

Aislamiento y algunas propiedades de la toxina Be1 del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* (Gervais, 1841) (Scorpiones:Bothriuridae)

Isolation and some properties of Be1 toxin from the venom of *Brachistosternus ehrenbergii* (Gervais, 1841) (Scorpiones:Bothriuridae)

Catherina Ramos y Enrique Escobar

Instituto de Investigaciones de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular

Email Enrique Escobar: eescobarg@unmsm.edu.pe

Resumen

Mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25 (16 x 1,1 cm) con buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 7, del veneno del escorpión *Brachistosternus ehrenbergii* fue aislada una proteína con acción tóxica sobre ratones albinos. En este sistema la toxina interactúa con el gel y es eluida al final luego de usar el mismo buffer conteniendo NaCl 0,6M. La toxina fue denominada Be1 y es una proteína básica que constituye el 8,1% de la proteína total del veneno. La pureza de la toxina fue evaluada por electroforesis en condiciones nativas, de acuerdo al método de Reisfeld, y en condiciones denaturantes por el método de Schägger y von Jagow, determinándose que la toxina es una sola cadena polipeptídica de 6,3 kDa. La inoculación de 60 µg de toxina en ratones albinos, vía intraperitoneal, genera la aparición de algunos signos locales como hipersecreción salival, seguido por afección respiratoria, arrastre de las patas posteriores, hasta finalmente al cabo de 2 horas, producir la muerte. Vía intramuscular (7,6 µg), Be1 produce parálisis temporal de la extremidad inoculada. La toxina no tiene actividades de fosfolipasa, proteasa, acetilcolinesterasa ni actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa.

Palabras claves: toxina, veneno de escorpión, *Brachistosternus ehrenbergii*

Abstract

By means of cationic exchange chromatography on CM-Sephadex C-25 column (16 x 1,1 cm) with ammonium acetate buffer 0,05 M at pH 7, from *Brachistosternus ehrenbergii* scorpion venom was isolated a protein with toxic activity on mice. In this system the toxin was ligated to gel and was eluated with buffer and NaCl 0,6M. The toxin denominated Be1 and it characterizes to be a basic protein that constitute 8,1% of venom total protein. Toxin purity was evaluated by electrophoresis in natives conditions, according to Reisfeld-method, and denaturants conditions by the Schägger-and-von Jagow-method, the toxin is a single chain polypeptide of 6,3 kDa has been determined. The inoculation of 60 µg toxin on albino mice, intraperitoneal way, produces some local signals as salival hipersecretion followed by respiratory affection, drags hind feet and finally 2 hours after, death. Intramuscular way (7,6 µg) Be1 produces temporal paralysis of the inoculated limb. The toxin has neither phospholipase, nor protease, nor acetylcholinesterase nor acetylcholinesterase inhibitor activity.

Keywords: toxin, scorpion venom, *Brachistosternus ehrenbergii*

Introducción

Los escorpiones son arácnidos venenosos cuyo veneno es una mezcla compleja de mucus, sales, lípidos, azúcares y una gran variedad de compuestos proteicos (neurotoxinas y enzimas). En general las toxinas de veneno de escorpión son proteínas de bajo peso molecular que actúan sobre insectos, crustáceos y roedores, y la mayoría de ellas afectan selectivamente, canales de sodio o canales de potasio (García et al., 2001; Dolowy, 2001).

Las toxinas que afectan canales de sodio tienen de 60 a 70 aminoácidos y 4 puentes disulfuro, mientras que las toxinas que afectan canales de potasio tienen de 30 a 40 aminoácidos y 3 ó 4 puentes disulfuro. Además de estos dos grupos principales, otras toxinas afectan canales de calcio y de cloro (Wudayagiri et al., 2001).

Los estudios relacionados al aislamiento y caracterización bioquímica de toxinas de veneno de escorpión son importantes para el diseño y producción de anti-venenos, especialmente en países donde el accidente escorpionico constituye un problema de salud pública (Inceoglu et al., 2001; Gómez et al., 2002). Igual-

mente estos estudios son importantes porque algunas toxinas son útiles para identificar y entender la fisiología de distintos tipos de canales iónicos. Asimismo, algunas toxinas son selectivas para insectos y otras tienen actividad antibacteriana, lo que les confiere un potencial uso en el desarrollo de bioinsecticidas y en el control terapéutico de bacterias patógenas (Wudayagiri et al., 2001; Corzo et al., 2001).

Brachistosternus ehrenbergii «escorpión de los arenales» está ampliamente distribuido en los departamentos costeros de nuestro país, aunque su presencia también se ha evidenciado en Ecuador y Chile; la mayor densidad poblacional de este arácnido se da en áreas terrosas o arenosas, pero a su vez utiliza variedad de microhábitats como piedras y adobes (Calderón y Aguilar, 1988). *Brachistosternus ehrenbergii* se caracteriza por ser de consistencia fuerte y robusta, de color amarillo anaranjado y superar los 10 cm de longitud. Si bien la picadura puede resultar dolorosa, no se han registrado casos de envenenamiento y se le considera inofensiva para el hombre. La notable densidad poblacional de este quelicerado, motivó en la década de los 80 la realización de un

estudio para evaluar su acción tóxica en animales de laboratorio y potencial peligrosidad con relación al hombre. Esto permitió evidenciar una serie de alteraciones neuromusculares que producían la muerte de los roedores; sin embargo, la toxina responsable de este efecto no fue identificada (Calderón y Aguilar, 1988). Posteriormente Rivera et al. (2004) realizaron una separación preliminar de las proteínas del veneno de *B. ebrenbergii* y determinaron que el veneno tiene débil actividad sobre insectos y crustáceos pero una fuerte toxicidad sobre roedores. El presente trabajo continúa los estudios en el veneno de *B. ebrenbergii* y muestra algunas de las características de la proteína causante del efecto tóxico sobre roedores.

La toxina estudiada en este trabajo, fue denominada Be1, de acuerdo a la nomenclatura de Becerril (Becerril et al., 1997), quien ha propuesto denominar a cada toxina por las iniciales del nombre científico (Be de *Brachistosternus ebrenbergii*) seguido por un número específico de la toxina (en este caso 1, por ser la primera toxina aislada y caracterizada en este veneno).

Materiales y métodos

Material biológico

Se colectaron 49 individuos de *Brachistosternus ebrenbergii* de ambos sexos en las cercanías de la Laguna Encantada (Huacho), y fueron mantenidos individualmente en cubetas plásticas de 10 x 6 x 10 cm con agua *ad libitum* y alimento proporcionado quincenalmente (cucarachas), en el laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Ratones albinos Balb/c de 23 g de peso fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Obtención del veneno

El veneno fue obtenido por estimulación eléctrica (22 voltios) y recolectado con microcapilares en una placa de Petri. Luego fue desecado y conservado en congelación hasta su uso. Por cada animal en promedio se obtuvo de 0,8 a 1,0 mg de veneno.

Purificación de la toxina

El veneno desecado (49,9 mg) fue disuelto en 2,2 ml de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7, y el material insoluble fue removido 3 veces por centrifugación a 5000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante (1,7 ml) se aplicó a una columna de CM-Sephadex C-25 (16 x 1,1 cm) equilibrada con el mismo buffer, y las proteínas retenidas en el gel fueron eluidas con el buffer conteniendo NaCl 0,25 M y NaCl 0,6 M (Escobar et al., 2002). Fracciones de 2 ml fueron colectadas y leídas en un espectrofotómetro a 280 nm. Para verificar la presencia de Be1, se inoculó intraperitonealmente 0,1 ml de cada fracción en ratones albinos.

Cuantificación de proteína

El contenido proteico de Be1 fue determinado por el método de Lowry et al. (1951), usando albúmina bovina como proteína estándar.

Determinación de la pureza y peso molecular

La pureza de Be1 fue determinada por electroforesis en gel de poli(acrilamida) en condiciones nativas (Reisfeld et al., 1962) y por electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (Schägger y von Jagow, 1987). Adicionalmente la PAGE-SDS permitió calcular el peso molecular de la toxina empleando como proteínas estándares citocromo c (12,4 kDa) y

aprotinina (6 kDa). La tinción de las proteínas se realizó con azul brillante de coomassie 0,1%.

Ensayos de toxicidad

La toxicidad *in vivo* fue probada sobre ratones albinos de 23 g de peso por inoculación intraperitoneal de 0,1 ml de la toxina, evaluando el tiempo de aparición de los signos de envenenamiento y la muerte del roedor. Adicionalmente se evaluó el efecto de Be1 vía intramuscular, inoculando 0,1 ml de la toxina en el músculo gastrocnemius.

Actividad de fosfolipasa

La actividad de fosfolipasa se determinó midiendo la disminución de la absorbancia a 920 nm de una emulsión de yema de huevo, al ser incubada por 2 minutos con Be1 o con el veneno crudo. Para ello se emplearon 3 ml de una emulsión de yema de huevo (100 μ l de yema de huevo en 80 ml de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7) y 20 μ l de Be1 (12,4 μ g) ó 10 μ l de veneno crudo (86,62 μ g) (Marinetti, 1965). La actividad específica fue expresada como la disminución en la absorbancia a 920 nm por minuto por mg de proteína.

Actividad de proteasa

Esta actividad fue ensayada usando como substrato azocoll. La mezcla de reacción contenía 0,2 ml de azocoll (12,5 mg/ml), 0,2 ml de buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7 y 100 l de Be1 (6,6 μ g) ó 5 μ l de veneno crudo (43,31 μ g). Luego de incubar a 37 °C por 30 minutos se midió la absorbancia a 520 nm (Chavira et al., 1984). La actividad específica fue expresada como el incremento en la absorbancia a 520 nm por minuto por mg de proteína.

Ensayo de acetilcolinesterasa

Esta actividad se midió utilizando como substrato acetiltiocolina. La mezcla de reacción conteniendo 2,83 ml de buffer fosfato 0,1 M, pH 8, 0,1 ml de ditiobisnitrobenzoato 0,01 M, 20 μ l de acetiltiocolina yodada 0,075 M y 50 μ l de Be1 o veneno crudo, fue incubada a 37°C por 30 minutos y luego se midió la absorbancia a 412 nm (Ellman et al., 1961). La actividad específica fue expresada en μ moles de producto liberado (5-tio-2-nitrobenzoato) por minuto por mg de proteína, considerando un coeficiente de extinción molar de 14150 M⁻¹cm⁻¹.

Inhibición de acetilcolinesterasa

Un homogenizado de cerebro de ratón con actividad de acetilcolinesterasa fue incubado por separado con Be1 y veneno crudo (proporción 1 : 1) a 37 °C durante 15 minutos. Luego se midió la actividad de acetilcolinesterasa con 50 μ l de cada incubado, de acuerdo al protocolo anteriormente indicado.

Resultados

Purificación y peso molecular de la toxina Be1

Luego de pasar el veneno de *B. ebrenbergii* por la columna de CM-Sephadex C-25 se obtuvo un perfil cromatográfico con 4 picos de proteína; el primero pico eluyó directamente con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7, mientras que los picos II y III eluyeron al adicionar NaCl 0,25 M; el último pico eluyó al emplear buffer con NaCl 0,6 M (Figura 1). Cuando las fracciones colectadas fueron inoculadas en los roedores, sólo las fracciones del último pico mostraron toxicidad. La toxina Be1 mostró corresponder al 8,1 % de la proteína del veneno total.

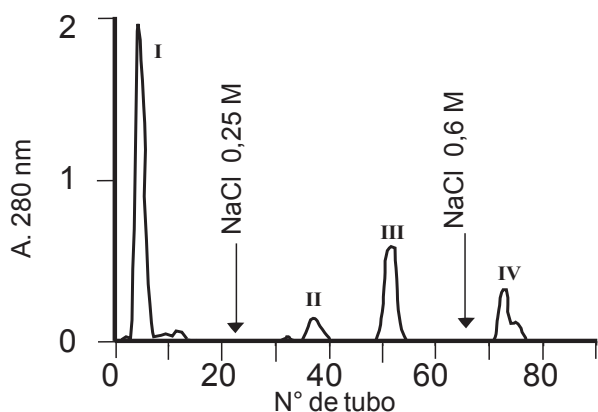


Figura 1. Perfil Cromatográfico del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii*. La toxina Be1 correspondió al pico IV el cual fue eluido con buffer conteniendo NaCl 0,6M

Es importante señalar que este perfil cromatográfico se mantiene hasta cuando el veneno proviene de una tercera extracción de los animales en cautiverio, pues al emplear veneno de extracciones adicionales, los picos III y IV disminuyen considerablemente.

La pureza de Be1 fue confirmada por 2 métodos electroforéticos, uno en condiciones nativas y el otro en condiciones denaturantes y en ambos casos Be1 mostró una sola banda proteica (Figuras 2 y 3).

La electroforesis en condiciones denaturantes permitió determinar que el peso molecular de Be1 es 6,3 kDa y que se trata de una toxina de una sola cadena polipeptídica (Figura 3).

Ensayos de toxicidad

Los ratones inyectados por vía intraperitoneal con Be1 (60 μ g) mostraron durante los primeros 30 minutos de acción de la toxina, hipersecreción salival, dificultad para respirar, convulsiones y arrastre de las extremidades posteriores. A los 40 minutos quedan inmobilizados, con los ojos dilatados, miccionan y secretan saliva en forma exagerada. Aproximadamente 2 horas después de la inoculación, mueren.

La inoculación por vía intramuscular de Be1 (7,6 μ g) resultó en la contracción inmediata de la extremidad por más de 30 minutos; también se observaron sobresaltos y cierta irritabilidad en el comportamiento de los ratones.

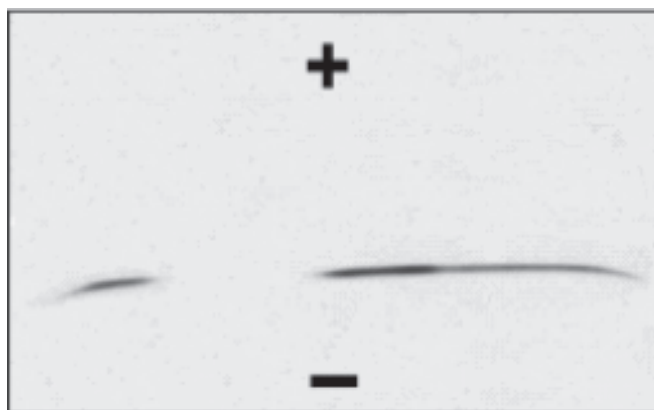


Figura 2. Patrón electroforético de Be1 en condiciones nativas. Be 1 mostró una sola banda proteica con migración hacia el cátodo.

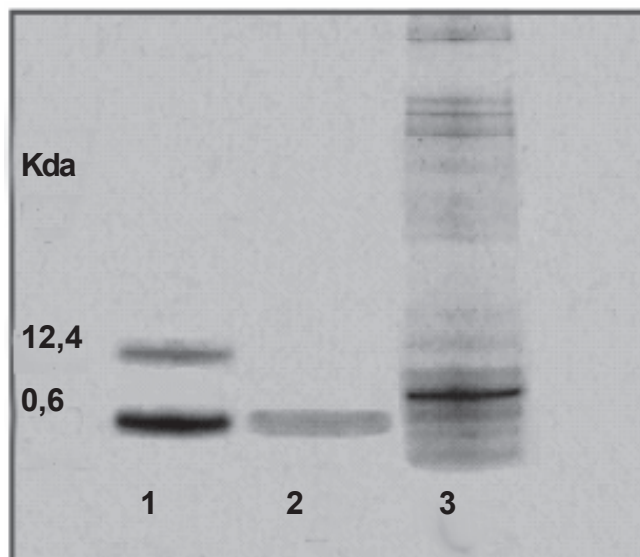


Figura 3. Electroforesis en condiciones denaturantes con SDS. En el carril 1, se pueden ver los estándares de peso molecular: citocromo c (12,4 kDa) y aprotinina (6 kDa), mientras que en el carril 2 aparece Be 1 (6,3 kDa). Finalmente en el carril 3 se muestra el patrón electroforético del veneno crudo de *Brachistosternus ehrenbergii*.

Actividad fosfolipásica y proteolítica

Be1 no varió los niveles de absorbancia a 920 nm y 520 nm al ser incubado con la emulsión de yema de huevo y azocoll respectivamente, por tanto Be1 no presenta actividad de fosfolipasa ni de proteasa. Por otro lado en el veneno crudo tampoco se encontró actividad proteolítica pero sí fosfolipásica con una actividad específica de 2,38 (disminución en la absorbancia 920 nm /min / mg proteína).

Ensayo de acetilcolinesterasa e inhibición de acetilcolinesterasa

Tanto Be1 como el veneno crudo no mostraron actividad de acetilcolinesterasa, es decir no fueron capaces de hidrolizar acetiltiocolina. Igualmente no mostraron actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa ya que no fueron capaces de bloquear la actividad de acetilcolinesterasa mostrada por el tejido cerebral.

Discusión

De acuerdo a lo mostrado en la figura 1, cuando el veneno de *B. ehrenbergii* se pasó por la columna de CM-Sephadex C-25 fue separado en cuatro picos de proteína, de los cuales el último mostró corresponder a la toxina Be1, es decir Be1 se unió fuertemente con el gel y sólo se separó después de emplear NaCl 0,6 M en el buffer de elución. Esto demuestra que a pH 7, la toxina está cargada positivamente lo que le permite interactuar con la carga negativa del grupo carboximetil del gel (-CH₂-CH₂COO⁻) y por lo tanto el pI de Be1 es mayor que 7 tratándose así de una proteína básica. Las neurotoxinas de veneno de escorpión son en general, proteínas básicas de bajo peso molecular que pueden separarse mediante cromatografía de intercambio catiónico a pH neutro (Escobar et al., 2003).

Así por ejemplo, del veneno del escorpión mexicano *Centruroides suffusus suffusus* se han aislado hasta 7 toxinas (C_{ss}I - C_{ss}VII) con pI superiores a 9 (Martin et al., 1967), y del escorpión *Leiurus*

quinquestriatus quinquestriatus se han separado 5 toxinas denominadas LqqI, LqqII, LqqIII, LqqIV y LqqV (Miranda et al., 1970).

La toxina Be1 representó el 8,1 % de la proteína total del veneno, valor que está por debajo al reportado para otras toxinas letales para roedores como Ts que representa el 20% del veneno de *Tityus serrulatus*, o Birtoxina que representa alrededor del 12 – 14% del veneno de *Parabuthus transvaalicus* (Corrêa et al., 1997; Inceoglu et al., 2001).

La pureza de Be1 se estableció mediante 2 métodos electroforéticos, uno de ellos en condiciones nativas y específico para proteínas básicas (método de Reisfeld), y el otro en condiciones denaturantes y de gran resolución para polipéptidos con pesos moleculares por debajo de 14 kDa (método de Schägger y von Jagow). En ambos casos, Be 1 mostró una sola banda homogénea de proteína, lo cual demostró su pureza y lo adecuado del único paso cromatográfico realizado para la separación de esta toxina.

Además, la PAGE-SDS según el método de Schägger y von Jagow, permitió determinar que el peso molecular de Be1 es 6,3 kDa, y que se trata de una toxina de una sola cadena polipeptídica. Muchas otras toxinas aisladas de venenos de escorpión se caracterizan también por ser de bajo peso molecular y de una sola cadena. Así por ejemplo, la toxina BmKIV del escorpión chino *Buthus martensi* Karsch es una cadena polipeptídica simple de 7,2 kDa (Wu et al., 1999), y la toxina Bot XIII del escorpión africano *Buthus occitanus tunetanus* pesa 6,3 kDa (Martin y Rochat, 1984).

En cuanto al efecto tóxico de Be1, en este trabajo se ha determinado que la inoculación intraperitoneal en ratones albinos produce hipersecreción salival, convulsiones, dificultad en la respiración, arrastre de las extremidades posteriores, inmovilización y muerte. Cabe mencionar que los síntomas observados concuerdan en su mayoría con los reportados por primera vez en 1982 para el veneno crudo de esta especie (Calderón y Aguilar, 1988).

Otras toxinas selectivas para mamíferos, también producen efectos similares a Be1. Así por ejemplo BmKIV produce poliuria, disnea, reducción de movimientos y muerte en roedores (Wu et al., 1999); las 2 toxinas principales de *Tityus serrulatus*, Ts y tityustoxina inducen también hipersecreción salival, disturbios respiratorios y muerte de los roedores (Cunha-Melo y De Andrade 2000).

La inoculación por vía intramuscular de Be1 se manifestó por la contracción de la extremidad inoculada, sobresaltos e irritabilidad. Hl3 y Hm3, dos toxinas de los venenos de *Hadruroides lunatus* y *Hadruroides mauryi*, respectivamente, también producen contracción y el arrastre de la pata inoculada durante el desplazamiento del animal (Escobar et al., 2002; Velásquez y Escobar, 2004).

Cabe señalar que tanto el veneno crudo como Be1 no tienen actividad proteolítica sobre azocoll, ni actividad de acetilcolinesterasa e inhibidora de acetilcolinesterasa. Asimismo, Be1 no tiene actividad de fosfolipasa, aunque el veneno crudo si presenta dicha actividad.

En este sentido el veneno de *Brachistosternus ebrenbergii* es similar al de *Tityus serrulatus* y *Tityus bahiensis*, los cuales tampoco tienen ninguna de las actividades enzimáticas aquí probadas (Diniz y Gonçalves, 1960). Sin embargo el veneno de *Palameous gravimanus* o *Buthus tamulus* si presenta actividad proteolítica (Master et al., 1963), mientras que el veneno de *Heterometrus scaber*, contiene actividad de acetilcolinesterasa. Asimismo los venenos de *Buthus minax* y *Heterometrus fulvipes*, tienen actividad inhibidora de

acetilcolinesterasa aunque aún no se han purificado los inhibidores (Nair y Kurup, 1975; Narayana et al., 1984).

Las características bioquímicas encontradas para Be1, es decir su letalidad y especificidad en roedores, así como su bajo peso molecular (6,3 kDa) y la carencia de alguna actividad enzimática, permiten suponer que se trata de una toxina relacionada con la gran familia de proteínas que tienen acción sobre canales de sodio en mamíferos.

Las toxinas de venenos de escorpión que afectan específicamente los canales de sodio de mamíferos, se caracterizan justamente por tener pesos moleculares entre 6 y 8 kDa, así como carecer de actividades enzimáticas y ser muy tóxicas. Estas toxinas pueden ser de dos tipos, según la modificación causada en el canal.

Así, tenemos las toxinas tipo α , que son aquellas que reducen o bloquean el mecanismo de inactivación del canal de sodio, y que se han aislado principalmente de venenos de escorpiones del «viejo mundo». Por otro lado las toxinas tipo β , se caracterizan por activar el canal de sodio abriéndolo durante mas tiempo, incluso con potenciales de membrana a los cuales ellos normalmente estarían cerrados; estas toxinas se han obtenido mayormente de venenos de escorpiones americanos.

En cualquiera de los dos casos, estas toxinas mantienen más tiempo activos a los canales de sodio y así provocan descargas espontáneas y repetitivas de potenciales de acción logrando prolongar la acción de éstos en nervios y músculos (Vatanpour, 2003).

La toxina AaHIII de *Androctonus australis* Hector es una α -toxina, mientras que la Cn2 de *Centruroides noxius*, es una β -toxina (Possani et al., 1999).

Es posible que los efectos producidos por Be1 sean producto de su acción sobre canales de sodio, con la consecuente prolongación de los potenciales de acción.

En general, la dieta de los escorpiones está constituida principalmente por insectos los cuales son paralizados por el veneno. Sin embargo en un trabajo previo nosotros hemos encontrado que el veneno de *Brachistosternus ebrenbergii* tiene poca toxicidad en insectos lo cual indicaría que para la captura de estas presas, el escorpión recurre principalmente a su gran envergadura y grandes quelas, prescindiendo de insectotoxinas específicas (Rivera et al., 2004). Por otro lado la presencia de una fuerte toxina para roedores, como en este trabajo se ha demostrado, permitiría suponer que esta toxina cumple un papel de defensa hacia posibles predadores o incluso que es utilizada por *Brachistosternus ebrenbergii* para procurarse algunos roedores en su dieta. Nosotros en el laboratorio hemos verificado como este escorpión es capaz de atacar y comer crías de roedores, lo cual se relaciona también con algunas descripciones que indican la presencia de este escorpión, en la naturaleza, cerca de galerías de pequeños roedores.

Esta especialización es observada también en el veneno del escorpión sudafricano *Parabuthus transvaalicus* el cual supera los 15 cm de longitud (Inceoglu et al., 2001).

Agradecimientos

El trabajo contó con el financiamiento del Consejo Superior de Investigaciones de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Proyectos 031001211 y 041001221).

Literatura citada

- Becerril, B.; Marangoni, S. and Possani, L. 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tytilus*. *Toxicon*. 35 (6) : 821-835.
- Calderón, S. y Aguilar, P. 1988. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. X : Efecto del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* sobre ratones albinos. *Rev. peru. Ent.* 30 : 91-93.
- Chavira, R.; T. Burnett and J. Hageman. 1984. Assaying Proteinases with Azocoll. *Anal Biochem*. 136 : 446 - 450.
- Corzo, G.; Escoubas, P.; Villegas, E.; Barnham, K.; He, W.; Norton, R. and Nakajima, T. 2001. Characterization of unique amphipatic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.* 359 : 35-45.
- Corrêa, M.; Sampaio, S.; Lopes, R.; Mancuso, L.; Cunha, O.; Franco, J and Giglio, J. 1997. Biochemical and Histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin Tityustoxin-I. *Toxicon*. 35(7) : 1053-1067.
- Cunha-Melo, J. and De Andrade, M. 2000. *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxins as tools for physiological studies. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the advancement of science*. 52 (6) : 377-385.
- Diniz, C. and Gonçalves, J. 1960. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* 41 : 470-477.
- Dolowy, K. 2001. Environmental toxins and ion channels. *Cell. Biol. Mol. Lett.* 6(2A) : 343-347.
- Ellman, G., Courtney, K.; Andres, V. and Featherstone, R. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7 : 88-95.
- Escobar, E.; Rivera, C.; Tincopa, L. y Rivera, D. 2002. Purificación parcial de las Toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* Koch, 1867 (Scorpionida : Vejovidae). *Rev. peru. biol.* 9 (1) : 3-10.
- Escobar, E.; Velásquez, L. y Rivera, C. 2003. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones : Buthidae). *Rev. peru. biol.* 10(2) : 217-220.
- García, M.; Gao, Ying-Duo; Mcmanus, O. and Kaczorowski, G. 2001. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon*. 39: 739-748.
- Gómez, J.; Otero, R.; Núñez, V.; Saldarriaga, M.; Díaz, A. and Velásquez, M. 2002. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tytilus fuhrmanni* Kraepelin. *MEDUNAB.* 5 (15) : 159-165.
- Inceoglu, B.; Lango, J.; Wu, J.; Hawkins, P.; Southern, J. and Hammock, B. 2001. Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae). *European Journal of Biochemistry*. 268 (20) : 5407-5413.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Marinetti, G. 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 98 : 554-565.
- Martin, M.; García, L.; El Ayeb, M.; Kopeyan, C.; Bechis, G., Jover, E. and Rochat, H. 1967. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (10) : 4452-4459.
- Martin, M. and Rochat, H. 1984. Purification of thirteen toxins active on mice from the venom of the north African scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *Toxicon*. 22 (2) : 279-291.
- Master, R.; Srinivasa, S. and Soman, P. 1963. Electrophoretic separation of biologically active constituents of scorpion venoms. *Biochim. Biophys. Acta.* 71 : 422-428.
- Miranda, F.; Kupeyan, C.; Rochat, C. and Lissitzky, S. 1970. Purification of animal neurotoxins. Isolation and Characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis* Hector, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur. J. Biochem.* 16 : 514-523.
- Nair, R. and Kurup, P. 1975. Investigations on the venom of South Indian scorpion *Heterometrus scaber*. *Biochim Biophys Acta.* 381 (1) : 165-174.
- Narayana, B.; Maniraj, L. and Babu, K. 1984. Impact of scorpion *Heterometrus fulvipes* venom on cholinesterase rhythmicity in the tropical mouse *Mus booduga*. *Indian J. Physiol Pharmacol.* 28 (1) : 47-52.
- Possani, L.; Becerril, B.; Delepierre, M. and Tytgat, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ - channels. *Eur. J. Biochem.* 264 : 287-300.
- Reisfeld, A.; Lewis, J. and Williams, F. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*. 195 : 281-283.
- Rivera, C.; Tincopa, L.; Ramos, C.; Manya, W. y Escobar, E. 2004. Estudio preliminar del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* Gervais, 1841 (Scorpiones : Bothriuridae). Libro de Resúmenes. XIII Reunión Científica ICBAR. UNMSM.
- Shägger, H. and von Jagow, G. J. 1987. Tricine-Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 : 368-379.
- Vatanpour, H. 2003. Effects of black scorpion *Androctonus crasicuda* venom on striated muscle preparation in vitro. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 17-22.
- Velásquez, L. y Escobar, E. 2004. Purificación y caracterización parcial de una toxina (Hm3) del veneno de *Hadruroides mauryi* (Francke y Soleglad, 1980) (Scorpiones, Iuridae). *Rev. peru. biol.* 11 (2) : 153-160.
- Wu, H.; Wu, G.; Huang, X.; He, F. and Jiang, S. 1999. Purification, characterization and structural study of the neuro-peptides from scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Pure Appl. Chem.* 71 (6) : 1157-1162.
- Wudayagiri, R.; Inceoglu, B.; Herrmann, R.; Derbel, M.; Choudary, P. and Hammock, B. 2001. Isolation and characterization of a novel lepidopteran-selective toxin from the venom of South Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*. *BMC Biochemistry*. 2 : 16-23.

