardia, vómito, diaforesis, dolor abdominal, taquipnea, sialorrea, cianosis, hipertensión bradicardia, entre otros (Gómez *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2002; Omran, 2003; Otero *et al.*, 2004; Barona *et al.*, 2004; Gómez y Otero, 2007; Cruttenden *et al.*, 2008; Guidine *et al.*, 2008; Rodríguez, 2008; Chippaux, 2008; De Roodt *et al.*, 2009; Cologna *et al.* 2009; Adiguzel, 2010; Fatani, 2010).

Por otra parte, los microorganismos se representan entre los grandes grupos: Virus, Bacterias, *Fungi*, *Algæ*, y Protozoos. Sin embargo, de estos solo se estudiaron representantes de Bacterias y *Fungi* como agentes patógenos. La mayoría de bacterias y hongos poseen rígidas paredes celulares lo que les permite ser hipertónicos al hábitat. Los hongos generalmente tienen pared celular de quitina (polisacáridos con nitrógeno y residuos de N-acetilglucosamina), los que no, la tienen compuesta de celulosa. Las bacterias presentan diferentes características morfológicas: mientras unas especies tienen una gruesa pared de peptidoglycano por encima de su membrana celular (Gram+), otras cuentan con dos membranas guardando en su interior una delgada capa de peptidoglycano (Gram-). (Prescott, 2002)

Varias cepas se han convertido en importantes patógenos para el hombre, *S. aureus* puede producir meningitis e intoxicaciones alimentarias, *E. coli* puede producir problemas digestivos como diarreas, incluso la muerte y *P. aeruginosa* produce infecciones respiratorias. Los hongos patógenos como *C. albicans* y *C. krusei* pueden producir candidiasis, dermatitis en cavidad oral gastrointestinal o vaginal, debido a que se encuentran en dichas cavidades y las respiratorias (Buitrón García *et al.*, 2007). *C. neoformans* afecta el sistema nervioso central y puede producir linfadenitis y meningitis.

3. ANTECEDENTES

El veneno de los escorpiones pertenecientes al genero *Tityus* contienen las familias proteicas ya mencionadas. Prueba de ello lo ofrecen Arantes y colaboradores, (1994) que aislaron y determinaron una nueva neurotoxina del escorpión *T. serrulatus*, TsTX-V con un peso molecular de 7230 Daltons, capaz de inducir la inactivación de los canales de $[Na^+]$. Posteriormente, al realizar la purificación de la neurotoxina TsTX-VI del mismo escorpión, se observó que ésta toxina es extremadamente homóloga con la neurotoxina TsTX-I, la más letal presente en el veneno de *T. serrulatus*, esto sin contar que la Tityustoxina TsTX-IV, causa una excesiva liberación de neurotransmisores (Sampaio *et al.*, 1996), como lo pueden hacer toxinas homologas de especies de la familia Buthidae (Massensini *et al.*, 2003; Zhu y Gao, 2006; Jalali, *et al.* 2007; Chippaux, 2008; De Roodt *et al.*, 2009; Nencioni *et al.*, 2009; Paneque-Peres *et al.*, 2009; Cologna *et al.* 2009; Adiguzel, 2010; Fatani, 2010), produce lo que se conoce como efecto inotrópico positivo sobre músculo estriado (Borja-Oliveira *et al.*, 2008) .

Especialmente para Colombia, un primer aporte en el campo del fraccionamiento del veneno y su aplicación toxicológica, es el trabajo de Guerrero (2002) con escorpiones *Centruroides margaritatus* colectados en el sector del Valle del Patía, Cauca. El veneno fue fraccionado mediante HPLC, obteniéndose 9 fracciones con 52 proteínas diferentes. Se emplearon las fracciones II, III, IV y V para realizar ensayos fisiológicos pues fueron las de mayor concentración y se estudió su efecto en el músculo gastrocnemio de *R. marina*. Las fracciones más relevantes en el procedimiento fueron II y V que eliminaron las contracciones musculares generadas por un umbral de 0.02 Voltios, mientras la fracción IV en un principio aumentó la amplitud de la contracción muscular y posteriormente la eliminó. Además, se estimó la DL_{50} en 42.83 mg/kg en ratones cepa ICR; otro trabajo es el de Batista *et al* (2002) que mediante aplicación de cromatografía líquida (HPLC) separa el veneno total del escorpión Amazónico *Tityus cambridgei* fraccionándolo en 50 diferentes componentes, de los cuales cuatro péptidos se concibieron letales, identificándose el efecto sobre la permeabilidad de los canales de Sodio. Usando las técnicas ya mencionadas, Barona *et al* (2006) separa 57 fracciones con 104 componentes de diferentes masas moleculares del veneno de la especie *T. pachyurus* de Colombia, de los cuales tres fueron secuenciados encontrándose la acción de éstos sobre los canales de Sodio y Potasio. Dicha acción neurotóxica también es causada por el veneno de

diferentes especies del género *Tityus*, donde se ha encontrado hasta un 84% de similitud en la secuencia de los péptidos analizados (Batista *et al.* 2002).

Por otro lado, el veneno de los escorpiones además de alterar las membranas excitables, también actúan como antimicrobianos (Zhu y Gao, 2006; Rates *et al.*, 2008). Yount *et al.* (2006), manifiestan que existen diversas moléculas aisladas de un sinnúmero de organismos que cumplen con esta importante función, sugiriendo que dichos péptidos han tenido alguna relación filogenética entre los organismos y sus agentes patógenos; estos péptidos poseen características biofísicas en común como tamaños pequeños, carga positiva y característica anfipática. Los péptidos en mención actúan sobre las membranas plasmáticas y las paredes celulares de hongos y bacterias además de actuar sobre posibles objetivos intracelulares de estos y otros microorganismos. De igual manera, Jenssen *et al.* (2006) informa la presencia de innumerables moléculas antimicrobianas producidas desde los mismos microorganismos pasando por plantas, hasta organismos superiores incluyendo el hombre. Las características de estos péptidos de carga positiva y eventualmente anfipáticos, sirven al sistema inmune de los hospederos ante cualquier agente patógeno (bacterias, virus, hongos y otros parásitos). La actividad de dichas moléculas depende además, de las características estructurales como ser de cadenas cortas y catiónicas, estimulando la creación de promisorios agentes terapéuticos. Un ejemplo de la función de estos péptidos es el Dermaseptin, una molécula antimicrobiana aislada de la secreción cutánea de anfibios que cumple con las cualidades funcionales y estructurales ya mencionadas.

Particularmente en el veneno de los escorpiones, se encuentran péptidos con dichas características. Zhijian *et al.* (2006), informa que además de la presencia de moléculas que actúan sobre canales iónicos como Sodio, Potasio y Calcio, existen otros tipos de péptidos que cumplen entre otras funciones, la antimicrobiana y fortalece la idea que existe alguna relación entre estas proteínas con un Gen ancestro en común que se ha diversificado debido a los variados procesos genéticos. Barona *et al.* (2006), comunica la actividad antibacteriana de algunos péptidos escorpiónicos: Hadrurin y Escorpina. Además de estos, otros péptidos como Parabutoporin y Opistoporin son reportados en la publicación de Guerrero *et al.* (2008). Por su parte, Rates *et al.* (2008) con la separación proteica, análisis y secuenciamiento de péptidos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF, en *T. serrulatus* determina la presencia de Hypotensin (péptido que disminuye los niveles de presión) sumado a otra cantidad de péptidos de cadena corta y que pueden tener características antimicrobianas. Con el avance de la tecnología, se han creado herramientas como bases de datos (Tan *et al.*, 2006) en los cuales se

incorporan las características de todas las proteínas hasta el momento aisladas y analizadas con el fin de agilizar futuros estudios de otras proteínas por identificar.

Vistas las cualidades biofísicas, bioquímicas y estructurales de los componentes que poseen los venenos de los escorpiones, es de tener en cuenta que son un tema de interés médico, pues estos arácnidos por lo general están en contacto con la población humana (Rodríguez, 2008), por lo que se presenta escorpionismo (De Roodt *et al.*, 2009; Adiguzel, 2010; Fatani, 2010). Los accidentes de este tipo siempre se han presentado, pero los pocos reportes contienen cifras considerables. En 1995 Karalliedde informa en su artículo “toxinas animales”, la epidemiología, toxicología y tratamiento de los venenos de origen animal a nivel global, entre los que menciona el accidente escorpiónico de Méjico, Brasil, Israel, Trinidad, Argelia, India y Jordania. También reporta cifras de accidentes de esta naturaleza como los 38068 casos por picadura de escorpión en la ciudad de León, Méjico en un lapso de 5 años con un rango de 1000 a 2000 muertes en el mismo país. Chippaux (2008), informa que 2.3 billones de personas de la población mundial están en riesgo de accidente de las cuales 1.2 billones sufren escorpionismo, de las que 3250 mueren y la población de mayor riesgo es la infantil (De Roodt *et al.*, 2009). Además de estos, otros casos de escorpionismo grave a nivel mundial son reportados por muchos autores (Gómez *et al.*, 2002; Omran, 2003; Barona *et al.*, 2004; Barona *et al.*, 2006; Gómez y Otero, 2007; Andrade *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2007; Guidine *et al.*, 2008; Borja-Oliveira *et al.*, 2008; Cruttenden *et al.*, 2008; Cologna *et al.*, 2009; Adiguzel, 2010).

En Colombia existe información de casos graves de envenenamiento por escorpiones en el Valle del Alto Magdalena y en el Departamento de Antioquia. La población con más riesgo de envenenamiento sistémico, con complicación y muerte son los niños menores de 10 años (Otero *et al.*, 1988). Por su parte, Gómez *et al.* (2002) realizan un estudio del ejemplar *T. fuhrmanni* que reside en un barrio de la ciudad de Medellín determinando las características toxicológicas, clínicas y epidemiológicas producidas por el envenenamiento. Los resultados indican una elevada presencia intradomiciliaria de estos ejemplares y por ende una considerable accidentalidad sobre todo en menores de 11 años. Sin embargo, ninguno de los pacientes presentó complicaciones por picadura de escorpión.

Barona *et al.* (2004) realiza un estudio de tres antivenenos producidos en Venezuela, México y Brasil para evaluar la capacidad inmunoquímica sobre el veneno de *T. pachyurus* en Colombia. Los resultados permiten concluir que el veneno de este escorpión es neutralizado eficientemente por los

antivenenos contra picaduras de escorpiones producidos en México y Brasil. Simultáneamente Otero *et al.* (2004), realizan un estudio a nivel de dos Departamentos de Colombia: Antioquia y Tolima, zonas sobre las cuales se encuentran varias especies del género *Tityus* y que por investigaciones anteriores han sido las más referenciadas del país en lo que refiere al tema. Este estudio muestra los resultados por escorpionismo de 10 sitios diferentes de Antioquia y 5 sitios de Tolima en los cuales el 70.5% de los accidentes ocurrió en las residencias y una considerable cantidad ocurrió en menores de edad. Aunque algunos de los pacientes presentaron complicaciones por picadura de escorpión, no se reportan muertes.

Si bien es cierto que hay trabajos referentes a la toxínología del veneno escorpiónico y la epidemiología de escorpionismo en Colombia, aún faltan muchos estudios sobre el tema para saber cuál es el verdadero impacto médico y epidemiológico a nivel nacional. Gómez y Otero (2007) y Rodríguez (2008) corroboran esta afirmación y expresan que los escorpiones presentan una alta adaptabilidad al medio artificial generado por el hombre, debido a su plasticidad ecológica, biología y amplia distribución.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad neurotóxica y antimicrobiana del veneno total del escorpión *Tityus* sp. para aportar al conocimiento en el campo biológico, biotecnológico, farmacéutico y medicinal.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la actividad neurotóxica del veneno total del escorpión *Tityus* sp. a tres concentraciones subletales DL₅₀ de *T. pachyurus* en una preparación del músculo gastrocnemio del anfibio *R. marina*.
- Evaluar la actividad antibacteriana del veneno total del escorpión *Tityus* sp. frente a bacterias grampositivas (*S. aureus*) y gramnegativas (*E. coli* y *P.s aeruginosa*).
- Evaluar la actividad antifúngica del veneno total del escorpión *Tityus* sp. frente a las especies *C. albicans*, *C. krusei* y la especie *C. neoformans*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. COLECTA DE EJEMPLARES

La colecta de los escorpiones se realizó en la zona central del Municipio de Popayán, concretamente en el Puente del Humilladero. Debido a los hábitos nocturnos de estos artrópodos, dicha labor se llevó a cabo entre las 7:00 y las 11:00 de la noche con ayuda de una lámpara de luz negra que permitió observarlos rápidamente en la oscuridad. Para su captura se emplearon pinzas con el fin de evitar accidentes, y posteriormente fueron aislados de su medio en cajas individuales de plástico para luego desplazarlos a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca CIBUC. La colecta total correspondió a 25 individuos en un lapso de 45 días (14 de agosto a 28 de septiembre de 2009). La escasa presencia de éstos animales, posiblemente es debido a su hábitat, el Puente del Humilladero, una estructura en la que se presenta espacios grandes donde se brinda fácil oferta alimentaria sin necesidad de que el escorpión tenga que salir a cazar sus presas.

La colecta de los anfibios *R. marina* se realizó en la salida sur del Municipio de Timbío-Cauca en un humedal cercano. La captura de los ejemplares fue entre las 7:00 y las 10:00 de la noche debido a sus hábitos nocturnos. La búsqueda se efectuó con ayuda de lámparas de luz blanca, además de seguir el canto efectuado por los machos, una vez colectados se depositaron en bolsas de tela humedecidas para transportarlos al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC). Todos los individuos en la experimentación fueron machos que pesaron entre los 110-120g.

5.2. MANTENIMIENTO DE LOS ESCORPIONES

Los escorpiones colectados se mantuvieron en cautiverio (Figura 1) en las instalaciones del CIBUC ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca. Fueron mantenidos en terrarios de plástico donde se simuló un microhábitat similar al natural. Se suministró agua fresca

cada cuatro días en algodón humedecido y se alimentaron cada semana con otros arácnidos e insectos vivos. Las condiciones de humedad y temperatura se registraron para su adecuación durante este tiempo de cautiverio.

Figura 1. Cautiverio de escorpiones en cajas plásticas aireadas y con algodones humedecidos.



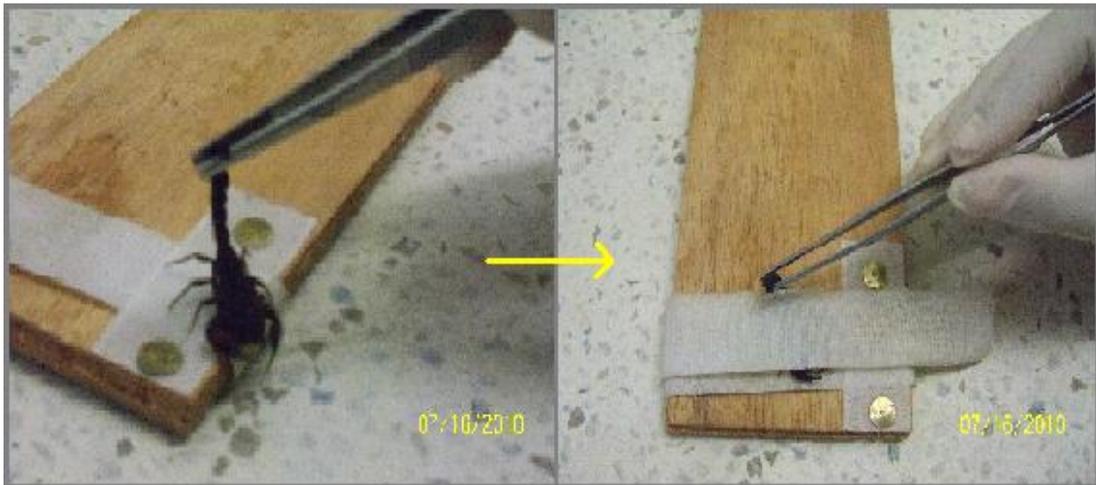
Fotografía: Edwin Coral. Cortesía CIBUC.

5.3. OBTENCIÓN DEL VENENO

El veneno se obtuvo de una población de veinticinco (25) escorpiones realizando estimulación periódica dejando mínimamente un mes de reposo entre extracción y extracción de veneno. Se aplicó estimulación eléctrica con corriente directa sobre el telson del escorpión, empleando un generador de impulsos eléctricos Lafayette Instruments Company 824151S. Cada escorpión se inmovilizó del tórax y parte del opistosoma con una cinta de tela adherida a una base de madera que proporciona rigidez, mientras se sujetó con ayuda de pinzas los últimos segmentos del metasoma (Figura 2), se procedió a estimular por cinco veces y el veneno obtenido del aguijón se depositó en tubos Eppendorf de 1.5mL. Repetido el procedimiento se reunió un pool o cantidad necesaria de veneno para cuantificar y liofilizar. El veneno

se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y obtenida la cantidad necesaria y conocida, se purificó aforando con agua destilada estéril hasta un volumen conocido. Posteriormente se centrifugó, luego se trasladó el sobrenadante (veneno puro) del tubo centrifugado a otro tubo estéril y se continuó con el proceso de cuantificación de proteínas.

Figura 2. Extracción de veneno de los escorpiones.



Fotografía: Jeniffer Tovar. Cortesía CIBUC.

5.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

La cuantificación de proteínas se realizó según el método de Biuret 1967, con modificación. Del tubo con veneno purificado se tomó un volumen conocido, se interpoló entre las concentraciones patrón y se calculó la concentración de la solución con veneno en un espectrofotómetro (Genesys espectro). Se realizaron los cálculos y se separó en diferentes alícuotas para posteriormente liofilizar (liofilizador Freezed). Este procedimiento permitió tener en reserva el veneno que se utilizó en las diversas pruebas bajo una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5. PRUEBA ANTIBACTERIANA POR MICRODILUCIÓN

Esta práctica se realizó en los laboratorios de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca y el método evaluó crecimiento bacteriano *in vitro*. La experimentación por microdilución permitió la máxima reducción en el requerimiento de reactivos y veneno. Esto redujo un impacto ambiental desde la utilización de los animales experimentales hasta la minimización en la generación de residuos o agentes de riesgo biológico.

En esta práctica a partir de la norma internacional establecida (M100-S8 y las actualizaciones del M7 de la National Committee for Medical Laboratory Standards NCCLS) actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), se adaptó la prueba para trabajar con el veneno sobre una serie de placas de ELISA en las que se incluyó medio de cultivo estéril para: la celda sin inóculo en la que no hubo crecimiento bacteriano (control de esterilidad), la celda de crecimiento bacteriano (control de crecimiento), la celda con un antibiótico conocido (control positivo) y diluyendo a diferentes concentraciones el veneno completo (muestra problema), los cuales se inocularon con una suspensión de agentes bacterianos (tres cepas) en Caldo Mueller Hinton al grado de turbidez 0.5 en la escala MacFarland diluidos a razón 1:20 en agua destilada para evaluar el crecimiento *in vitro*.

5.5.1. Agente antibacteriano

El agente antibacteriano utilizado fue un antibiótico conocido que inhibió el crecimiento bacteriano y la prueba problema fue el veneno del escorpión *Tityus* sp. a ocho diferentes concentraciones, apoyados en la norma M100-S8 de la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI):

Como control positivo para la cepa *P. aeruginosa* se utilizó cloranfenicol a una concentración de 2mg/mL. Para las cepas *E. coli* y *S. aureus* se utilizó Trimethoprim Sulfamethoxazole a una concentración de 2mg/mL.

5.5.2. Preparación del veneno a evaluar

El veneno liofilizado se reconstituyó en agua desionizada estéril hasta obtener una concentración de 2mg/mL. Esta preparación se realizó con poco tiempo de anticipación a la práctica de microdilución, pues las características bioquímicas del veneno comienzan a perderse a temperaturas inadecuadas y en solución.

5.5.3. Turbidez adecuada del inóculo

Para realizar la prueba de crecimiento bacteriano *in vitro*, fue necesario que la suspensión de cada cepa bacteriana (*S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*) a estudiar tuviera una concentración definida. Inicialmente de las colonias de un cultivo puro de cada cepa en caja de Petri se inoculó con un asa a una solución de caldo Mueller Hinton. La comparación de turbidez se realizó en un espectrofotómetro llamado turbidímetro buscando un patrón de BaSO₄ equivalente al control de 0.5 MacFarland, las cuales contuvieron aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por cada mililitro de solución). Posteriormente de ésta suspensión bacteriana se diluyó una cantidad a razón 1:20 en solución de agua destilada estéril, por lo que la concentración bacteriana disminuyó hasta 5 x 10⁵ UFC/mL. El tiempo límite luego de la preparación del inóculo para cultivo en la placa de ELISA para evaluación de la prueba fue de 15 a 20 minutos, pues las cepas se encontraban en una solución hipotónica lo que podía producir su muerte (actualización norma M7 CLSI).

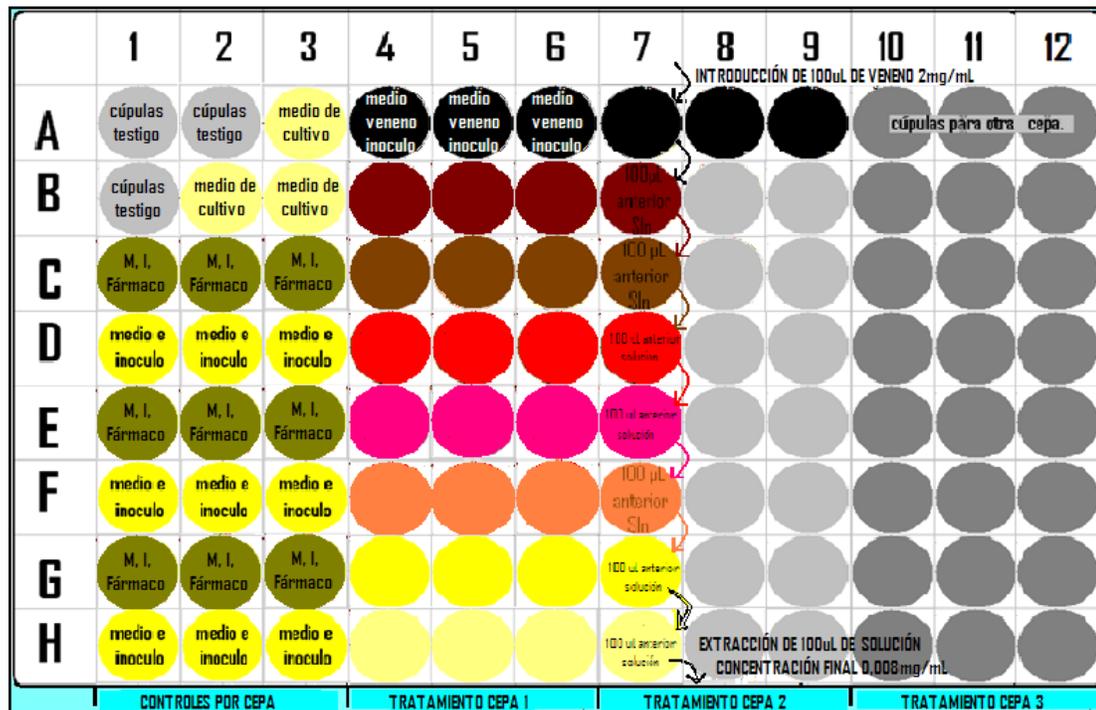
5.5.4. Método de microdilución

En una campana de flujo laminar Labconco bajo todas las condiciones de esterilidad y con la indumentaria necesaria se realizó la prueba.

Sobre los pozos de cada Placas de ELISA esterilizadas se depositaron 100µL del medio de cultivo (infusión cerebro corazón BHI) estéril previamente preparado dejando para cada placa tres pozos sin medio. Este procedimiento permitió comparar la absorbancia de pozos vacíos con los ocupados en la lectura del equipo. Con el medio distribuido en los pozos se incluyeron los tratamientos antibacterianos (fármaco) en un volumen de 100µL homogenizando con micropipeta y extrayendo de nuevo el volumen inoculado (figura 3), es decir, se realizó la dilución homogeneizada de veneno partiendo desde 2mg/mL hasta la octava concentración mas diluida correspondiente a 0.008mg/mL. Al final, se descartó el mismo volumen (100µL) inoculado de cada tratamiento posterior a la homogeneización.

Finalmente, en los pozos, la concentración de todos los tratamientos disminuye a la mitad de la inoculada, debido a que se realiza una dilución de una solución inicial de 100 µL (2mg/mL) del tratamiento, en 100 µL del medio de cultivo más 10 µL de la cepa a estudiar.

Figura 3. Representación de una placa de ELISA cultivada con agentes patógenos y sus tratamientos. Para las cepas con tratamiento de veneno se comienza a una concentración de 1mg/mL desde el pozo A₄ hasta el pozo A₁₂, disminuye su concentración en los pozos H₄ a H₁₂ hasta 0.0078mg/mL aproximadamente después de homogeneizar y extraer los últimos 100 µL de tratamiento a medida que se desciende por la placa de ELISA.



Teniendo en cuenta solo la concentración del veneno o tratamiento problema, la solución se muestra de la siguiente manera al inocular la placa de ELISA: Se depositan 100 μ L de veneno a una concentración de 2mg/mL en el primer pozo, mas los 100 μ L de medio BHI previamente depositado en el pozo donde se diluyó a una concentración de 1mg/mL, continua el siguiente pozo a 0.5 mg/mL, y sucesivamente a 0.25mg/mL, 0.125mg/mL, 0.0625mg/mL, 0.03125mg/mL, 0.015625mg/mL y 0.0078125mg/mL.

Realizada la mezcla de las respectivas cepas con las diversas concentraciones de veneno, la droga inhibitoria y el control de crecimiento sin fármaco, más el pozo de control de esterilidad en las diferentes placas, se procedió a incubar por un intervalo de 16 a 20 horas a 35⁰C. Las placas con las muestras no se apilaron y se cubrieron con papel Parafilm buscando uniformidad de temperatura y aislamiento. Posterior a la incubación se tomó la absorbancia de las placas en un lector de ELISA (Thermo Electron Corporation original Multiskan EX) calibrado a una longitud de onda (620 nm) para su análisis.

5.6. PRUEBA ANTIFÚNGICA POR ANTIFUNGIGRAMA PARA LEVADURAS

Esta prueba se llevó a cabo por un procedimiento similar a las técnicas de microdilución señaladas en la práctica antibacteriana, a diferencia que se utilizó el medio semisólido ATB (Antibiograma) F3. Las características del medio en ésta prueba difirieron con la prueba anterior debido a que los organismos a estudiar, son de grupos taxonómicos diferentes y esto implica que cada uno tiene sus propios mecanismos bioquímicos. La ventaja de la utilización de esta técnica incluye las ya mencionadas, para la prueba de susceptibilidad antibacteriana.

5.6.1. Agente antifúngico

El agente antifúngico utilizado fue Amfotericina, un antibiótico conocido que inhibió el crecimiento del patógeno La sustancia a evaluar con posible actividad antifúngica fue nuevamente el veneno del escorpión *Tityus* sp. a

diferentes concentraciones siguiendo las recomendaciones del método EUCAST-AFST 2003 según norma M27-A y la actualización de la norma M7 del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI).

5.6.2. Preparación del veneno a evaluar

El veneno liofilizado del escorpión *Tityus* sp. se diluyó en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 2mg/mL, a partir de la cual se inoculó como tratamiento en la placa de ELISA, preparando las ocho concentraciones diferentes a razón de ½ dentro del medio de cultivo, para efectos de evaluación del crecimiento fúngico.

5.6.3. Turbidez adecuada del inóculo

La prueba de crecimiento fúngico *in vitro* tuvo una concentración definida. La comparación de turbidez se realizó en un espectrofotómetro (turbidímetro) buscando el patrón 0,5 de MacFarland, posterior a una suspensión en medio NaCl 0.85% de un cultivo por separado de colonias puras de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. neoformans* que no sobrepasaban los 4 días de preparación. Obtenida esta suspensión fúngica se diluyó una cantidad a razón 1:20 en solución de agua destilada estéril, por lo que la concentración fúngica disminuyó hasta 5×10^5 UFC/mL Unidades Formadoras de Colonias por cada mililitro de solución. El tiempo límite luego de la preparación del inóculo para cultivo en la placa de ELISA fue de 15 a 20 minutos, pues las cepas se encontraban en una solución hipotónica lo que podía producir su muerte (actualización norma M7 de la CLSI).

5.6.4. Método de antifungigrama para levaduras

Siguiendo el mismo patrón de microdilución antibacteriana, el medio ATB (Antibiograma) F3 (7mL por ampolla) se inoculó en los pocillos de la placa de ELISA distribuyendo 100 μ L por pozo dejando libres tres pocillos en la parte superior izquierda de la placa. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de la solución de veneno preparada a una concentración de 2 mg/mL, que luego de ser depositada en el primer pozo queda a una concentración de 1 mg/mL, luego se procedió a diluir por micropipeteo hasta obtener ocho tratamientos, siendo el de menor concentración el equivalente a 0,0078 mg/mL. También se agregó el antibiótico en los pozos correspondientes dejando las cúpulas en control de esterilidad sin inóculo ni antibiótico alguno. Al final, se descartó el mismo volumen inoculado (100 μ L) de cada tratamiento posterior a la homogenización. Por último, teniendo en cuenta el tiempo límite para el uso de la suspensión preparada, se sembró en cada pocillo de tratamiento 10 μ L de suspensión fúngica (Figura 3).

De igual manera que las bacterias, la concentración de todos los tratamientos disminuye a la mitad de la inoculada, debido a que se realiza una dilución de una solución inicial de 100 μ L (2mg/mL) del tratamiento, en 100 μ L del medio de cultivo más 10 μ L de la cepa a estudiar.

Teniendo en cuenta solo la concentración del veneno o tratamiento problema, la solución se muestra de la siguiente manera al inocular la placa de ELISA: se depositan 100 μ L de veneno a una concentración de 2mg/mL en el primer pozo, más los 100 μ L de medio de ATB previamente depositado en el pozo se diluyó a 1mg/mL, continua el siguiente pozo a 0.5mg/mL, y sucesivamente a 0.25mg/mL, 0.125mg/mL, 0.0625mg/mL, 0.03125mg/mL, 0.015625mg/mL y 0.0078125mg/mL.

Realizada la mezcla de agentes fúngicos con la droga inhibitoria y las diversas concentraciones de veneno, el medio estéril y el control crecimiento sin veneno, se remitió a incubación por un intervalo de 20 a 24 horas a 35⁰C. Las placas de ELISA con las muestras se cubrieron buscando uniformidad de temperatura y aislamiento. Posterior a incubación, se tomo la absorbancia de las placas en un lector de ELISA (Thermo Electron Corporation original Multiskan EX) calibrado a una longitud de onda (620 nm) para su análisis.

5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ESTADÍSTICO ANTIMICROBIANO

Se aplicó además de estadística descriptiva buscando una media y la desviación estándar de las repeticiones, un diseño de bloques con prueba no paramétrica. Para tales pruebas se realizó el procedimiento de cada cepa microbiana a evaluar. En una placa de ELISA se cultivaron las tres cepas bacterianas y en otra, las tres cepas fúngicas. Para cada microorganismo, por triplicado se realizaron tres repeticiones, en donde para cada placa se estableció: un control negativo (control de crecimiento que se reporta en los resultados como 0 mg/mL de veneno del escorpión *Tityus* sp.), el control positivo (fármaco inhibitorio), el control de esterilidad (control de contaminación en la placa de ELISA) y los tratamientos problema (veneno de escorpión evaluado a 8 concentraciones diferentes). Al final se obtuvo con tratamiento un total de nueve datos por agente patógeno a sus diferentes concentraciones.

Los datos obtenidos fueron analizados con el software estadístico SPSS (Statistical Package to Social Scientific) versión 11.5, en el que se aplicó un diseño de bloques no aleatorios. Se realizó un análisis de correlación de Spearman con curva de mejor ajuste y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La pretensión de estas pruebas fue relacionar la concentración del veneno con el crecimiento microbiano *in vitro*, además de realizar pruebas de comparaciones múltiples entre los tratamientos para establecer significancia estadística.

5.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROMUSCULAR SOBRE EL ANFIBIO *Rhinella marina* CON EL VENENO TOTAL DE *Tityus* sp.

Con el objetivo de evaluar el efecto neurotóxico en una preparación de músculo gastrocnemio del anfibio *R. marina*, se prepararon tres concentraciones del veneno de la especie *Tityus* sp. en solución Ringer anfibio a partir de la DL_{50} de la especie *T. pachyurus*, una especie cercana taxonómicamente. La concentración alta se estableció por la dosis subletal correspondiente al 75%, la media 50% y la baja 25% de la DL_{50} de *T. pachyurus* para.

5.8.1. Preparación músculo gastrocnemio

La prueba se realizó *in vivo* tomando 3 ejemplares de anuros *R. marina* siguiendo por tratamiento el procedimiento efectuado por Guerrero (2002), todo el procedimiento se llevó a cabo bajo lineamientos bioéticos para el ejemplar. La dosis letal cincuenta (DL₅₀) de la especie *T. pachyurus* equivale a 4.8 mg/kg (Barona *et al.*, 2004), y las dosis correspondientes fueron inyectadas directamente en cada músculo al igual que el blanco (solución isotónica Ringer anfibio). Durante el procedimiento constantemente se roció el músculo con la solución isotónica, por protección del mismo y ofrecer una adecuada contracción muscular.

5.8.2. Medición de la prueba

Para el procedimiento se utilizó un fisiógrafo (Mini graph) acompañado de un software (Chart5sp). El primero se calibró con una ganancia (1000) y una sensibilidad (5), el segundo, con rango (1V), con filtro de red y filtro (5Hz). Realizado el montaje del biomodelo, con el electroestimulador se realizó la estimulación del músculo gastrocnemio calibrado a una duración de 20 milisegundos, 4 Eventos y un voltaje de 0.2 voltios, umbral de estimulación del músculo. El procedimiento generó una curva (electromiograma) por músculo tratado durante una hora. De dicha curva se tomó como su amplitud la contracción realizada por el músculo en proceso CMA, mientras que la longitud de la misma indicó el tiempo transcurrido TCM. Por lo que estos datos extraídos de cada curva permitieron unos resultados para su proceso: la evaluación del comportamiento de cada músculo en sus diferentes concentraciones en el lapso de una hora midiendo a intervalos de 5 minutos, de igual manera, que la alteración en la contracción muscular entre los diferentes tratamientos.

5.8.3. Indicadores

Se tomó sobre la base de los datos arrojados por la curva, la contracción muscular CMA (Hertz) y el tiempo de contracción TCM (segundos),

parámetros cuantitativos que se utilizaron para determinar la significancia estadística de los tratamientos aplicados y confirmar la alteración de la contracción en cada músculo. Con sólo el indicador CMA se verificó el comportamiento muscular durante el tiempo de procedimiento.

5.9 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ESTADÍSTICO NEUROTÓXICO

A los anuros *R. marina* se les aisló el músculo gastrocnemio de sus dos extremidades posteriores. Estos músculos fueron evaluados con el control (solución Ringer anfibio que se reporta en los resultados como 0% de veneno del escorpión *Tityus* sp.) y los tratamientos problema (tres concentraciones de veneno del escorpión *Tityus* sp.). Se requirieron tres individuos por tratamiento con el fin de minimizar el número de biomodelos a experimentar. Con las curvas obtenidas, además de desarrollar estadística descriptiva utilizando media y desviación estándar de las repeticiones se planteó un diseño de bloques con prueba no paramétrica. A cada músculo se le realizó una medición en un fisiógrafo donde se mostró una curva en la que se refleja la contracción muscular y el tiempo en el que el músculo se mantuvo contraído. El primer parámetro se observa en la amplitud de la curva, mientras el segundo, con el tiempo transcurrido en la posición de la misma.

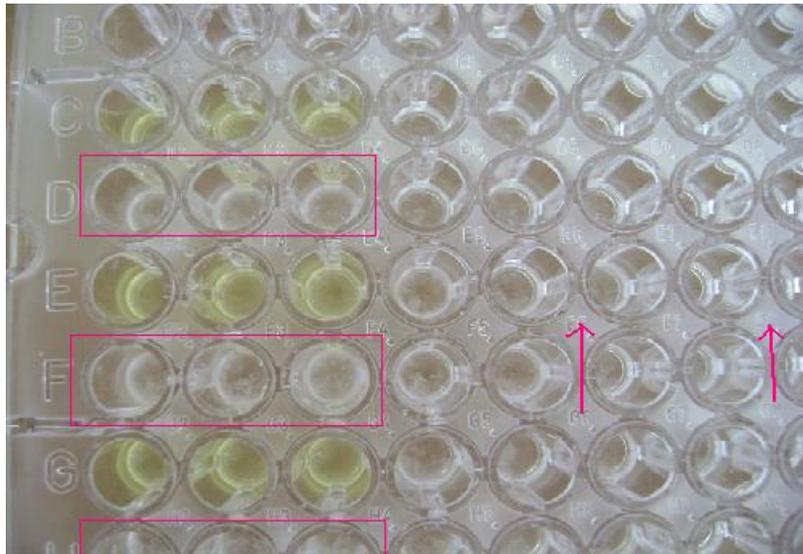
Los datos obtenidos fueron analizados con el software estadístico SPSS (Statistical Package to Social Scientific) versión 11.5, en el que se aplicó un diseño de bloques. Se utilizó un análisis de correlación de Spearman con curva de mejor ajuste y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La pretensión de estas pruebas fue relacionar la concentración del veneno con la alteración en la contracción muscular, además de realizar pruebas de comparaciones múltiples entre los tratamientos para establecer significancia estadística.

6. RESULTADOS

6.1. EVALUACIÓN MICROBIANA

Para las pruebas de inhibición de crecimiento de los dos microorganismos (bacterias y hongos) se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria MIC de cada especie objeto de estudio, como aquella concentración más baja en la que se observa una disminución de la absorbancia igual o superior al 50%, con respecto al control de crecimiento.

Figura 4. Placa de ELISA con cultivo de levaduras patógenas y los tratamientos. Se observa claramente dentro de los rectángulos el crecimiento. También se detalla que los pozos tratados con veneno, disminuyen su crecimiento visible *in vitro*.



Fotografía: Fabián Hurtado. Cortesía CIBUC

6.2. ANTIBACTERIANO

Los resultados para las tres cepas patógenas se describen como siguen:

No hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los tres procedimientos realizados en el tiempo (bloque) por cada cepa, mientras que se presentó significancia ($p = 0,000$) del valor de absorbancia entre cepas: comparando entre *E. coli* y *P. aeruginosa* ($p = 0,027$); entre *E. coli* y *S. aureus* ($p = 0,000$); y entre *P. aeruginosa* y *S. aureus* ($p = 0,000$). El primer valor de significancia indica que los bloques se comportan de forma similar y que por tanto hay reproducibilidad. Lo segundo, indica que cada especie de bacteria estudiada tiene su propio comportamiento de crecimiento frente a la misma dosis suministrada del tratamiento problema. Sin embargo, es de notar que la significancia disminuye solo entre las cepas *E. coli* y *P. aeruginosa*, la razón pueda estar en que dichas pertenecen a un mismo grupo (Gram-) mientras que la cepa *S. aureus* pertenece al grupo (Gram+).

6.2.1. *Escherichia coli* ATCC 25922.

Esta cepa presentó una marcada diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (Tabla1). En la prueba de comparaciones múltiples, la significancia ($p = 0,000$) entre el control positivo (cepa con fármaco antibacteriano) y los demás tratamientos fue idéntico, pero la diferencia comparativa del control negativo (cepa en crecimiento) con los tratamientos problema (concentración de veneno) solo fue significativo ($p \leq 0,027$) en las concentraciones (1 y 0.016 mg/mL), mientras que entre los mismos tratamientos problema las concentraciones (1 mg/mL vs. las demás concentraciones, excepto 0,5 mg/mL) y (0,031 vs. 0,016) fueron significantes ($p \leq 0,038$). El primer parámetro indica que el tratamiento problema tiene una acción, no deducible si débil o fuerte, sobre el crecimiento de esta especie de bacteria *in vitro*, el segundo afirma que se presenta una acción mas marcada sobre el crecimiento de la cepa de dos de los tratamientos problema (1 y 0.016 mg/mL), frente a los demás (Tabla1). En ésta se listan el promedio de crecimiento bacteriano con sus respectivas medidas de variabilidad y tamaño de muestra obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *Tityus* sp. y el control negativo.

Tabla1. Promedio de crecimiento bacteriano (*E. coli*) con veneno de *Tityus* sp.

[] de veneno mg/mL	promedio crecimiento± error típico (n)	desviación estándar
control negativo	0,70± 0,00 (9)	0,027
0,008	0,71± 0,02 (9)	0,080
0,016	0,66 ± 0,01 (9)*	0,033
0,031	0,72± 0,02(9)	0,067
0,063	0,69± 0,01(9)	0,045
0,125	0,69± 0,00 (9)	0,021
0,250	0,76 ± 0,04 (9)	0, 137
0,500	0,64± 0,02(9)h	0,071
1,000	0,60± 0,02(9)*	0,071
p= 0.006		

n = Tamaño de muestra.

* Concentraciones de veneno para las cuales el crecimiento bacteriano difiere significativamente respecto al control negativo determinado mediante prueba *U de Mann Whitney*.

h = nivel umbral de significancia prueba *U de Mann Whitney*.

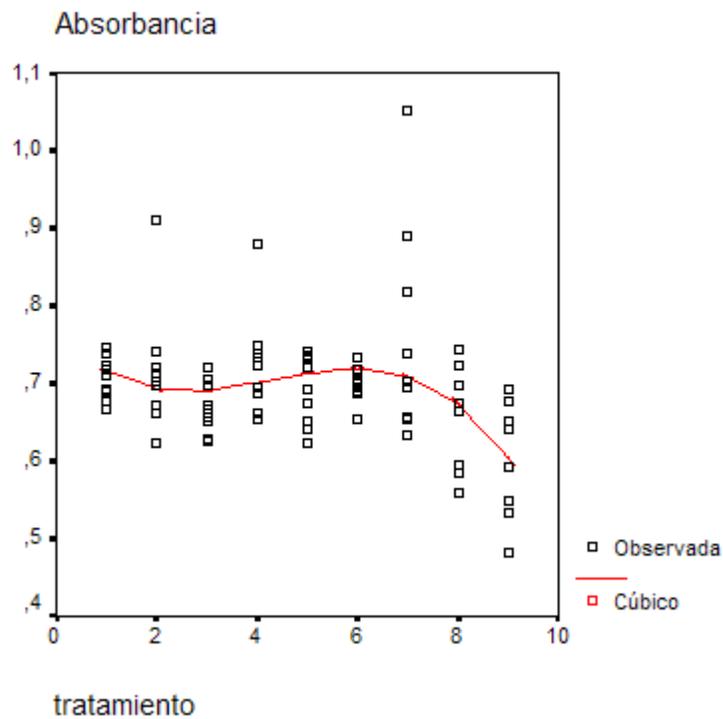
p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

En cuanto al comportamiento del crecimiento de esta cepa frente a las diferentes dosis de veneno (Figura 5), la estimación curvilínea se ajusta a una curva tipo cúbica con una significancia ($p= 0.006$), además de un coeficiente de correlación de *Spearman* (-0,305) que indica que conforme aumenta la concentración del tratamiento problema, disminuye muy levemente el crecimiento *in vitro* de esta especie de bacteria.

La relación de tipo cúbica se describe mediante la ecuación el crecimiento bacteriano (Absorbancia):

$A = 0,769 - 0,0718(\text{concentración codificada}) + 0,0199(\text{concentración codificada})^2 - 0,0015(\text{concentración codificada})^3$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,184$, indicando que la variabilidad de la absorbancia depende en un 18,4% de la variabilidad de la concentración de veneno codificado. Lo que al final explica la poca efectividad que tiene el tratamiento problema frente al crecimiento de esta especie bacteriana.

Figura 5. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (*E. coli*). La codificación del tratamiento problema (veneno) sobre el eje x está dado en su orden ascendente: 1= 0mg/mL, 2= 0.0078mg/mL, 3= 0.016mg/mL, 4 = 0.031mg/mL, 5= 0.063mg/mL, 6= 0.125mg/mL, 7= 0.25mg/mL, 8= 0.5mg/mL, 9= 1mg/mL.



Adicionalmente, la MIC esperada se reporta para este trabajo como parámetro a manera de soporte de las normas internacionales CLSI.

MIC: $0.70/2=0.35$, no hay MIC, pues esta especie tuvo un mínimo en crecimiento *in vitro* que la supera casi el doble y corresponde a la dosis de 1 mg/mL de veneno depositado.

Finalmente, se puede deducir que de los tratamientos problema, solo las dosificaciones (1 y 0.016 mg/mL) causaron una disminución del crecimiento *in vitro* de *E. coli*, mas no lo suficientemente fuerte.

6.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Esta cepa presentó una marcada diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (Tabla2). En esta se listan el promedio de crecimiento bacteriano con sus respectivas medidas de variabilidad y tamaño de muestra obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *Tityus* sp. y el control negativo.

Tabla2. Promedio de crecimiento bacteriano (*P. aeruginosa*) con veneno de *Tityus* sp.

[] de veneno mg/mL	promedio crecimiento± error típico (n)	desviación estándar
control negativo	1,06± 0,04 (9)	0,140
0,008	0,65± 0,06 (9)*	0,202
0,016	0,71 ± 0,01 (9)*	0,031
0,031	0,80± 0,60(9)*	0,181
0,063	0,70± 0,00(9)*	0,021
0,125	0,70± 0,01 (9)*	0,048
0,250	0,73 ± 0,03 (9)*	0,109
0,500	0,69± 0,04(9)*	0,132
1,000	0,56± 0,01(9)*	0,030
p= 0.000		

n = Tamaño de muestra.

* Concentraciones de veneno para las cuales el crecimiento bacteriano difiere significativamente respecto al control negativo determinado mediante prueba *U de Mann Whitney*.

h = nivel umbral de significancia prueba *U de Mann Whitney*.

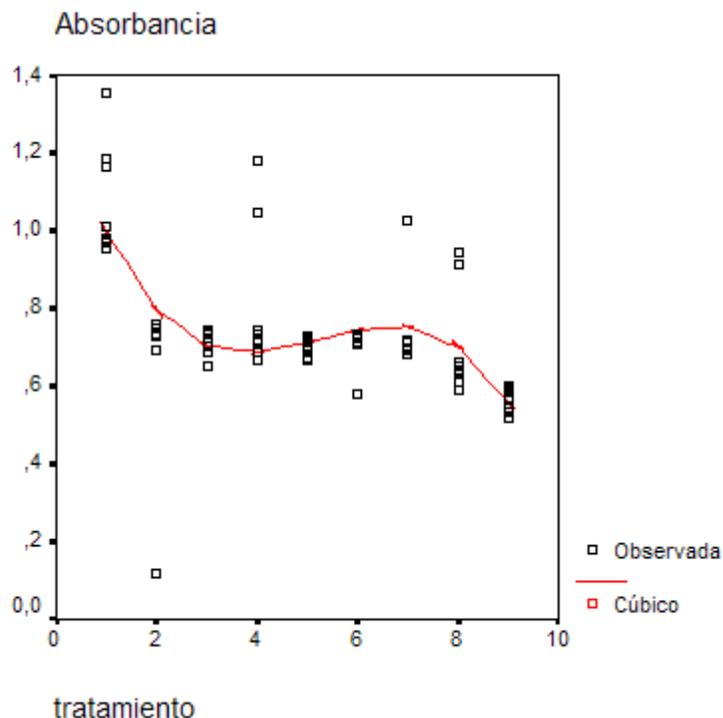
p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

En la prueba de comparaciones múltiples, la significancia ($p=0,000$) entre el control positivo y los demás tratamientos fue idéntico, también la diferencia comparativa del control negativo con los tratamientos problema fue significativo ($p\leq 0,015$) en todas las concentraciones, mientras que entre los mismos tratamientos problema las concentraciones (1 mg/mL vs. las demás concentraciones) y (0,5 mg/mL vs. 0,25 y 0,031 mg/mL) fueron significativos ($p\leq 0,030$). El primer parámetro indica que el tratamiento problema tiene una

acción (actividad antimicrobiana), no deducible si débil o fuerte, sobre el crecimiento de esta especie de bacteria *in vitro*, el segundo valor de significancia afirma que se presenta una acción mas marcada sobre el crecimiento de la cepa de dos de los tratamientos problema (1 y 0,5 mg/mL), frente a los demás.

En cuanto al comportamiento del crecimiento de esta cepa frente a las variadas dosis de veneno (Figura 6), la estimación curvilínea se ajusta a una curva tipo cúbica con una significancia ($p= 0.000$) de un coeficiente de correlación de *Spearman* (-0,643), indicando que conforme aumenta la concentración del tratamiento problema, disminuye levemente el crecimiento *in vitro* de esta especie de bacteria.

Figura 6. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (*P. aeruginosa*). La codificación del tratamiento problema (veneno inoculado) sobre el eje x está dado en su orden ascendente: 1= 0mg/mL, 2= 0.0078mg/mL, 3= 0.016mg/mL, 4 = 0.031mg/mL, 5= 0.063mg/mL, 6= 0.125mg/mL, 7= 0.25mg/mL, 8= 0.5mg/mL, 9= 1mg/mL.



La relación de tipo cúbica describe mediante la ecuación el crecimiento bacteriano (Absorbancia):

$A = 1,3417 - 0,4256(\text{concentración codificada}) + 0,0878(\text{concentración codificada})^2 - 0,0056(\text{concentración codificada})^3$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,418$, indicando que la variabilidad de la absorbancia depende en un 41,8% de la variabilidad de la concentración de veneno codificado. Lo que al final explica la mediana efectividad que tiene el tratamiento problema frente al crecimiento de esta especie bacteriana.

Adicionalmente, la MIC esperada se reporta, como parámetro a manera de soporte de las normas internacionales CLSI.

MIC: $1.06/2=0.53$, el crecimiento de esta especie *in vitro* acerca su MIC a la dosis de 1 mg/mL de veneno inoculado, mas no es el resultado esperado, pues no hay inhibición en crecimiento del 50% completo.

Finalmente, se puede deducir que los tratamientos problema (concentración de veneno) causaron una disminución del crecimiento *in vitro* de *P. aeruginosa*, y solo la dosificación (1 mg/mL) fue la mas marcada, pues se acerca al MIC. Sin embargo, no es lo suficientemente fuerte.

6.2.3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Esta cepa presentó una marcada diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (Tabla3). En ésta, se listan el promedio de crecimiento bacteriano con sus respectivas medidas de variabilidad y tamaño de muestra obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *Tityus* sp. y el control negativo.

En la prueba de comparaciones múltiples, la significancia ($p=0,000$) entre el control positivo y los demás tratamientos fue idéntico con excepción de (control positivo vs. 1 mg/mL) con ($p=0,005$), también la diferencia comparativa del control negativo con los tratamientos problema fue significativo ($p \leq 0,005$) en todas las concentraciones, mientras que entre los mismos tratamientos problema las concentraciones (1 mg/mL vs. 0,016 y 0,008 mg/mL) y (0,5 mg/mL vs. las demás concentraciones, excepto 0,25mg/mL) fueron significantes ($p \leq 0,038$). El primer parámetro indica que el tratamiento problema tiene una acción, no deducible si débil o fuerte, sobre el crecimiento de esta especie de bacteria *in vitro*, el segundo afirma que se presenta una acción mas marcada sobre el crecimiento de la cepa de dos de los tratamientos problema (1 y 0,5 mg/mL), frente a los demás. Además, la

disminución en la diferencia significativa del tratamiento de mayor concentración con el control positivo, sugiere de actividad del veneno sobre el crecimiento bacteriano

Tabla3. Promedio de crecimiento bacteriano (*S. aureus*) con veneno de *Tityus* sp.

[] de veneno mg/mL	promedio crecimiento± error típico (n)	desviación estándar
control negativo	0,65± 0,17(9)	0,051
0,008	0,51± 0,03 (9)*	0,106
0,016	0,51 ± 0,03 (9)*	0,096
0,031	0,48± 0,02(9)*	0,085
0,063	0,46± 0,02(9)*	0,062
0,125	0,46± 0,02 (9)*	0,064
0,250	0,40 ± 0,02 (9)*	0,080
0,500	0,36± 0,01(9)*	0,042
1,000	0,38± 0,03(9)*	0,112
p= 0.000		

n = Tamaño de muestra.

* Concentraciones de veneno para las cuales el crecimiento bacteriano difiere significativamente respecto al control negativo determinado mediante prueba *U de Mann Whitney*.

h = nivel umbral de significancia prueba *U de Mann Whitney*.

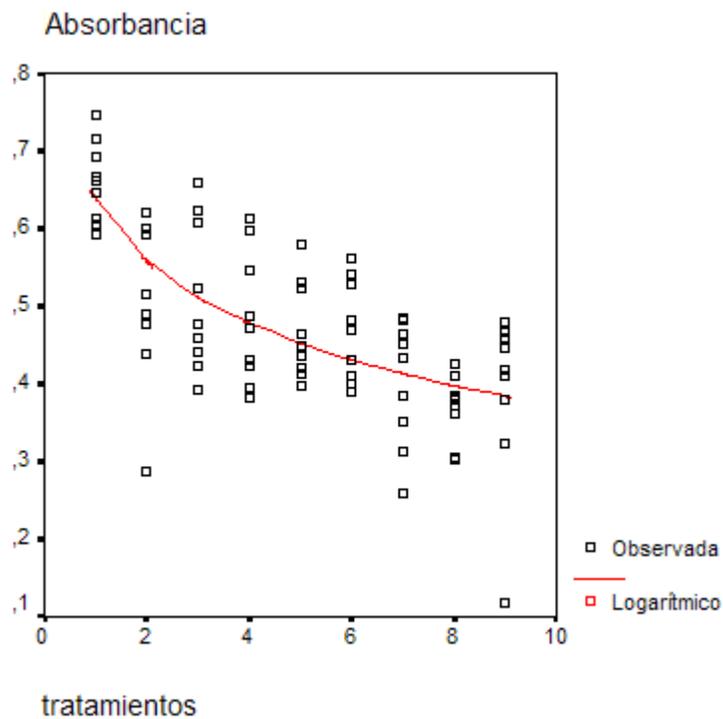
p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

En cuanto al comportamiento del crecimiento de esta cepa frente a las variadas dosis de veneno (Figura 7), la estimación curvilínea ajusta una curva tipo logarítmica con una significancia ($p= 0.000$) de un coeficiente de correlación de *Spearman* (-0,654), indicando que conforme aumenta la concentración del tratamiento problema, disminuye levemente el crecimiento *in vitro* de esta especie de bacteria.

La relación de tipo logarítmica describe mediante la ecuación el crecimiento bacteriano (Absorbancia):

$A = 0,639 - 0,1161[\ln(\text{concentración codificada})]$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,490$, indicando que la variabilidad de la absorbancia depende en un 49,0% de la variabilidad de la concentración de veneno codificado. Lo que al final explica la mediana efectividad que tiene el tratamiento problema frente al crecimiento de esta especie bacteriana.

Figura 7. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (*S. aureus*). La codificación del tratamiento problema (veneno inoculado) sobre el eje x está dado en su orden ascendente: 1= 0mg/mL, 2= 0.0078mg/mL, 3= 0.016mg/mL, 4 = 0.031mg/mL, 5= 0.063mg/mL, 6= 0.125mg/mL, 7= 0.25mg/mL, 8= 0.5mg/mL, 9= 1mg/mL.



Adicionalmente, la MIC esperada se reporta para este trabajo, como parámetro a manera de soporte de las normas internacionales CLSI.

MIC: $0,65/2 = 0,325$, el crecimiento de esta especie *in vitro* acerca su MIC a la dosis de 0,5 mg/mL de veneno, mas no es el resultado esperado, pues no hay inhibición en crecimiento del 50% completo.

Finalmente, se puede deducir que los tratamientos problema causaron una disminución del crecimiento *in vitro* de *S. aureus*, y solo la dosificación (0,5 mg/mL) fue la mas marcada, pues se acerca al MIC. Sin embargo, no es lo suficientemente fuerte.

6.3. ANTIFÚNGICO

Los resultados para las tres cepas patógenas se describen como siguen:

Hubo marcada diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tres procedimientos realizados en el tiempo (bloque) por cada cepa, de igual manera se presento significancia ($p = 0,000$) del valor de absorbancia entre cepas: comparando entre *C. albicans* y *C. krusei* ($p = 0,278$); entre *C. albicans* y *C. neoformans* ($p = 0,000$); y entre *C. krusei* y *C. neoformans* ($p = 0,000$). Lo primero sugiere la falta de precisión en algún procedimiento para llevar la repetitividad del experimento, puede ser manejo de variables como la temperatura en el lugar del experimento que pueden en un momento dado incrementar o retrasar el crecimiento del cultivo fúngico mientras es manipulado. Lo segundo, indica que cada especie fúngica estudiada tiene su propio comportamiento de crecimiento frente a la misma dosis suministrada del tratamiento problema. Sin embargo, es de notar que no se presenta significancia solo entre las cepas *C. albicans* y *C. krusei*, la razón pueda estar en que dichas pertenecen a un mismo género mientras *C. neoformans* pertenece a un género diferente.

6.3.1. *Candida albicans*

Para esta cepa en especial, se presento una marcada diferencia significativa entre los tratamientos aplicados (Tabla4). En esta se listan el promedio de crecimiento fúngico con sus respectivas medidas de variabilidad y tamaño de muestra obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *Tityus* sp. y el control negativo.

En la prueba de comparaciones múltiples, la significancia ($p=0,000$) entre el control positivo y los demás tratamientos fue idéntico, también la diferencia comparativa del control negativo con los tratamientos problema fue significativo ($p\leq 0,007$) en todas las concentraciones a excepción del tratamiento 0,0078 mg/mL, mientras que entre los mismos tratamientos problema solo las concentraciones (1 mg/mL vs. 0,008 mg/mL, 0,5 mg/mL vs. 0,0078 mg/mL, 0,25 mg/mL vs. 0,0078 mg/mL, 0,063 mg/mL vs. 0,0078 mg/mL y 0,016 mg/mL vs. 0,0078 mg/mL) fueron significantes ($p\leq 0,009$). El primer parámetro indica que el tratamiento problema tiene una acción, no deducible si débil o fuerte, sobre el crecimiento de esta especie de bacteria *in vitro*, el segundo afirma que se presenta una acción mas marcada sobre el crecimiento de la cepa de todos los tratamientos problema exceptuando la concentración 0,0078 mg/mL inoculada de veneno

Tabla4. Promedio de crecimiento fúngico (*C. albicans*) con veneno de *Tityus* sp.

[] de veneno mg/mL	promedio crecimiento \pm error típico (n)	desviación estándar
control negativo	0,58 \pm 0,05(9)	0,172
0,008	0,47 \pm 0,04 (9)	0,149
0,016	0,30 \pm 0,05 (9)*	0,163
0,031	0,29 \pm 0,05(9)*	0,163
0,063	0,24 \pm 0,03(9)*	0,113
0,125	0,33 \pm 0,05(9)*	0,156
0,250	0,28 \pm 0,03 (9)*	0,118
0,500	0,28 \pm 0,03(9)*	0,097
1,000	0,25 \pm 0,02(9)*	0,069
p= 0.000		

n = Tamaño de muestra.

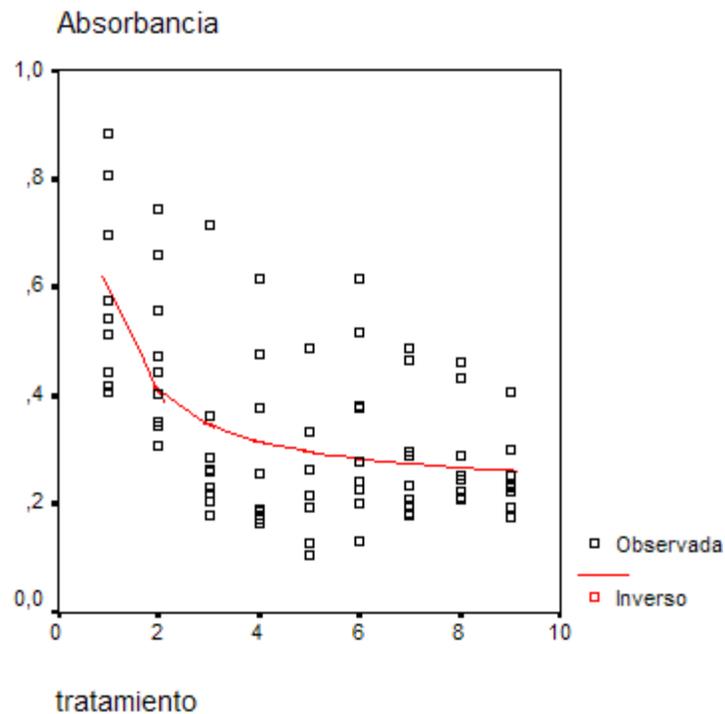
* Concentraciones de veneno para las cuales el crecimiento fúngico difiere significativamente respecto al control negativo determinado mediante prueba *U de Mann Whitney*.

h = nivel umbral de significancia prueba *U de Mann Whitney*.

p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

En cuanto al comportamiento del crecimiento de esta cepa frente a las variadas dosis de veneno (Figura 8), la estimación curvilínea ajusta una curva tipo invertida con una significancia ($p= 0.000$) de un coeficiente de correlación de *Spearman* (-0,413), indicando que conforme aumenta la concentración del tratamiento problema, se presenta una disminución leve en el crecimiento *in vitro* de esta especie fúngica.

Figura 8. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (*C. albicans*). La codificación del tratamiento problema (veneno inoculado) sobre el eje x está dado en su orden ascendente: 1= 0mg/mL, 2= 0.0078mg/mL, 3= 0.016mg/mL, 4 = 0.031mg/mL, 5= 0.063mg/mL, 6= 0.125mg/mL, 7= 0.25mg/mL, 8= 0.5mg/mL, 9= 1mg/mL.



La relación de tipo invertida describe mediante la ecuación el crecimiento fúngico (Absorbancia):

$A = 0,2200+0,3791/(\text{concentración codificada})$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,363$, indicando que la variabilidad de la absorbancia depende en un 36,3% de la variabilidad de la concentración de veneno

codificado. Lo que al final explica la mediana efectividad que tiene el tratamiento problema frente al crecimiento de esta especie fúngica.

Adicionalmente, la MIC esperada se reporta para este trabajo, como parámetro a manera de soporte de las normas internacionales CLSI.

MIC: $0.58/2=0.29$, el crecimiento de esta especie *in vitro* tiene una MIC a la dosis de 0.5 mg/mL de veneno Sin embargo, se observa que mientras continua aumentando la concentración del tratamiento problema, sigue disminuyendo el crecimiento fúngico (Figura 4) hasta casi su estabilización en la concentración más alta (1mg/mL) inoculada. En la tabla 4 se reseña el promedio del tratamiento para el cual se estipula la MIC.

Finalmente, se puede deducir que a partir de la concentración 0,016mg/mL, los tratamientos de veneno causaron una disminución del crecimiento *in vitro* de *C. albicans*, y solo la dosificación (1 mg/mL) fue la más marcada. Sin embargo, existe una concentración con MIC (0.25 mg/mL), e indica que basta con dicha cantidad de veneno para impedir el crecimiento fúngico en la mitad.

6.3.2. *Candida krusei*

Para esta cepa, se presento una marcada diferencia significativa entre los tratamientos aplicados (Tabla5). En esta se listan el promedio de crecimiento fúngico con sus respectivas medidas de variabilidad y tamaño de muestra obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *Tityus* sp. y el control negativo.

En la prueba de comparaciones múltiples, la significancia ($p=0,000$) entre el control positivo y los demás tratamientos fue idéntico, también la diferencia comparativa del control negativo con los tratamientos problema fue significativa ($p\leq 0,012$) en todas las concentraciones a excepción del tratamiento 0,016 mg/mL, mientras que entre los mismos tratamientos problema solo las concentraciones (0,0078 mg/mL vs. demás concentraciones) fueron significativos ($p\leq 0,031$).

Tabla 5. Promedio de crecimiento fúngico (*C. krusei*) con veneno de *Tityus* sp.

[] de veneno mg/mL	promedio crecimiento± error típico (n)	desviación estándar
control negativo	0,52± 0,07 (9)	0,217
0,008	0,42± 0,04 (9)	0,128
0,016	0,28 ± 0,02 (9)*	0,089
0,031	0,26± 0,05(9)*	0,150
0,063	0,24± 0,04(9)*	0,139
0,125	0,28± 0,03 (9)*	0,097
0,250	0,22 ± 0,01 (9)*	0,058
0,500	0,27± 0,01(9)*	0,059
1,000	0,23± 0,01(9)*	0,054
p= 0.001		

n = Tamaño de muestra.

* Concentraciones de veneno para las cuales el crecimiento fúngico difiere significativamente respecto al control negativo determinado mediante prueba *U de Mann Whitney*.

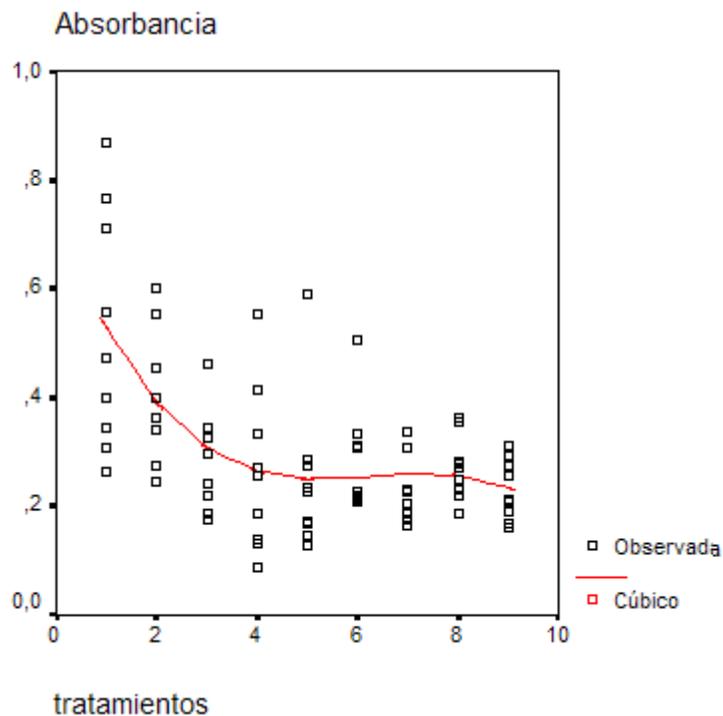
h = nivel umbral de significancia prueba *U de Mann Whitney*.

p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

El primer parámetro indica que el tratamiento problema tiene una acción, no deducible si débil o fuerte, sobre el crecimiento de esta especie de bacteria *in vitro*, el segundo afirma que se presenta una acción mas marcada sobre el crecimiento de la cepa de todos los tratamientos problema exceptuando la concentración 0,0078 mg/mL.

En cuanto al comportamiento del crecimiento de esta cepa frente a las dosis de veneno (Figura 9), la estimación curvilínea se ajusta a una curva tipo cúbica con una significancia (*p*= 0.000) de un coeficiente de correlación de *Spearman* (-0,444), indicando que conforme aumenta la concentración del tratamiento problema, se presenta una disminución leve en el crecimiento *in vitro* de esta especie fúngica.

Figura 9. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (*C. krusei*). La codificación del tratamiento problema (veneno inoculado) sobre el eje x está dado en su orden ascendente: 1= 0mg/mL, 2= 0.0078mg/mL, 3= 0.016mg/mL, 4 = 0.031mg/mL, 5= 0.063mg/mL, 6= 0.125mg/mL, 7= 0.25mg/mL, 8= 0.5mg/mL, 9= 1mg/mL.



La relación de tipo cúbica describe mediante la ecuación el crecimiento del hongo (Absorbancia):

$A = 0,7344 - 0,2420(\text{concentración codificada}) + 0,0395(\text{concentración codificada})^2 - 0,0021(\text{concentración codificada})^3$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,380$, indicando que la variabilidad de la absorbancia depende en un 38% de la variabilidad de la concentración de veneno codificado. Lo que al final explica la mediana efectividad que tiene el tratamiento problema frente al crecimiento de esta especie.

Adicionalmente, la MIC esperada se reporta para este trabajo, como parámetro a manera de soporte de las normas internacionales CLSI.

MIC: $0.52/2=0.26$, el crecimiento de esta especie *in vitro* tiene una MIC a la dosis de 0.063 mg/mL de veneno referenciado en la tabla 5. Sin embargo, se observa que se presenta disminución del crecimiento fúngico en otras concentraciones de tratamiento problema (Figura 4).

Finalmente, se puede deducir que a partir de la concentración 0,016mg/mL, los tratamientos problema causaron una disminución del crecimiento *in vitro* de *C. krusei*, y solo la dosificación (1 mg/mL) fue la mas marcada. Sin embargo, existe una concentración con MIC (0.063 mg/mL), e indica que basta con dicha cantidad de veneno para impedir el crecimiento fúngico en la mitad.

6.3.3. *Cryptococcus neoformans*

Para esta cepa en especial, se presentó una marcada diferencia significativa entre los tratamientos aplicados (Tabla 6).

Tabla 6. Promedio de crecimiento fúngico (*C. neoformans*) con veneno de *Tityus* sp.

[] de veneno mg/mL	promedio crecimiento± error típico (n)	desviación estándar
control negativo	0,58± 0,05 (9)	0,156
0,008	0,53± 0,04 (9)	0,124
0,016	0,49 ± 0,05 (9)	0,153
0,031	0,41± 0,05(9)*	0,170
0,063	0,43± 0,05(9)	0,158
0,125	0,52± 0,04 (9)	0,139
0,2500	0,46 ± 0,02 (9)*	0,081
0,500	0,48± 0,02(9)h	0,087
1,000	0,43± 0,01(9)*	0,050
p= 0.001		

n = Tamaño de muestra.

* Concentraciones de veneno para las cuales el crecimiento fúngico difiere significativamente respecto al control negativo determinado mediante prueba *U de Mann Whitney*.

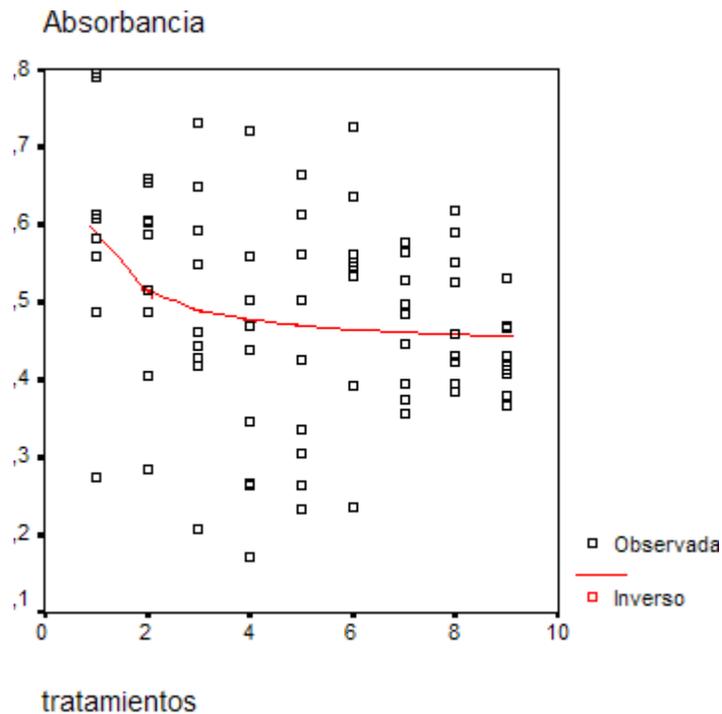
h = nivel umbral de significancia prueba *U de Mann Whitney*.

p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

En esta se registran el promedio de crecimiento fúngico con sus respectivas medidas de variabilidad y tamaño de muestra obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *Tityus* sp. y el control negativo.

En comparaciones múltiples, la significancia ($p=0,000$) entre el control positivo y los demás tratamientos fue idéntico, también la diferencia comparativa del control negativo con los tratamientos problema fue significativo ($p\leq 0,024$) en solo las concentraciones (1, 0.25 y 0.031 mg/mL), mientras que entre los mismos tratamientos problema solo las concentraciones (1 mg/mL vs. 0,125 y 00078 mg/mL) fueron significantes ($p\leq 0,047$). El primer parámetro indica que el tratamiento problema tiene una acción, no deducible si débil o fuerte, sobre el crecimiento de esta especie de bacteria *in vitro*, el segundo afirma que se presenta una acción mas marcada sobre el crecimiento de la cepa a una concentración de veneno igual a 1 mg/mL.

Figura 10. Curva dosis-efecto de absorbancia vs. tratamiento (*C. neoformans*). La codificación del tratamiento problema (veneno inoculado) sobre el eje x está dado en su orden ascendente: 1= 0mg/mL, 2= 0.0078mg/mL, 3= 0.016mg/mL, 4 = 0.031mg/mL, 5= 0.063mg/mL, 6= 0.125mg/mL, 7= 0.25mg/mL, 8= 0.5mg/mL, 9= 1mg/mL.



En cuanto al comportamiento del crecimiento de esta cepa frente a las dosis de veneno (Figura 10), la estimación curvilínea se ajusta a una curva tipo invertida con una significancia ($p= 0.012$) de un coeficiente de correlación de *Spearman* (-0,278), indicando que conforme aumenta la concentración del tratamiento, se presenta una disminución muy leve en el crecimiento *in vitro* de esta especie fúngica.

La relación de tipo invertida describe mediante la ecuación el crecimiento fúngico (Absorbancia):

$A = 0,4394 + 0,1501 / (\text{concentración codificada})$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,090$, indicando que la variabilidad de la absorbancia depende en un 9,0% de la variabilidad de la concentración de veneno codificado. Lo que al final explica la poca efectividad que tiene el tratamiento problema frente al crecimiento de esta especie fúngica.

Adicionalmente, la MIC esperada se reporta para este trabajo, como parámetro a manera de soporte de las normas internacionales CLSI.

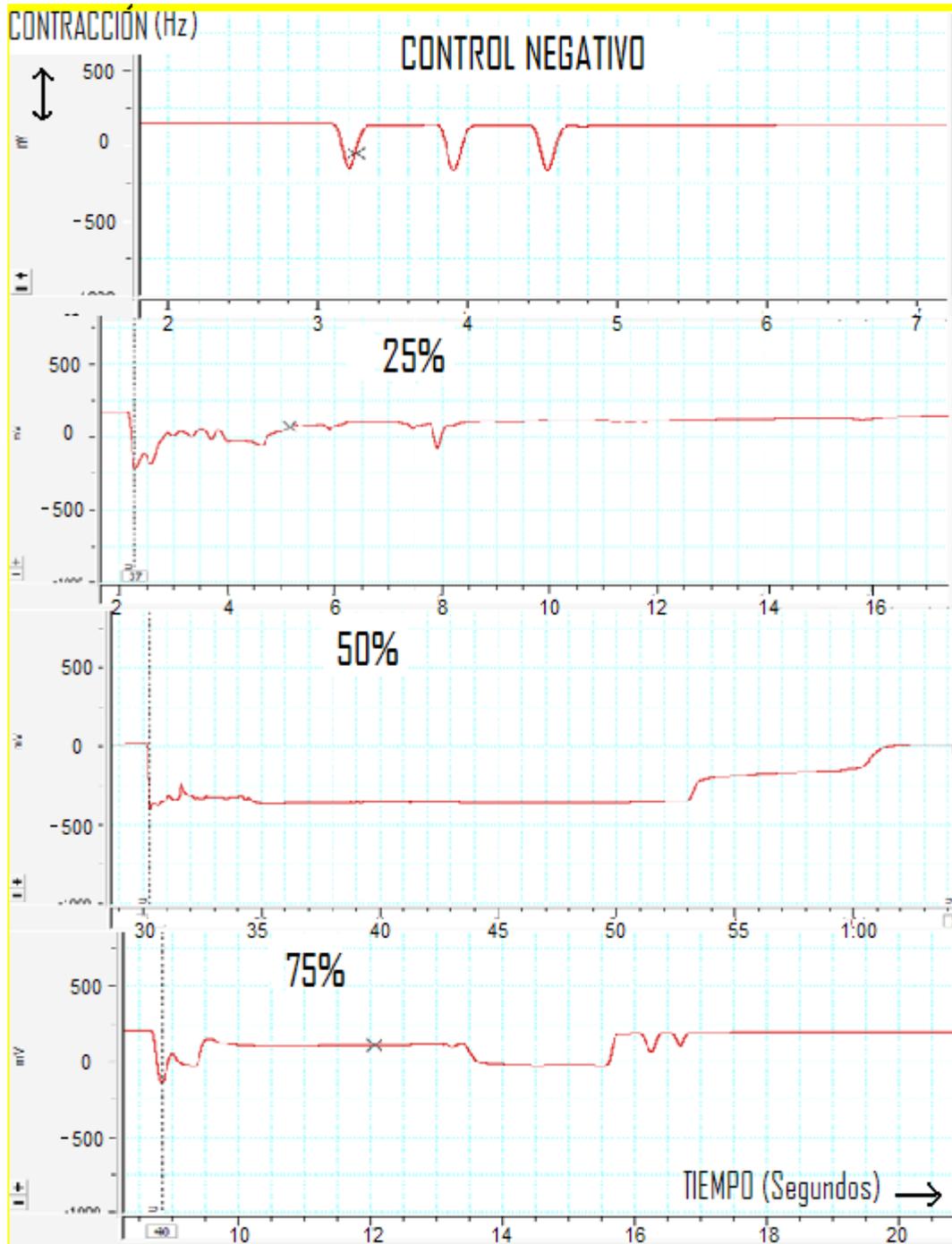
MIC: $0.58/2=0.29$, no hay MIC, pues esta especie tuvo un mínimo en crecimiento *in vitro* que la supera 1/3 de absorbancia adicional y corresponde a la dosis de 0.031 mg/mL de veneno inoculado.

Finalmente, se puede deducir que solo las concentraciones (1, 0.25 y 0.031mg/mL) de los tratamientos problema causaron una disminución muy leve del crecimiento *in vitro* de *C. neoformans*, y solo la dosificación (1 mg/mL) fue la mas marcada. Sin embargo, no existe MIC por lo que no es lo suficientemente fuerte.

6.4. ACTIVIDAD NEUROTÓXICA

Este procedimiento está basado en la metodología realizada por Guerrero 2002. Sin embargo, en el presente trabajo se adiciona la confiabilidad estadística estableciendo como novedad el uso de dos parámetros tomados como variables cuantitativas: la contracción muscular asistida CMA y tiempo de contracción muscular TCM, para poder determinar la actividad neurotóxica del veneno de *Tityus* sp. sobre placa motora. La CMA se evidencia en cada curva evaluando la amplitud de la misma, este valor

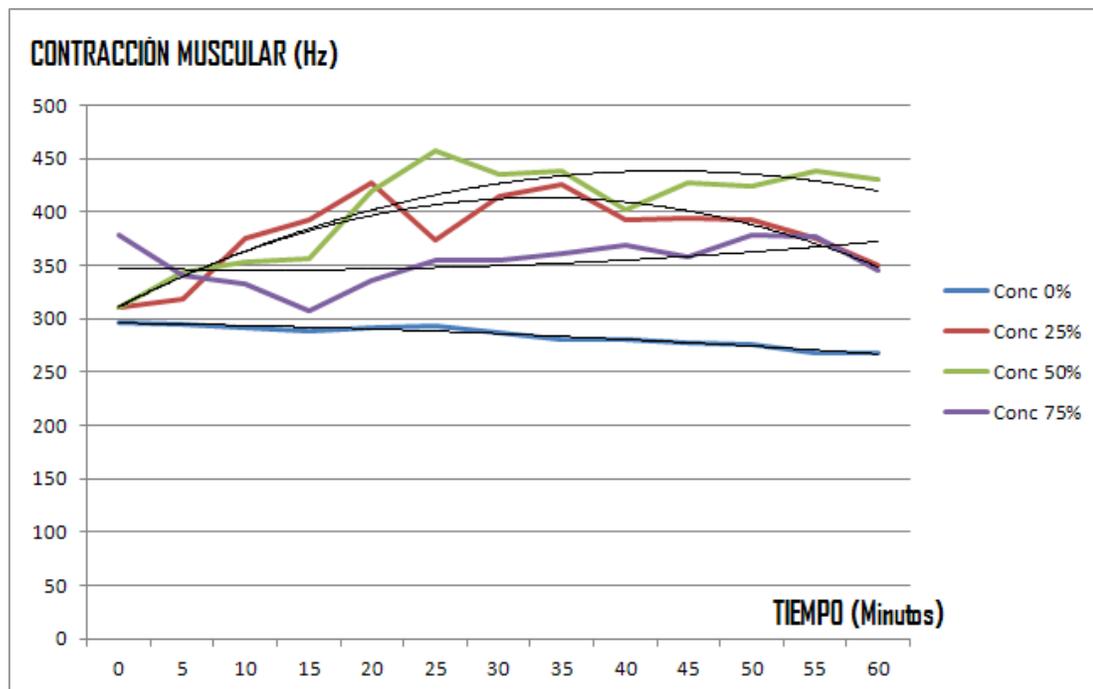
Figura 11. Representación de la Contracción Muscular Asistida CMA. Comportamiento típico de cada tratamiento generado por estimulación muscular con software Chart5sp (el control negativo se representa con tres estimulaciones asistidas, con los demás solo se representa una).



medido en Hertz fue arrojado con precisión el software Chart5sp. El TCM se evidencia con el tiempo en el que la curva se mantiene en una posición determinada y su valor también es establecido con precisión por el software. La escogencia de los parámetros permitió evaluar la alteración en la contracción muscular con los diferentes tratamientos.

En principio se informa que debido al procedimiento efectuado por cada tratamiento, el músculo objeto de estudio presentó un comportamiento durante la hora en la que se evaluó (Figura 12): En esta se observa la acción de cada concentración de veneno inyectado bajo estimulación asistida sobre los músculos, pues cabe destacar que inmediatamente se aplicaron los tratamientos problemas, cada músculo objeto de estudio presento contracciones involuntarias en unas concentraciones de veneno mas marcada que en otras.

Figura 12. Comportamiento de la CMA durante una hora con sus respectivas tendencias. Nótese que el control negativo se encuentra inferior a las dosis de veneno aplicadas. La codificación de los datos es 0%, 25%, 50% y 75% de la DL₅₀ *T. pachyurus*.



Esta gráfica muestra que el blanco se encuentra separado de los demás tratamientos. Su posición indica el nivel de estimulación menor frente a los

tratamientos problema, a la vez que disminuyó su intensidad en el tiempo, fenómeno que pudo ser causado por fatiga muscular, mientras en los tratamientos problema la dosificación de 75% comienza con una sobreestimulación más marcada que las demás dosificaciones, fenómeno que se experimento con contracciones involuntarias no estimuladas. Sin embargo, mientras transcurrió el tiempo, su efecto sobre el músculo fue inferior a los demás.

Debido al comportamiento del músculo inmediatamente mencionado: por la variación de datos en el tiempo, se tuvo que realizar una comparación teniendo en cuenta cada intervalo de tiempo para definir la significancia intra-tratamientos. Es decir, verificando que entre los músculos trabajados con un mismo tratamiento, no existiera diferencia (bloque). El resultado arrojó una diferencia estadística no significativa ($p > 0,05$) entre los tres procedimientos realizados en el tiempo.

Tabla 7. Promedio de contracción muscular CMA con veneno de *Tityus* sp.

[] de veneno en % de DL50	promedio CMA \pm error típico (n)	desviación estándar
control negativo	284,01 \pm 4,20(78)	37,1
25%	380,06 \pm 8,27 (78)*	73,1
50%	402,73 \pm 9,09 (78)*	80,31
75%	353,56 \pm 6,53(78)*	57,74
p= 0.000		

n = Tamaño de muestra.

* Concentraciones de veneno para las cuales la CMA difiere significativamente respecto al control negativo determinado mediante prueba *U de Mann Whitney*.

p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

Por otro lado, esta prueba presentó una marcada diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (Tabla 7 y 8). En estas se muestran los promedios de CMA y TCM con sus respectivas medidas de variabilidad y tamaño de muestra obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno y el control negativo.

Con la prueba de comparaciones múltiples, la comparación del control negativo (músculo inyectado con solución Ringer) con los tratamientos problema ([] de veneno) fue significativo ($p=0,000$) para ambos parámetros, mientras que entre los mismos tratamientos problema, solo dos de ellos no

fueron significantes ($p=0,098$ y $p=0,732$) en uno de los dos parámetros simultáneamente establecidos (Tabla 9). Lo primero indica que el tratamiento problema produce un efecto sobre el músculo del anfibio *in vivo*, lo segundo afirma que se presenta una acción variable sobre el músculo según las dosificaciones del veneno

Tabla8. Promedio de tiempo de contracción muscular (TCM) con veneno de *Tityus* sp.

[] de veneno en % de DL50	promedio TCM \pm error típico (n)	desviación estándar
control negativo	0,21 \pm 0,00(78)	0
25%	21,09 \pm 6,47 (78)*	57,17
50%	22,18 \pm 1,65 (78)*	14,61
75%	22,43 \pm 1,48(78)*	13,14
p= 0.000		

n = Tamaño de muestra.

* Concentraciones de veneno para las cuales la TCM difiere significativamente respecto al control negativo determinado mediante prueba *U de Mann Whitney*.

p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

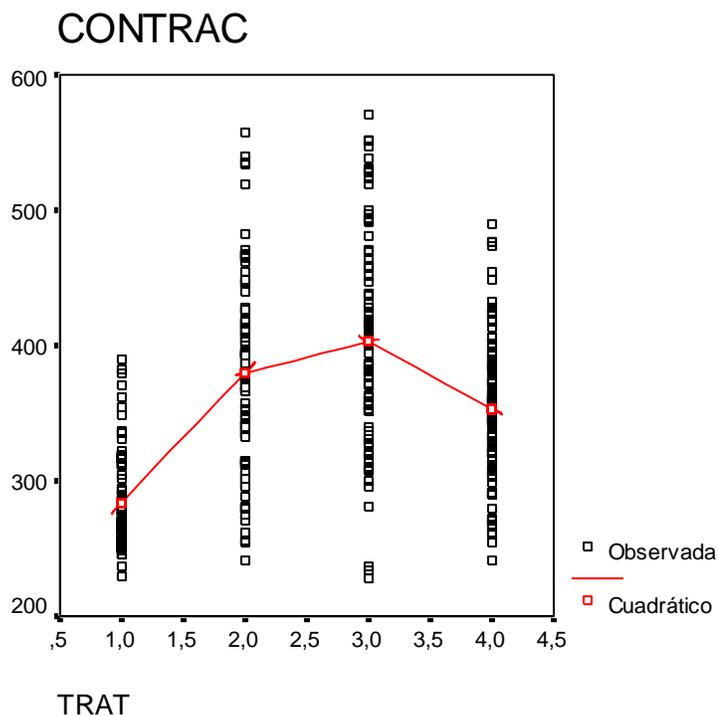
En cuanto al comportamiento del músculo frente a las variadas dosis de veneno (Figura 13), la estimación curvilínea se ajusta a una curva tipo cuadrática con una significancia ($p= 0.000$) de un coeficiente de correlación de *Spearman* (0,372), indicando que conforme aumenta la concentración del tratamiento problema, se presenta un aumento en la contracción muscular.

Tabla9. Concentraciones de veneno comparadas significativamente utilizando los parámetros CMA y TCM determinados mediante prueba *U de Mann Whitney*.

comparación entre tratamientos	significancia de CMA	significancia de TCM
25% vs. 50%	0,098	0,003
25% vs. 75%	0,022	0,000
50% vs. 75%	0,000	0,732

Contrariamente de lo que se pudo esperar, el veneno de esta especie de escorpión produjo una excitación sobre el músculo objeto de estudio (ver curva de lectura muscular. Figura 11), en algunos casos no diferenciados significativamente como la CMA ($p=0,098$) y el TCM ($p=0,732$), pero en los mismos casos diferenciados con su parámetro correspondiente (Tabla 9). Es decir por ejemplo, si por un lado la CMA de dos tratamientos problema fue similar, no igualmente lo fue su TCM (caso 25% vs. 50%): mientras su contracción fue parecida entre tratamientos, el tiempo que se mantuvo el músculo contraído fue mayor en el tratamiento 50%. La determinación de estos parámetros entonces, permitió diferenciar la acción del veneno propia de cada concentración.

Figura 13. Curva dosis-efecto de CMA vs. tratamiento. La codificación del tratamiento problema (veneno inoculado) sobre el eje x está dado en su orden ascendente: 1=0%, 2=25%, 3=50% y 4=75% de la DL50 *T. pachyurus*.



La relación es de tipo cuadrática y se describe mediante la ecuación Contracción Muscular: $CMA=115,746+204,652(\text{concentración codificada})-$

$36,304(\text{concentración codificada})^2$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,328$, indicando que la variabilidad de la CMA depende en un 32,8 % de la variabilidad de la concentración de veneno codificado.

Finalmente, se puede deducir que los tres tratamientos de veneno causan una alteración en la contracción muscular asistida (estimuladora), y que la concentración (50% DL50 *T. pachyurus*) para nuestra especie *Tityus* sp. es la más efectiva.

7. DISCUSIÓN

Los escorpiones poco han cambiado morfológicamente desde su aparición hace 400 millones de años aproximadamente (Zhijian *et al.*, 2006). Sin embargo, para lograr su permanencia como especie se ha supuesto que el veneno que producen, se ha desarrollado como un mecanismo de defensa y/o caza de sus presas (Gao *et al.*, 2007; Escobar Enrique *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010) producto de una interacción con su medio. Razón que brinda al veneno muchas propiedades bioactivas hasta el momento descubiertas (Silva *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010): contiene péptidos que actúan sobre canales (Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+}) despolarizando las membranas de células excitables, además de poseer propiedades antimicrobiana, hemolítica, inhibidores de tripsina, potenciadores de Bradiquinina, entre otras (Rates; *et al.* 2008).

Particularmente las actividades biológicas del veneno del escorpión *Tityus* sp. estudiadas en el presente trabajo fueron antibacteriana, antifúngica y neurotóxica. Son características del veneno que funciona conforme el contenido de péptidos y/o enzimas incluidas en éste, y que se encuentra sustentado con resultados de trabajos ya realizados a especies del mismo nivel de género o familia, con lo que se soporta una posible explicación que se pueda presentar de los resultados encontrados con el veneno completo de esta especie de escorpión.

Por su parte, los péptidos antimicrobianos cumplen con tres características importantes que les brindan la capacidad de afectar organismos unicelulares: la combinación de aminoácidos específicos como punto de reconocimiento en la membrana de la célula afectada, su estructura tridimensional y la distribución de cargas (Hancock *et al.*, 2006). Por lo general estos son de bajo peso molecular y aunque puedan existir péptidos netamente aniónicos, la mayoría son de características catiónicas brindándoles mayor eficacia antimicrobiana (Hancock and Diamond 2000). La cualidad molecular de tales péptidos es su carga positiva que afecta membranas de microorganismos (Remijson *et al.*, 2010), adicionalmente, están los péptidos con características anfipáticas (Jenssen *et al.*, 2006; Yount *et al.*, 2006; Mingfu *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2009) que actúan como un detergente, vuelven soluble

la membrana del agente patógeno, además que algunos pueden desnaturalizar proteínas (Prescott, 2002). Estos péptidos tienen variados mecanismos de acción frente al ente microbiano como los péptidos pertenecientes a la familia de las defensinas (moléculas de origen orgánico que actúan frente a un ente patógeno como mecanismo de defensa), los de Cisteína libre, los formadores de poros y otros péptidos con mecanismos de acción aun desconocidos (Nomura *et al.*, 2004; Dale *et al.*, 2006; Mingfu *et al.*, 2008). Los primeros se encuentran en el veneno de la mayoría de los escorpiones, mas la finalidad de todos es afectar las membranas de microorganismos produciéndoles una alteración fisiológica. Es así, como se presenta una actividad en algunos casos leve en otros no, del veneno completo del escorpión *Tityus* sp. sobre las diferentes cepas de bacterias evaluadas en el presente trabajo; por ejemplo, la actividad del veneno fue escasa sobre el crecimiento de *E. coli* ($p \geq 0,027$), no hubo mucha diferencia entre concentraciones aplicadas y la MIC no se logra determinar, es decir, que no hay concentración de veneno mínima que inhiba el 50% del crecimiento microbiano. En correspondencia con el resultado, Corzo *et al.* (2001), encontraron en las moléculas Pandinin 1 y 2 aisladas del veneno del escorpión *Pandinus imperator*, que dichos péptidos poseen una débil actividad antibacteriana sobre esta cepa patógena. Similarmente, Gao *et al.* (2007) encontraron actividad casi nula del veneno del escorpión Chino *Buthus martensii* sobre la cepa mencionada. De igual manera, Rivera *et al.* (2010) luego de aislar y caracterizar un péptido antibacteriano del escorpión *C. margaritatus* en Perú, encontraron que este péptido no mostró actividad sobre *E. coli*. Escobar *et al.* (2008) ya habían estudiado el veneno fraccionado de *C. margaritatus* en el mismo país conduciendo al mismo resultado. Sin embargo, se determina actividad antibacteriana sobre esta cepa a partir de una fracción proteica aislada del veneno de la especie *Hadruidoidea mauryi*.

La acción del veneno de *Tityus* sp. sobre los agentes patógenos *P. aeruginosa* ($p \leq 0,015$) y *S. aureus* ($p \leq 0,005$) fue mas marcada sobre el crecimiento *in vitro* hasta el punto de acercar su inhibición al MIC. En el estudio de los péptidos Pandinin 1 y 2 de Corzo *et al.* (2001), casualmente se encuentra marcada actividad antibacteriana sobre la cepa *S. aureus*, mientras no es tan marcada para la cepa *P. aeruginosa*. Sin embargo, Díaz *et al.* (2009) luego de aislar seis péptidos del escorpión *T. discrepans* encontraron actividad antibacteriana para esta última cepa. Mingfu *et al.* (2008) luego de obtener la secuencia de cuatro péptidos antimicrobianos entre los que se encuentra el péptido defensina de un escorpión, demuestra marcada actividad antibacteriana posterior a una clonación de estas secuencias sobre la cepa *S. aureus*. En relación con nuestro resultado,

Escobar *et al.* (2008) encontraron actividad antibacteriana sobre *P. aeruginosa* con algunas fracciones de los venenos de *C. margaritatus* y *H. mauryi*, pero solo algunas otras fracciones del veneno de *C. margaritatus* fueron activas contra *S. aureus*. Posteriormente, Rivera *et al.* (2010) luego de experimentar el péptido aislado de *C. margaritatus*, en las cepas *P. aeruginosa* y *S. aureus* concluyeron que este puede tener actividad bacteriostática mas no bactericida.

Referente a los hongos, aunque pocos reportes se ha encontrado en la literatura, los resultados de este trabajo con *C. neoformans* ($p \geq 0,024$) mostraron un comportamiento de crecimiento similar a la bacteria *E. coli*. Prácticamente fue nula la actividad antifúngica al evaluar las diferentes concentraciones en esta cepa. Sucedió lo contrario con las especies *C. albicans* ($p \leq 0,007$) y *C. krusei* ($p \leq 0,012$), pues fueron susceptibles al veneno de *Tityus* sp. hasta el punto de mostrar MIC en las concentraciones 0,25 y 0,063 mg/mL respectivamente, además de tener una mayor actividad en la concentración 1 mg/mL. Corzo *et al.* (2001), exponen la actividad de péptidos antifúngicos entre los que se destacan Pandinin 2 con poca actividad sobre la cepa *C. albicans* y de igual manera Kuhn-Nentwig (2003), menciona la actividad de este péptido antimicrobiano sobre esta cepa fúngica.

La acción de péptidos que estén presentes en el veneno completo de esta especie de escorpión, que tengan las cualidades anteriormente mencionadas, son los responsables de la débil inhibición de las dos cepas bacterianas (*P. aeruginosa* y *S. aureus*) y la marcada actividad sobre el crecimiento *in vitro* de las levaduras (*C. albicans* y *C. krusei*). Muchos péptidos antimicrobianos provenientes del veneno de diferentes especies de escorpión se han aislado y estudiado (Hadrurin, Scorpine, Opistoporins, Parabutoporin, entre otros). Yuan *et al.* (2010) aislaron el gen de un péptido antimicrobiano de la glándula del escorpión *Scorpiops tibetanus* descubriendo que este solo tiene actividad sobre bacterias Gram+. De igual manera, Gao *et al.* (2007) ya mencionaba la actividad antibacteriana sobre Gram+ luego de una estimulación de la glándula del escorpión *B. martensii* post-inoculación bacteriana en esta. Sin embargo, en nuestro caso se presentó una actividad antimicrobiana en dos especies bacterianas (una Gram+ y otra Gram-) y dos levaduras patógenas. Con relación a los resultados obtenidos por Díaz *et al.*, (2009), Escobar *et al.* (2008), los escorpiones *T. discrepans* y *C. margaritatus*, son especies que pertenecen a la familia Buthidae, la misma en la que se encuentra nuestra especie objeto

de estudio, por lo que se puede corroborar la factibilidad de la acción del veneno de *Tityus* sp. sobre el crecimiento microbiano

Por otro lado, se presentó resistencia por *E. coli* y *C. neoformans* al tratamiento con veneno de *Tityus* sp. La falta de efectividad del veneno de este escorpión frente a algunas cepas microbianas, puede estar dado por varios factores. En principio, pueden estar ausentes los péptidos que reconozcan las membranas de estas cepas estudiadas, o en el caso que existieran dentro del veneno, puede deberse a la competición de estos con otras moléculas bioactivas por el sitio de reconocimiento. Yuan *et al.* en 2010 sugiere que los péptidos antimicrobianos en su formación, pudieron derivar de la señalización de una membrana externa celular, por lo que las cepas microbianas con el tiempo adquieren resistencia por mutación de estos puntos de reconocimiento. Estos cambios estructurales generarían un obstáculo a la toxina para adherirse y causar su actividad biológica (Bosmans & Tytgat, 2007). Otra razón puede ser, la competencia por sitios de reconocimiento sobre las membranas celulares entre péptidos y otras sustancias que conforman el veneno, que también juega un papel en la facilidad o dificultad que tenga el péptido antimicrobiano de realizar su actividad biológica.

Otra clase de péptidos, como se ha mencionado, son los que actúan sobre canales mayormente de células excitables. Estos pueden alterar la actividad fisiológica del sistema nervioso (Massensini *et al.*, 2003; Lopes & Lebrun, 2003; Jalali *et al.*, 2007; Cologna *et al.*, 2009), especialmente el sistema neuromotor debido a una despolarización de la neurona. Es de aclarar que el mecanismo de acción de los diversos péptidos varía y pueden presentarse un sin número de casos para dar como resultado la actividad de estos sobre el tejido en mención: hay la posibilidad de que los péptidos actúen tanto en la membrana pre- como post-sináptica sobre sus respectivos canales iónicos. Si la acción es post-sináptica en el complejo neuromotor, se presenta la posibilidad de la actividad de CaScTx acumulando Ca^{++} descontroladamente dentro de la célula generando una contracción muscular. Si por otro lado es pre-sináptica, la despolarización causada por otros tipos de neurotoxinas sobre la neurona produce una liberación descontrolada de neurotransmisores que al final producirán su efecto motor. Un ejemplo es el veneno del escorpión amarillo *Odontobuthus doriae* que presenta tanto actividad pre-sináptica como post-sináptica sobre la transmisión neuromuscular, pero presenta mayor actividad pre-sináptica en bajas concentraciones, mientras que la post-sináptica puede indicar mecanismo miotóxico a mayores

concentraciones (Jalali *et al.*, 2007). La relación de este escorpión amarillo con nuestra especie objeto de estudio, es que pertenecen a la misma familia, grupo taxonómico conocido por las propiedades de su veneno: su acción sobre canales iónicos de células excitables.

El veneno completo del escorpión *Tityus* sp. mostró una marcada actividad estimulante sobre el músculo gastrocnemio del anfibio *R. marina*. Presentó una curva dosis–efecto en la que se determinó con mayor efectividad la concentración 50% = 0.288mg/Kg ($p=0,000$). La característica del comportamiento en la preparación del músculo muestra una amplitud mayor en la lectura de cada contracción cuando fue tratado con veneno. Adicionalmente, se mantuvo dicha amplitud asemejándose a un tétanos muscular; es decir, el músculo aumentó su contracción y se mantuvo de esa manera en el tiempo (Figura11), por lo que se puede inferir que el veneno estimula el músculo. Una de las posibles respuestas a este comportamiento muscular producido por el veneno, es la acción de péptidos que afectan la activación de canales Na^+ (Zhijian *et al.*, 2006) debido a que estos pueden producir hiper-excitación de la célula pre-sináptica en respuesta de una prolongación del potencial de acción. Si bien es cierto que el veneno de esta especie muestra sus primeros resultados en este trabajo, estudios han sugerido que variadas neurotoxinas provenientes de diferentes especies de animales que actúan sobre canales Na^+ , producen efectos similares (Massensini *et al.*, 2003). Similarmente, otros trabajos mencionan la actividad de estos canales (Yuan *et al.*, 2010), como ejemplo, se reporta que el veneno del género *Tityus* produce una desordenada liberación de catecolaminas y otros neurotransmisores (De Roodt *et al.*, 2009), entre los que se encuentra la acetilcolina, quien es la responsable de la estimulación muscular luego de ser liberada por la neurona terminal al espacio sináptico en placa motora. En concordancia con el resultado obtenido en este trabajo, Borja, *et al* (2008) reportan una excitación del músculo esquelético (diafragma de ratón) posterior a la acción del veneno de dos especies de *Tityus* Brasileños, determinando sus resultados como un efecto inotrópico positivo, atribuido posiblemente a la actividad de toxinas bloqueadoras de canales K^+ y/o las que bloquean el mecanismo de inactivación de canales Na^+ .

Hasta el momento, las actividades biológicas encontradas en el veneno del escorpión *Tityus* sp. son antimicrobianas y neurotóxica como se menciona en este trabajo, informando y soportando simultáneamente, la posible explicación molecular. Sin embargo, es de aclarar que se evaluó el veneno completo de esta especie de escorpión, dejando abierta la posibilidad de la

actividad de moléculas que aisladas del veneno, pudieran disminuir el crecimiento de microorganismos, sobre los que no se encontró actividad en nuestros resultados, o que por otra parte, la actividad biológica presentada tanto en la parte antimicrobiana como neurotóxica, solo se presente de manera sinérgica con este veneno

Las propiedades bioquímicas que pueda contener una sustancia como es el veneno de esta especie de escorpión es propicia para la investigación. El veneno de los escorpiones posee efectos farmacológicos conspicuos (Cologna, *et al.* 2009), como la actividad biológica antimicrobiana (Rates; *et al.* 2008; Remijson *et al.*, 2010) encontrada sobre *C. albicans*, *C. krusei*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*; y la actividad biológica voltaje-dependiente (Massensini *et al.*, 2003; Borja *et al.*, 2008) encontrada en músculo gastrocnemio del anfibio *R. marina*. Son actividades biológicas que pueden favorecer el futuro biotecnológico y/o fisiopatológico (Borja *et al.*, 2008; Cologna *et al.*, 2009).

8. CONCLUSIONES

El veneno del escorpión *Tityus* sp. presenta una débil actividad antimicrobiana sobre el crecimiento *in vitro* de las especies *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

El veneno del escorpión *Tityus* sp. presenta una marcada actividad antifúngica sobre el crecimiento *in vitro* de las especies *C. albicans* y *C. krusei*.

El veneno del escorpión *Tityus* sp. no presenta actividad antimicrobiana sobre el crecimiento *in vitro* de las especies *E. coli* y *C. neoformans*.

La concentración de veneno con mayor actividad antimicrobiana para la especie *P. aeruginosa* fue de 1 mg/mL.

La concentración de veneno con mayor actividad antimicrobiana para la especie *S. aureus* fue de 0,5 mg/mL.

La concentración de veneno con mayor actividad antifúngica para la especie *C. albicans* fue de 1 mg/mL con una MIC equivalente a una concentración 0.25 mg/mL.

La concentración de veneno con mayor actividad antifúngica para la especie *C. krusei* fue de 1 mg/mL con una MIC equivalente a una concentración 0.063 mg/mL.

El veneno del escorpión *Tityus* sp. presenta marcada alteración de la contracción sobre el músculo gastrocnemio del anfibio *R. marina*, mostrando específicamente estimulación sobre éste.

La concentración más efectiva en respuesta dosis-efecto para la alteración de la contracción muscular fue del 50%, equivalente a una concentración de 0.288mg/kg.

9. RECOMENDACIONES

Determinar la especie de escorpión objeto de estudio.

Aislar el, o los péptidos que causan la inhibición de crecimiento microbiano *in vitro* para realizarles los estudios correspondientes (secuenciarlos, verificar propiedades bioquímicas, farmacológicas, etc.).

Aislar el, o los péptidos que promueven una alteración en la contracción muscular para realizarles los estudios correspondientes (secuenciarlos, verificar propiedades bioquímicas, farmacológicas, etc.).

Utilizar los conocimientos adquiridos de las investigaciones para aplicaciones biotecnológicas concretas como el uso de estos péptidos o sus propiedades a manera de fármacos.

10. BIBLIOGRAFÍA

ADIGUZEL, S., 2010. *In vivo* and *in vitro* effects of scorpion venoms in Turkey: a mini-review, *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. Vol.: 16, Nº 2, 198-211 p.

ANDRADE, M. V.; ASSIS LISBOA, F.; LÓPEZ PORTUGAL A.; ESTARES ARANTES R. M. and CUNHA-MELO J. R., 2007. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines, En: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, Nº 146, 581–587 p.

ARANTES, E.; RICCIOPPO-NETO, F.; SAMPAIO, S. V.; VIEIRA, C. A. and GIGLIO, J. R., 1994. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels, En: *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol: 1, 69 – 75 p.

BARONA, J.; OTERO, R. y NÚÑEZ, V., 2004. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica, En: *Biomédica*, Vol: 24, 42-49 p.

BARONA, J.; BATISTA, C.; ZAMUDIO F.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; WANKE, E.; OTERO, R. and POSSANI, L., 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺- and K⁺-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*, En: *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol: 1764, 76 – 84 p.

BATISTA, C.; ZAMUDIO, F.; LUCAS, S.; FOX, J.; FRAU, A.; PRESTIPINO, G. and POSSANI, L. D., 2002. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺ -channels, En: *Toxicon*, Vol: 40, 557-562 p.

BATISTA, C.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S. A.; SALAS-CASTILLO, S.; ZAMUDIO, F. Z.; GÓMEZ-LAGUNAS, F. AND POSSANI L. D., 2007. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species, En: Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Vol: 146, 147–157 p.

BORJA OLIVEIRA, C..R.; PERTINHEZ, T.A.; RODRÍGUEZ SIMIONI, S., 2008. Positive inotropic effects of *Tityus cambridgei* and *T. serrulatus* scorpion venoms on skeletal muscle, En: Comparative Biochemistry and Physiology, Vol: 10, Nº1016, 9-14 p.

BOSMANS, F. and TYTGAT, J., 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins, En: Toxicon, Vol: 49, 142–158 p.

BUITRÓN GARCÍA R.; BONIFAZ, A.; CHASSIN, O. A.; KUBA, E. B.; ARAIZA, J. y ROMERO-CABELLO, R., 2007. Correlación clínico-micológica de la candidiasis vulvovaginal, En: Ginecología obstétrica Mexicana, Vol: 75, 68-72 p.

CANDIDO, L. S., 2004. Maintenance of scorpions of the genus *Tityus koch* (scorpiones, Buthidae) for venom obtention at Instituto Butantan. Sao Paulo, Brazil, En: Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, Vol:10, n.1, 86-97 p.

CANTÓN LACASA, E.; MARTIN MAZUELOS, E. y ESPINEL INGROFF, A., 2001. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. En: Revista Iberoamericana de Micología. Capítulo 15, 1- 13 p.

CHIPPAUX J. and GOYFFON, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal, En: Acta Tropical, vol: 107, 71–79 p.

COLOGNA, C.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. AND ARANTES E., 2009. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview, En: *Protein & Peptide Letters*, Vol: 16, 920-932 p.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; VILLEGAS, E.; BARNHAM K. J.; NORTON R. and NAKAJIMA T., 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*, En: *Biochemistry Journal*, Vol: 359, 35-45 p.

CRUTTENDEN, K.; NENCIONI, A. L.; BERNARDI, M. and DORCE, V.A.C., 2008. Reproductive toxic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats, En: *Reproductive Toxicology*, Vol: 25, 497–503 p.

DALE, E.; VERDONK, F.; GROBLER, A.; FOUNE, C. and PLESSIS J., 2006. Ion selectivity of scorpion toxin-induced pores in cardiac myocytes, En: *Peptides*, Vol: 27, 55 – 61 p.

DE ROODT, A.; LAGO, N.; SALOMÓN, O.; LASKOWICZ, R.; NEDER DE ROMÁN, L.; LÓPEZ, R.; MONTERO, T. and VEGA, V., 2009. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina: *Tityus confluens*, En: *Toxicon*, Vol. 53, 1–8 p.

DÍAZ, P.; D'SUZE, G.; SALAZAR, V.; SEVCIK C.; SHANNON, j.; SHERMAN, N. and FOX, J. W., 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes, En: *Toxicon*, Vol: 54, 802–817 p.

ESCOBAR, E.; FLORES, L. y RIVERA, C., 2008. Péptidos antibacterianos de los venenos de *Hadruroides mauryi* y *Centruroides margaritatus*, En: *Revista Peruana biológica.*, Vol: 15, Nº1, 139-142 p.

FATANI, A. J., 2010. Comparative study between peripherally and centrally acting sublethal and lethal doses of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in rabbits: the usefulness of the sodium channel blocker lidocaine, En: Saudi Pharmaceutical Journal, N° 18, 137-151 p.

FLÓREZ, E., 2007. Los escorpiones: enigmáticas reliquias del pasado poco conocidas en Colombia, En: Innovación y Ciencia, Vol: XIV, N° 1, 26-33 p.

GAO, B.; TIAN, C. and ZHU, S., 2007. Inducible antibacterial response of scorpion venom gland, En: Peptides, Vol: 28, 2299-2305 p.

GÓMEZ CARDONA, J. P.; OTERO PATIÑO, R.; NUÑEZ R. V.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ CADAVID, A. y VELÁSQUEZ SANDINO, M. P., 2008. Aspectos toxinológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin, En: Medunab, Vol: 5, N°15, 159-65 p.

GÓMEZ J. y OTERO R., 2007. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. En: Rev Fac Nac Salud Pública, Vol: 25, N° 1, 50-60 p.

GUERRERO VARGAS, J.A., 2002. Aislamiento, Purificación y Evaluación de Neurotoxinas del Escorpión *Centruroides margaritatus* (BUTHIDAE) del Municipio de El Patía, Departamento del Cauca, Colombia. Popayán. 100 p. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Programa de Biología.

GUERRERO VARGAS, J.A.; DA SILVA, M. y DE SOUZA, M., 2008. Aplicación biotecnológica de la toxinología: la importancia del veneno de escorpiones y la secreción cutánea de anuros, En: Innovación y Ciencia, Vol: XV, N° 2, 16-25 p.

GUIDINE, P.; MORAES-SANTOS, T.; MASSENSINI, A. and DUTRA MORAES, M. F., 2008. Carbamazepine is effective in the treatment of 21-day-old Wistar rats injected with *Tityus serrulatus* crude venom, En: Journal Brainres. Vol: 10, N°1016, 8-16 p.

HANCOCK, R. and DIAMOND, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, En: Trends in Microbiology, Vol: 8, 402-410 p.

JALALI, A.; VATANPOUR, H.; HOSSEININASAB, Z.; ROWAN, E. AND HARVEY, A., 2007. The effect of the venom of the yellow Iranian scorpion *Odontobuthus doriae* on skeletal muscle preparations *in vitro*, En: Toxicon, Vol: 50 1019–1026 p.

JENSSEN, H.; HAMILL, P. and HANCOCK, R. E. W., 2006. Peptide Antimicrobial Agents, En: Clinical Microbiology Reviews, Vol: 19, N° 3, 491–511 p.

KARALLIEDDE, L., 1995. Animal toxins. En: British Journal of Anaesthesia, N° 74: 319-327 p.

KUHN-NENTWIG, L., 2003. Antimicrobial and peptides of venomous arthropods, En: Cellular and Molecular Life Sciences, Vol: 60, 2651-2668 p.

LEQUIN, O.; LADRAM, A.; CHABBERT, L.; FRANCINE, B.; CONVERT, O.; VANHOYE, D.; CHSSAING, G.; NICOLAS, P. and AMICHE, M., 2006. Dermaseptin S9, an R-Helical Antimicrobial Peptide with a Hydrophobic Core and Cationic Termini, En: Biochemistry, Vol: 45, N° 2, 468-480 p.

LOPES, M. R.. & LEBRUN, I., 2003. TSII toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopathologic studies, En: Brain Research Bulletin, Vol: 62, 165–172 p.

MARTIN MAZUELOS, E.; CANTÓN LACASA, E. y ESPINEL INGROFF, A., 2001. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, En: Revista Iberoamericana de Micología, Capítulo 16, 1- 9 p.

MASSENSINI, A. R.; ROMANO-SILVA, M. A. and VINICIUS GOMEZ, M., 2003. Sodium channel toxins and neurotransmitter release, En: Neurochemical Research, Vol: 28, N° 10, 1607 p.

MINGFU, N.; LI, X.; WEI, J.; CAO, R. and CHEN P., 2008. The molecular design of a recombinant antimicrobial peptide CP and its in vitro activity, En: Protein Expression and Purification, Vol: 57 95–100 p.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1997, Métodos de Dilución para el Estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana para Bacterias de Crecimiento Aeróbico-Cuarta Edición; Norma Aprobada, M7-A4, Vol: 17, N°2, Wyne, Pensilvania, USA, 24p.

-----, 1998, Normativa para la Puesta en Práctica del Estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana; Octavo Suplemento Informativo, M100-S8, Vol: 18, N°1, Wyne, Pensilvania, USA, 92p.

-----, 2000, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility, Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition, M7-A5, Vol: 20, N°2, Wine, Pensilvania, USA, 36p.

NENCIONI, A. L.; ANTIQUES LAURENÇO, G.; LEVRUN, I.; FLORIO, J. C. AND DORCE, V., 2009. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats, En: Neuroscience Letters, Vol: 463, 234–238 p.

NOMURA, K.; CORZO, G.; NAKAJIMA, T. and IWASHITA, T., 2004. Orientation and Pore-Forming Mechanism of a Scorpion Pore-Forming Peptide Bound to Magnetically Oriented Lipid Bilayers, En: Biophysical Journal, Vol: 87, 2497–2507 p.

OMRAN, M., 2003. Cytotoxic and apoptotic effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell lines, En: Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, Vol: 9, N° 2, 1-17 p.

OTERO, R.; URIBE, F. y SIERRA, A., 1998. Envenenamiento Escorpiónico en Niños, En: Actualizaciones Pediátricas, Vol: 8, N° 3, 88-92 p.

OTERO, R.; NAVIA, E.; CÉSPEDES, F.; NUÑEZ, N.; LOZANO, L.; MOSCOSO, E.; MATAALLANA, C.; ARSUZA, N.; GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, D.; RODAS, J.; RODRÍGUEZ, O.; ZULETA, J.; GÓMEZ, J.; SALDARRIAGA, M.; QUINTANA, J; NUÑEZ, V.; CÁRDENAS, S.; BARONA, J.; VALDERRAMA, R.; PAZ, N.; DÍAZ, A.; RODRÍGUEZ, O.; MARTÍNEZ, M.; MATURANA, R.; BELTRÁN, L.; MESA,, J.; PANIAGUA, J.; FLÓREZ, E. and LOURENÇO, W., 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects, En: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 742—750 p.

PANEQUE PERES, A. C.; NAOMI, P.; DE TARSO, P.; TOYAMA, M., MELO, C.; DE PAULA, R.; DOLNIKOF, M.; ZAMUNER, R. and FRANCO, L., 2009. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. En: Toxicon, vol: 53, 779–785 p.

PRESCOTT, L., 2002. Microbiology, 5th Edition, Mcgraw-hill, EEUU.

REMIJSON Q.; VERDONK, F. and WILLIAMS, J., 2010. Parabutopirin, a cationic amphipathic peptide from scorpion venom: Much more than an antibiotic, En: *Toxicon*, Vol: 55, 180–185 p.

RATES, B.; FERRAZ, K.; BORGES, M.; RICHARDSON, M.; DE LIMA, M. E. and PIMENTA, A., 2008. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: Assessing Venom Peptide Diversity, En: *Toxicon*, Vol: 52, 611-618 p.

RIVERA, C.; FLORES, L.; RIVERA, M. Y RIVERA, C., 2010. Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del Veneno de *Centruroides margaritatus*, En: *Revista Perú de Biología*, Vol: 17, N°1, 129-132 p.

RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.; GARCÍA, B.; D'AMBROSIO, C.; GARCÍA, Diego; SCALONI, A. and POSSANI, L., 2004. Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury, En: *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol: 61, 1507-1519 p.

RODRÍGUEZ BUITRAGO, J. R., 2008. Determinación del efecto clínico e histopatológico causado por el veneno del escorpión *Tityus pachyurus* (BUTHIDAE), en ratones cepa ICR. Bogotá D.C. 103 p. Proyecto de tesis para aspirar al grado de magister en toxicología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Maestría en toxicología.

SAMPAIO, S.; COUTINHO-NETTO, J.; ARANTES, E.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B. and GIGLIO, J., 1996. Isolation of toxin TsTX-VI from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes, En: *Biochemistry*, Vol: 4 N° 39.

SILVA, É.; CAMARGOS, T.; MARANHÃO, A.; SILVA-PEREIRA, I.; SILVA, L.; POSSANI, L. and SCHWARTZ, E., 2009. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*, En: *Toxicon*, Vol: 54, 252–261 p.

TAN, P. T.J; VEERAMANI, A.; SRINIVASAN, K.; RANGANATHAN, S. AND BRUSIC, V., 2006. SCORPION2: A database for structure–function analysis of scorpion toxin, En: *Toxicon*, Vol: 47, 356–363 p.

TYTGAT, J.; CHANDY, G.; GARCÍA, M.; GUTMAN, G.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F.; VAN DER WALT, J. and POSSANI, L., 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies, En: *Pharmacological Sciences*, Vol: 20, 444-447 p.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D.M.; LANZER, D.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; DE LIMA, M.E.; SANTOS, R.A.S. and PIMENTA, A.M.C., 2008. *Tityus serrulatus* Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom, En: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 515–520 p.

YUAN, W., CAO, L.; MA, Y.; MAO, P.; WANG, W.; ZHAO, R.; WU, Y.; CAO Z. and LI, W., 2010. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*, En: *Peptides* Vol: 31, 22–26 p.

YOUNT, N.; BAYER, A.; XIONG, Y. and YEAMAN, M., 2006. Advances in Antimicrobial Peptide Immunobiology, En: *Wiley Periodicals*, 1-45 p.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M. and WENXIN, L., 2006. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification, En: *Toxicon*, Vol: 47, 348–355 p.

ZHU, S. and GAO, B., 2006. Molecular characterization of a new scorpion venom lipolysis activating peptide: evidence for disulfide bridge-mediated functional switch of peptides, En: *FEBS letters*, Vol: 580, 6825-6826 p.