



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL VENENO DE *Hadruido* sp. “escorpión”, FRENTE A *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* Y *Serratia marcescens*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY *in vitro* OF THE POISON OF *Hadruido* sp. “scorpion”, AGAINST *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* AND *Serratia marcescens*

Christian Alexander Rivera Salazar^{1*}; Rafael Tapia Limonchi²; Jacqueline Isasi Rosas³

¹Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Jaén, Jaén - San Ignacio, 06800, Jaén, Perú.

²Instituto de Enfermedades Tropicales, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Calle Higos Urco N°342-350-356 - Calle Universitaria N° 304, Chachapoyas, Perú.

³Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud, Defensores del Morro N°2268, Chorrillos- Lima.

Christian Alexander Rivera Salazar  <https://orcid.org/0000-0002-4959-2188>

Rafael Tapia Limonchi  <https://orcid.org/0000-0001-7483-1729>

Jacqueline Isasi Rosas  <https://orcid.org/0009-0006-8678-1902>

Artículo Original

Recibido: 3 de marzo de 2023

Aceptado: 30 de mayo de 2023

Resumen

La resistencia bacteriana a los antibióticos indica una necesidad urgente de encontrar y desarrollar agentes nuevos a partir de fuentes naturales y el veneno de escorpión proporciona moléculas peptídicas prometedoras para el desarrollo de agentes antibacterianos. En el presente estudio experimental se caracterizó los péptidos del veneno crudo de *Hadruido* sp. (escorpión) y se evaluó su actividad antibacteriana frente a *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Serratia marcescens*. Los 115 *Hadruido* sp se muestrearon en Jaén y se trabajó con una cepa de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. Para el ordeño se aplicó una descarga eléctrica entre 15 a 20 voltios y caracterizado en su composición proteica y tamaño molecular por espectrofotometría UV, SDS-PAGE y UHPLC-Masas (UHPLC-MS/MS). El veneno, fue fraccionado en columnas de Sephadex CM-25. La inhibición del crecimiento bacteriano se ensayó por microdilución. Por SDS-PAGE los péptidos tuvieron PM de 10 kDa. Por Sephadex CM-25 se obtuvieron 11 picos agrupados en cinco fracciones, el análisis por UHPLC-MS/MS de las fracciones obtenidas por CM-25, determino que solo la fracción 3 presenta moléculas de la naturaleza catiónica a los tR (tiempo de retención) de 2.509 y 3.041 min con un rango de masa entre 628 y 699 Da. la fracción III presentó una CMI de 1,26 mg/mL para la cepa *A. baumannii*; sin embargo, no se evidenció CMI para las cepas de *K. pneumoniae* y *S. marcescens* a las concentraciones evaluadas. El veneno de *Hadruido* sp. presente péptidos catiónicos que inhiben el crecimiento de *A. baumannii*.

Palabras clave: *Hadruido* sp., *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, antibacteriano, veneno de escorpión.

Abstract

Bacterial resistance to antibiotics indicates an urgent need to find and develops novel agents from natural sources, and scorpion venom provides promising peptide molecules for the development of antibacterial agents. In the present experimental study, the peptides of the crude venom of *Hadruido* sp.(scorpion) and its antibacterial activity was evaluated against *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Serratia marcescens*. The 115 *Hadruido* sp. were sampled in Jaén and we worked with a strain of *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *S. marcescens*. For milking, and electric discharge was applied between 15 to 20 volts and characterized in its protein composition and molecular size by UV spectrophotometry, SDS-PAGE and UHPLC-Mass (UHPLC-MS/MS). The venom was fractionated in Sephadex CM-25 columns. Inhibition of bacterial growth was test by microdilution. By SDS-PAGE the peptides had MW of 10 KDa. By Sephadex CM-25, 11 peaks grouped into five fractions were obtained, the analysis by UHPLC-MS/MS of the fractions obtained by CM-25, determined that only fraction 3 present molecules of a cationic nature at the tR(retention time) of 2,509 and 3,041 min with a mass range between 628 and 699 Da. fraction III presented a MIC of 1.26 mg/mL for the *A. baumannii* strain; however, there was no evidence of MIC for the strain of *K. pneumoniae* and *S. marcescens* at the concentrations evaluated. The venom of *Hadruido* sp. present cationic peptides that inhibit the growth of *A. baumannii*.

Keywords: *Hadruido* sp., *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, antibacteriano, veneno de escorpión.

*Autor para correspondencia: E. mail: christian.rivera@unj.edu.pe

DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/rebiol.2023.43.01.02>

Citar como:

Rivera, C., Tapia, R., & Isasi, J. (2023). Actividad antibacteriana *in vitro* del veneno de *Hadruido* sp. “escorpión”, frente a *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*. *REBIOL*, 43(1), 14-23.



1. Introducción

K. pneumoniae, *S. marcescens* y *A. baumannii* son bacterias en las que se ha observado un incremento de la resistencia a los antimicrobianos, esto debido al empleo innecesario e inadecuado de antibióticos de última generación, el no cumplimiento del tratamiento terapéutico, el expendio de medicamentos sin receta médica (Requena et al., 2007) y a las insuficientes investigaciones para la búsqueda de nuevos antibióticos.

El fracaso de los antibióticos destaca la necesidad urgente de desarrollar agentes nuevos, potentes y menos tóxicos a partir de fuentes naturales contra varios agentes infecciosos. Los venenos de animales han fascinado durante mucho tiempo a los científicos como fuentes de componentes farmacológicamente activos que pueden explotarse para el tratamiento de dolencias específicas y deben promoverse más allá de los ensayos clínicos (Lamiyan et al., 2020).

Actualmente, el veneno de escorpión presenta molécula de naturaleza proteica contra patógenos infecciosos (Ramar Perumal et al., 2017) que han evolucionado a lo largo de millones años y cuyo mecanismo de acción se ha vuelto más específica y precisa para reconocer canales iónicos presentes en la membrana citoplasmática alterando la permeabilidad de iones principalmente de calcio. La abundancia de este tipo de moléculas en el veneno de escorpión se estima en unos 200.000 péptidos, de los que se conoce menos del 1%, dada la diversidad estimada de estos arácnidos a nivel mundial, que incluye unas 2.231 especies (Santibáñez-López et al., 2016) y solo en una especie se han logrado caracterizar hasta 106 moléculas (Cupitra et al., 2014; Estrada-Gómez et al., 2016; Possani et al., 2002; Prendini, 2011).

El género *Hadruroides*, es uno de los grupos de escorpiones más característicos del Perú y el sur de Ecuador, la mayoría de sus especies se las ubica en la vertiente occidentales de la cordillera de los Andes y son de fácil hallazgo en zonas aledañas de ciudades como Piura, Lima, Chiclayo, Trujillo y Jaén, (Antonio Ochoa & Chaparro, 2008).

Ante este contexto se realizó la caracterización parcial del veneno crudo de *Hadruroides sp* y se evaluó su actividad inhibitoria sobre a *A. baumannii* ATCC 19606, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. marcescens*.

2. Materiales y Métodos

Identificación del escorpión *Hadruroides sp.*

115 especímenes de *Hadruroides sp.*, fueron muestreados en Jaén y mantenidos en el servicio de Biología en recipiente de plástico y alimentados con larvas de *Tenebrio*, *Acheta domesticus* (grillos) y *Periplaneta americana* (cucarachas), para identificarlos se utilizaron claves taxonómicas para especímenes de escorpiones peruanos (Osear, 1977, p. 15) y, los lineamientos de identificación de especie fueron hechas por el Dr. José Ochoa, profesor y taxónomo de la Universidad Nacional de San Antonio Abad, Cusco.

Obtención del veneno de escorpión *Hadruroides sp.*

El veneno se extrajo por aplicación de descarga eléctrica entre 15 a 20 voltios (Zavaleta, 1983) en la última pieza postabdominal (telson) y se recolectó en capilares y depositada en tubos eppendorf con capacidad de 2ml y se congeló a -20 °C.

Determinación de la concentración de las fracciones proteicas del veneno

Cuantificación de proteínas por absorbancia utilizando la siguiente relación: [mg/mL] = (1,56 x Abs 280 nm) - (0,76 x Abs 260 nm) (Fernández y Galván, 2006).

Determinación de la pureza y peso molecular mediante electroforesis PAGE-SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizó de acuerdo con un método descrito por Laemmli (1970). Los experimentos fueron realizados en un sistema MiniProtean™ (BioRad) con capacidad para 2 geles de 1mm de grosor.

El gel de electroforesis estuvo compuesto por dos concentraciones, 10% (gel superior) y 15% (gel inferior), obtenidas a partir de una solución de bis-acrilamida al 40% (19:1), y el porcentaje de concentración del gel fue del 4%.

Se prepararon 2 muestras con diferentes concentraciones de proteínas de veneno: De 10 ug y 20 ug aprox. y se añadió el buffer de muestra para electroforesis. El volumen total de muestra + buffer de muestra para electroforesis, no debe ser mayor a 30 uL, para evitar se trasvase la abertura de siembra de la muestra. La corrida electroforética fue realizada con voltaje a 150 V constante, el amperaje libre, en estas condiciones las corridas electroforéticas se desarrollaban en aproximadamente 60 minutos.

El volumen de marcador molecular aplicado fue de 5µL por gel y la coloración de los geles se realizó con la solución colorante Bio-Safe Comassie G-250 (Bio-Rad), dejando los geles inmersos toda la noche (aprox. 12 horas), en 30 mL de la solución. La resolución de los geles, se realizó con repetidos lavados en agua destilada: se colocó cuidadosamente el gel en un recipiente con agua destilada, hasta cubrir totalmente el gel (si añade agua al recipiente, nunca añada el agua sobre el gel, el agua se añadió por los costados del gel) y se dio movimientos suaves en cada lavado para facilitar la decoloración.

Fraccionamiento de los péptidos antibacterianos del veneno de *Hadruidoidea* sp. mediante cromatografía de intercambio iónico C-25

Se preparó resina Sephadex C-25 a razón de 1 g por 10 mL de agua destilada, luego se empaquetó en una columna de 15.7 cm de largo x 0.9 mm de diámetro y se mantuvo durante 72 horas para lograr un buen empaquetamiento (hinchazón). Para equilibrar la columna, se añadió acetato de amonio 0.05 M (pH 6.4) a razón del doble de volumen de la columna empaquetada y se dejó fluir, este procedimiento se repitió dos veces. Luego a 360 µl del veneno de *Hadruidoidea* sp. se agregó 700 µl de buffer acetato de amonio 0,05M a pH 7, y los restos insolubles fueron eliminados por centrifugación a 10000 rpm durante 15 minutos. Se aplicó el sobrenadante (1000 µl de veneno) a una columna de CM-sephadex C-25 y las proteínas retenidas fueron eluidas con buffer conteniendo NaCl 0,25M y 0,6M en un volumen igual al volumen de la columna empaquetada. Se recogió fracciones de 1ml y la corrida se realizó a temperatura ambiente y a un flujo de 200 µl/minuto. Se realizó lectura de absorbancias de 35 fracciones a 280 nm y 260 nm (1ml para cada fracción)(Pérez-Delgado et al., 2019; Rivera et al., 2011)

Determinación de masa molecular de las fracciones peptídicas mediante análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS)

Las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico, se filtraron directamente a un vial ámbar con ayuda de jeringas y filtros jeringa de PVDE de 0,25 µm.

Para el análisis se utilizó un equipo UHPLC acoplado a un detector triple cuadrupolo Xevo TQ-XS (UHPLC-ESI-MS/MS). Se empleó una columna C18 ACQUITY UPLC

HSS T3 con dimensiones de 2,1 mm de diámetro y longitud de 150 mm a 40 °C, para la corrida cromatográfica se usaron agua al 0,1 % en AF fase A y ACN al 0,1 % en AF fase B. El flujo usado fue de 0,35 mL/min y la gradiente en fase A: 0-4 min de 90-85 %, 4-12 min de 85-75 %, 12-22 min de 75-65 %, 22-29 min de 65-45 %, 29-35 min de 45-90%, 35-40 min 90-90 %. Se usó la función Survey Scan con el escaneo en Scan Wave MS, el escaneo fue desde 50-2000 m/z. Los parámetros del detector de masas fueron 2,5 (kV) de voltaje del capilar, 40 V de voltaje de cono con un flujo de gas de 150 L/hr, temperatura de desolvatación 480 °C y la energía de colisión de 35 eV. Además, se realizó un barrido de 190-600 nm por el detector de PDA

Actividad antibacteriana de las fracciones peptídicas de escorpión *Hadruidoidea* sp. mediante el método de microdilución

Preparación del inóculo

Los inóculos bacterianos de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens* se prepararon a partir de cultivos jóvenes (18-24 horas) en agar nutritivo, esto según las directrices del Clinical and Laboratory Standards Institut (CLSI, 2015). Se seleccionaron de la placa de agar nutritivo de tres a cinco colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico. La parte superior de cada colonia se tocó y se transfirió a un tubo que contenía 4-5 ml de caldo de infusión de cerebro y corazón, luego se llevó a incubación a 35 °C hasta que se alcanzó una turbidez igual a 0,5 estándar de McFarland (normalmente 4-6 horas), dentro de los 15 minutos después de ajustar la turbidez del inóculo a 0,5 estándar de McFarland, se agregaron 0,5 ml de la suspensión a 9,5 ml de agua destilada estéril (dilución 1:20) para alcanzar una concentración final de 5 x 10⁶ UFC/ml(Pérez-Delgado et al., 2019).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria se realizó mediante la prueba de microdilución en caldo Müller -Hinton (CLSI, 2015) en microplacas de 96 pocillos, en los que se colocó 50 µL del cultivo bacteriano en caldo Müller Hinton y 50 µL de la fracción peptídica respectiva. Luego de 24 horas a 37 °C se determinó el crecimiento bacteriano por la turbidez desarrollada en cada pocillo. El efecto inhibitorio se determinó por un botón en crecimiento de ≥ 2mm o una turbidez definida(CLSI, 2015).

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utilizó como técnica de recolección de datos la observación estructurada de las variables evaluadas. Además, se utilizó como herramienta de recolección de datos una lista de cotejo que registró la ocurrencia de eventos y sus características durante el desarrollo del experimento. La lista de verificación fue completada por los responsables de la investigación.

Análisis de datos

Para comparar las diferencias en los promedios (o medias) entre las diferentes concentraciones del veneno

crudo se usó una fórmula estadística (el análisis de varianza-Anova) (Dawson, 2005).

3. Resultados

Determinación del peso molecular mediante PAGE-SDS del veneno puro

Mediante electroforesis (PAGE-SDS), se evidenció la presencia de un grupo proteico de bajo peso molecular, el mismo que se analizó mediante un gráfico de dispersión en Excel, el peso molecular fue 10,0 KDa (Figura 1).

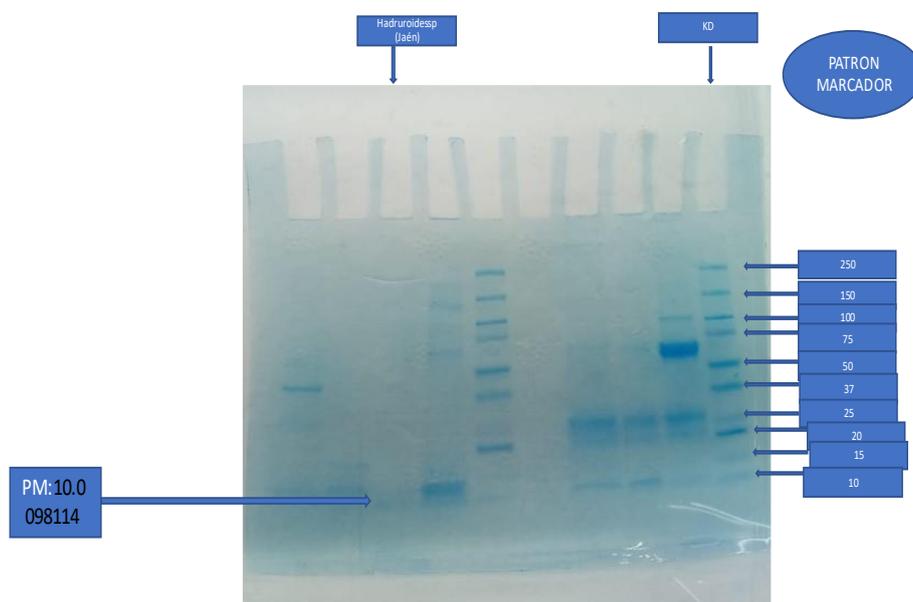


Figura 1. PAGE-SDS de proteínas de veneno de *Hadruroides sp.* En el carril 8 proteínas del veneno crudo; en carril 1 para las proteínas estándares (de derecha a izquierda).

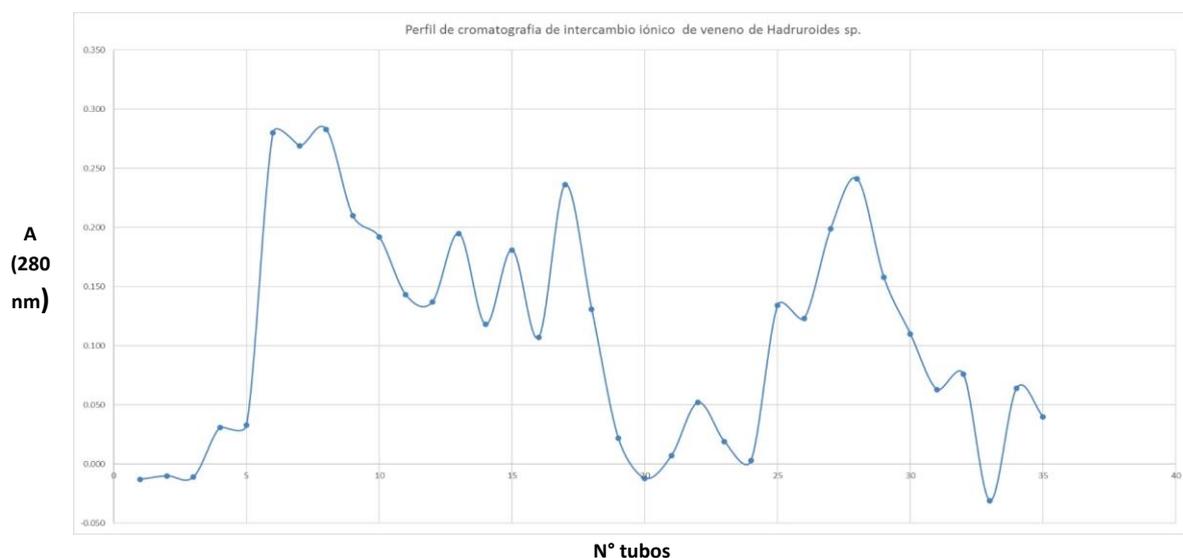


Figura 2. Perfil cromatográfico del veneno de *Hadruroides sp.* en CM-Sephadex C-25, se obtuvieron 5 picos (del I al V).

En relación a la cromatografía por intercambio iónico en Sephadex C-25, se obtuvieron 5 fracciones, denominándolas (F I al V) tal como se observa en la Figura 2.

El análisis por UHPLC-MS/MS de las fracciones obtenidas por extracción en fase sólida (cromatografía de intercambio iónico en Sephadex C-25), determino que

solo la fracción 3 presenta moléculas de la naturaleza péptida a los tR (tiempo de retención) de 2.509 y 3.041 min y al diferenciar las masas cargas se encuentra que hay una diferencia de peso molecular referentes a aminoácidos tales como glicina, acido glutámico, ácido aspártico, serina interleucina , metionina y alanina tal como se muestran en la figura 3 y figura 4.

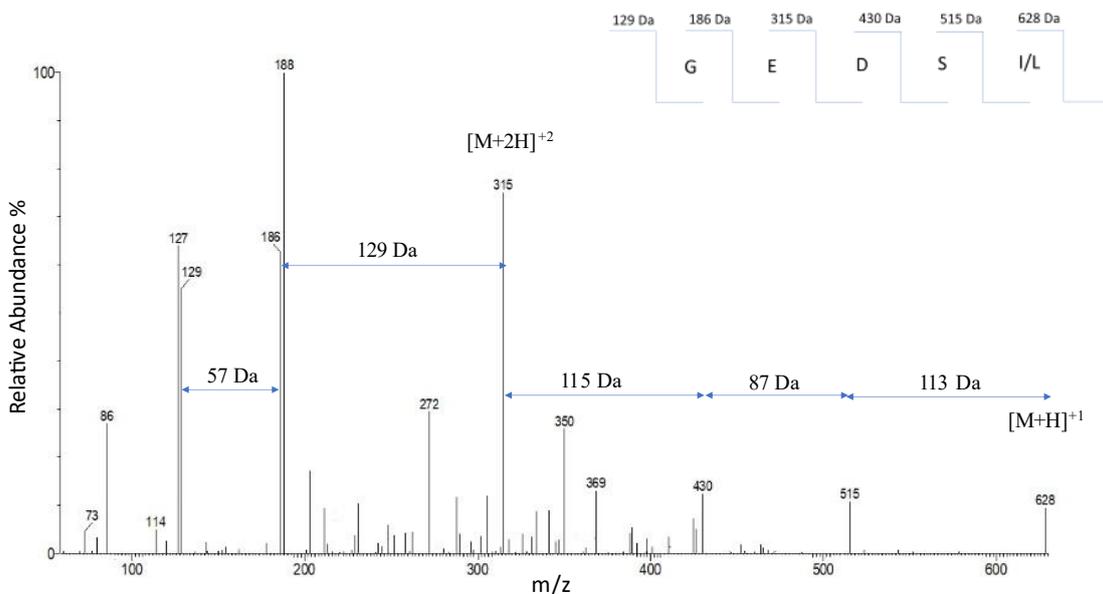


Figura 3. Espectro de masas de la fracción 3 del veneno de *Hadruroides sp.* al tiempo de retención(tR): 2.50

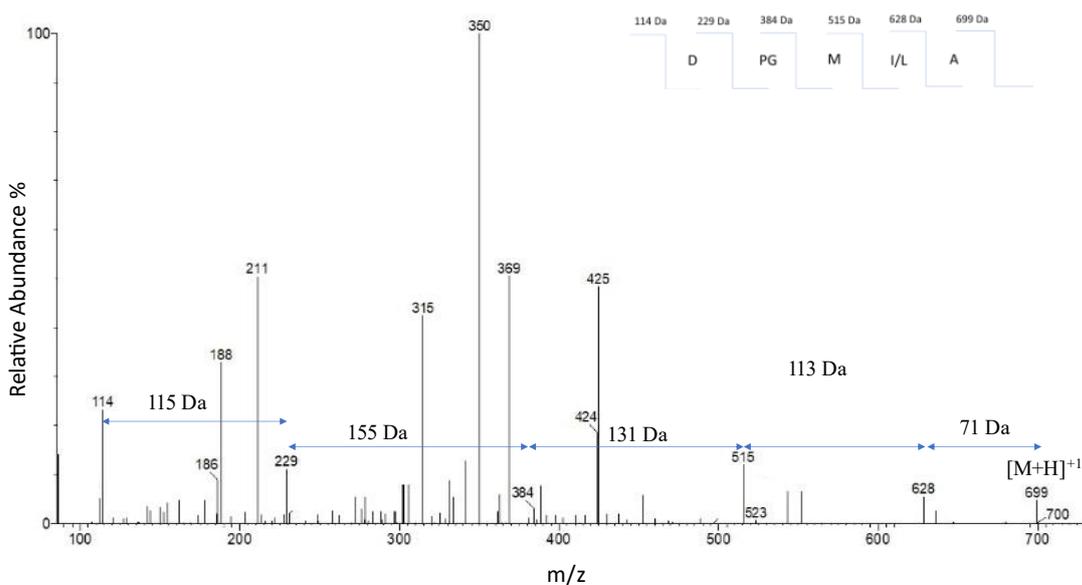


Figura 4. Espectro de masas de la fracción 3 del veneno de alacrán tR: 3.041.

Se evidencio inhibición del crecimiento de *Acinetobacter baumannii* (no turbidez) a la dilución uno de la fracción III y en el restante de diluciones se apreció turbidez (crecimiento bacteriano), tabla 1.

No se constata actividad inhibitoria de la fracción III sobre *K. pneumoniae* evidenciándose crecimiento(turbidez) Tabla 2.

S. marcescens no mostro sensibilidad frente a la fracción III de *Hadruides sp.*

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción III del veneno del escorpión *Hadruides sp.* frente a *Acinetobacter baumannii*

Fracción peptídica	Dilución	Concentración (mg/ml)	Expuestos	CMI A. baumannii
III	1	1.26	3	IC
	1/2	0.63	3	T
	1/4	0.315	3	T
	1/8	0.1575	3	T
	1/16	0.07875	3	T
	1/32	0.039375	3	T
	1/64	0.0196875	3	T
	1/128	0.00984375	3	T
	1/256	0.004921875	3	T

3 = tres pocillos expuestos, IC= Inhibición Completa, T=Turbidez

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción III del escorpión *Hadruides sp.* frente a *K. pneumoniae*

Fracción peptídica	Dilución	Concentración (mg/ml)	Expuestos	CMI <i>K. pneumoniae</i>
III	1	1.26	3	T
	1/2	0.63	3	T
	1/4	0.315	3	T
	1/8	0.1575	3	T
	1/16	0.07875	3	T
	1/32	0.039375	3	T
	1/64	0.0196875	3	T
	1/128	0.00984375	3	T
	1/256	0.004921875	3	T

3 = tres pocillos expuestos, IC= Inhibición Completa, T=Turbidez

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción III del escorpión *Hadruides sp.* frente a *S. marcescens*

Fracción peptídica	Dilución	Concentración (mg/ml)	Expuestos	CMI <i>S. marcescens</i>
III	1	1.26	3	T
	1/2	0.63	3	T
	1/4	0.315	3	T
	1/8	0.1575	3	T
	1/16	0.07875	3	T
	1/32	0.039375	3	T
	1/64	0.0196875	3	T
	1/128	0.00984375	3	T
	1/256	0.004921875	3	T

3 = tres pocillos expuestos, IC= Inhibición Completa, T=Turbidez

4. Discusión

La no ausencia de cepas de *K. pneumoniae* *betalactamasa de espectro extendido (BLEE)* con resistencia a los antibióticos, hace que el tratamiento de infecciones como la uretritis, cistitis y pielonefritis lleguen a ser complejas, por otro lado, cepas de *S. marcescens* involucradas en eventos epidémicos con niños frecuentemente han demostrado ser multirresistentes, así mismo *A. baumannii* ha demostrado un bajo nivel de sensibilidad a las carbapenemas y es responsable de infecciones del tracto respiratorio y de las ITU. Por tal razón es necesario la búsqueda nuevas alternativas terapéuticas, como los péptido antimicrobianos presentes en el veneno del escorpión (Bou, 2001; Cristina et al., 2019; Jiménez-Guerra et al., 2018).

En la presente investigación, en el análisis electroforético de las proteínas del veneno puro de *Hadruides sp*, se evidenció péptidos de 10.0 KDa, lo cual es similar de otros péptidos antimicrobianos derivados del veneno de otros escorpiones de diferente género que presentan péptidos de secuencia larga de aminoácidos con masas moleculares en un intervalo entre 6,9 KDa a 9,3 KDa tales como el péptido Scorpine 8,3 KDa de *P. imperator* (Conde et al., 2000), Heteroscorpine de 8293 Da de *Heterometrus laoticus* (Uawonggul et al., 2007), Opiscorpine-1, Opiscorpine-2, Opiscorpine-3 y Opiscorpine-4 de 84428 Da, 8367 Da, 8394 Da y 8408 Da respectivamente, las bactridinas 1 y 2 de 6916 Da y 7362 Da de *Tityus discrepans* (Díaz et al., 2009).

El fraccionamiento del veneno puro de *Hadruides sp* por cromatografía de intercambio iónico permitió evidenciar picos proteicos, los cuales fueron agrupados en fracciones, la primera fracción salió con el buffer inicial de corrida (acetato de amonio pH 6.4) y al aumentar progresivamente la concentración del eluyente (NaCl) se obtuvo 4 fracciones adicionales.

Sin embargo, mediante el análisis por UHPLC-MS/MS de las fracciones obtenidas por extracción en fase sólida (cromatografía de intercambio iónico sephadex C-25), determino que solo la fracción 3 presenta péptidos protonados a los tR (tiempo de retención) de 2.509 y 3.041 min como se muestran en la figura 3 y 4, con masas moleculares 628 Da y 699 Da pero difiere de otros

polipéptidos como el IsCT y IsCT2 de 1501,9 Da y 1,4 KDa de *Otus madagascariensis* (Dai et al., 2001) AamAP1 y AamAP2 de 1,8 KDa y 1,9 KDa de *Androctonus amoreuxi* (Almaaytah et al., 2018), el péptido HsAp de 3,2 KDa de *Heterometrus spinifer* (Nie et al., 2012), los péptidos StCT1 y StCT2 de 1,5 KDa *Scorpiops tibetanu* (Cao et al., 2012), las Pantininas de 1,4 KDa y 1,5 KDa de *Pandinus imperator* (Zeng et al., 2013), los péptidos TsAP-1 y TsAP-2 de 1,7 KDa del veneno *Tityus serrulatus* (X. Guo et al., 2013).

Así mismo, la fragmentación por disociación activa por colisión (DAC) permitió la elucidación orientativa de algunos aminoácidos del péptido de 628 Da, tales como glicina 57 Da, ácido glutámico 129 Da, ácido aspártico 115 Da, serina 87 Da, isoleucina o leucina 113 Da (Medzihradzsky & Chalkley, 2015). También del péptido de 699 Da, se registró las siguientes masa/carga: 115 Da, 155 Da, 131 Da, 113 Da y 71 Da, los que corresponderían a los siguientes aminoácidos ácido aspártico, prolina-glicina, metionina, interleucina/leucina, alanina, respectivamente.

Los aminoácidos previamente descritos y detectados en *Hadruides sp*, han sido reportados en péptidos con actividad antimicrobiana en otros escorpiones de la misma familia Vaejovidae, como vejovine VmCT1 y VmCT2 de *V. mexicanus* (Hernández-Aponte et al., 2011; Ramírez-Carreto et al., 2012). Este tipo de aminoácidos también es común en péptidos antimicrobianos que contienen cisteína como heteroscorpine y opiscorpine-1, opiscorpine-2, opiscorpine-3 y opiscorpine-4 y que presentan actividad inhibitoria sobre *K. pneumoniae* (Uawonggul et al., 2007; Zhu & Tytgat, 2004), en péptidos antimicrobianos de cadena sin cisteína como hadrurin que inhibe a *S. marcescens* (Torres-Larios et al., 2000) Mediante la técnica de microdilución se evidenció que hubo crecimiento (turbidez) para *K. pneumoniae* y *S. marcescens*, esto se debe a factores tanto de la cepa como del veneno y de sus concentraciones; así en el primer caso, las bacterias Grampositivas y Gramnegativas aisladas de ambientes intrahospitalarios presentan mecanismos de resistencia como el modificar los componentes de sus paredes celulares (variación de lipopolisacáridos y de ácidos teicoicos) para disminuir el

carácter aniónico de la membrana y promover la resistencia a los péptidos antimicrobianos, tal es el caso de *Salmonella sp. E. coli* y *Y. enterocolitica*; otro criterio es la producción de cápsula, la cual actúa como un escudo, no permitiendo las interacciones entre la superficie bacteriana y los péptidos anti-microbianos, tal es el caso de *K. pneumoniae*. Así mismo, algunas bacterias como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *S. marcescens* sintetizan proteasas específicas que participan en el secuestro y resistencia a varios péptidos antimicrobianos (Campos et al., 2004; L. Guo et al., 1998; Gutiérrez, 2003; Schmidtchen et al., 2001)

El otro factor que puede estar relacionado con la resistencia a los péptidos antimicrobianos es la existencia de enzimas proteolíticas que separan los péptidos presentes en el veneno soluble después de su ordeño, tal es el caso de Vejovina de *Vaejovis mexicanus* que después de la obtención no se evidencian los primeros ocho aminoácidos, originándose un péptido más corto y con actividad antimicrobiana disminuida (Hernández-Aponte et al., 2011).

La concentración de proteína en la fracción III fue 1,26 mg/mL la misma que se diluyó, por lo que se sugiere que el efecto antibacteriano sobre *K. pneumoniae* y *S. marcescens* también disminuirá conforme aumenta la dilución, en ese sentido algunos investigadores sugieren que se requiere diferentes concentraciones de veneno para inhibir a las bacterias, tal es así que en el caso del péptido pandina 1 se precisó de 20.8 μ M para reprimir el desarrollo de *P. aeruginosa* mientras que pandina 2 requirió de 38.2 μ M (Corzo et al., 2000), opistoporina 1 y 2 necesitaron concentraciones entre 1.6 a 50 μ M, parabutoporina requirió una concentración menor de 6.5 μ M (Moerman et al., 2002), hadrurina necesitó una concentración de 50 μ M (Torres et al., 2000), bactridina-1 de 77 μ M y bactridina-2 de 54 μ M (Díaz et al., 2009), vejovina 4,4 a 50 μ M (Hernández et al., 2011).

Por otro lado, los péptidos presentes en la fracción III de *Hadruroides sp.* si mostrarán efecto antibacteriano contra *A. baumannii* similares al péptido Vejovina reportado de *V. mexicanus*, que inhibió diferentes cepas de *A. baumannii* en concentraciones de 5 a 20 mM, esto se explica por las interacciones electrostáticas entre la carga catiónica del péptido con la parte negativa (lipopolisacáridos) de la membrana externa de bacterias, provocando perturbaciones

estructurales (formación de poros) que desestabilizan a las membrana celular y alteran la permeabilidad iónica de la membrana externa (Moerman et al., 2002). Además se cree que los péptidos interactúan con proteínas citosólicas y ribosomas, y a una posible adherencia al ADN ó ARN, similar a lo reportado por otros agentes antibacterianos (Hernández-Aponte et al., 2011)

El veneno de escorpión presenta un gran número de toxinas, proteínas celulares y péptidos de amplio y/o estrecho espectro contra los microorganismos, por lo que se le considera una alternativa para la erradicación de microorganismos resistentes y extremadamente resistentes a los antibióticos, antivirales, antipalúdicos. Además, pueden ser tóxicos para las células cancerosas, insectos y eritrocitos.

En esta zona de Jaén se encontraron especies del género *Theutraustes*, *Tityus*, *Opisthacanthus* y *Hadruroides*, por lo que se recomienda hacer uso de técnicas genéticas y/o moleculares para la identificación definitiva de estos especímenes, así como el uso de otro tipo de técnicas más sensibles como el análisis de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) para la caracterización y secuenciamiento parcial o total de péptidos generando una huella dactilar de la masa molecular de los componentes del veneno lo que permitiría diseñar péptidos más selectivos y específicos para combatir tumores, parásitos y virus. (Wang & Wang, 2016).

5. Conclusiones

A. baumannii baumannii ATCC19606 mostró sensibilidad frente a la fracción III de *Hadruroides sp* a una concentración de 1,16 mg/dl y no se evidenció actividad antibacteriana contra a *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. El veneno crudo de *Hadruroides sp.* evidenció 11 picos agrupados en cinco fracciones de proteínas usando Sephadex C-25.

La fracción peptídica F-III presentó moléculas de naturaleza catiónica con un rango de masa entre 628 a 699 Da.

5. Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Salud y al Dr. Carlos Delfin Chávez Olortegui por el permiso para participar en el

proyecto "Ciencia en Innovación Tecnológica en Toxinología: Fortalecimiento de Biotecnología para la producción y Control de calidad de los antivenenos terapéuticos producidos en el Perú".

Al Dr. Cesar Bonilla Ferreyra coordinador técnico del proyecto, por el apoyo logístico (materiales y reactivos).

6. Contribución de los autores

CARS: Realizó la concepción y diseño del estudio, búsqueda bibliográfica, recolección de los datos y participó en la elaboración del manuscrito.

RTL: Participó en búsqueda bibliográfica, análisis, interpretación de los datos obtenidos y la elaboración del manuscrito.

JIR: Participó en búsqueda bibliográfica, análisis, interpretación de los datos obtenidos y la elaboración del manuscrito.

7. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

8. Referencias Bibliográficas

- Almaaytah, A., Farajallah, A., Abualhajjaa, A., & Al-Balas, Q. (2018). A3, a Scorpion Venom Derived Peptide Analogue with Potent Antimicrobial and Potential Antibiofilm Activity against Clinical Isolates of Multi-Drug Resistant Gram Positive Bacteria. *Molecules*, 23(7), 1603. <https://doi.org/10.3390/molecules23071603>
- Antonio Ochoa, J., & Chaparro, J. C. (2008). Nueva especie de escorpión del género *Hadruroides* (Scorpiones: Caraboctoninae) de los valles interandinos de Perú. *Revista Peruana de Biología*, 15(1), 5-10.
- Bou, G. (2001). El alto nivel de resistencia a los carbapenemes en *Acinetobacter baumannii* es un problema multifactorial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19(7), 336-338. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(01\)72653-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(01)72653-5)
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompart, C. M., Albertí, S., & Bengoechea, J. A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, 72(12), 7107-7114. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004>
- CLSI. (2015). *Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a las antimicrobianas de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. M07-A10. 2015. M07-A10.*
- Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., & Possani, L. D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Letters*, 471(2-3), 165-168. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01384-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01384-3)
- Cristina, M. L., Sartini, M., & Spagnolo, A. M. (2019). *Serratia marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijerph16040610>
- Cupitra, N., Cubides, S., Saldarriaga, M., & Estrada, S. (2014). Distribution of *Centruroides edwardsii* CENTRUROIDES EDWARDSII (GERVAIS, 1843) in the Aantioquia Province, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 207-215. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.42832>
- Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., & Nakajima, T. (2001). IsCT, a Novel Cytotoxic Linear Peptide from Scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(4), 820-825. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5472>
- Díaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J. D., Sherman, N. E., & 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. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 54(6), 802-817. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.014>
- Estrada-Gómez, S., Vargas, L., Saldarriaga-Córdoba, M., & Quintana, J. (2016). Veneno de *Opisthacanthus elatus* escorpión de Colombia, podría ser más hemolítico y menos neurotóxico de lo que se pensaba. *Acta tropica*, 153, 70-78.
- Guo, L., Lim, K. B., Poduje, C. M., Daniel, M., Gunn, J. S., Hackett, M., & Miller, S. I. (1998). Lipid A Acylation and Bacterial Resistance against Vertebrate Antimicrobial Peptides. *Cell*, 95(2), 189-198. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81750-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81750-X)
- Guo, X., Ma, C., Du, Q., Wei, R., Wang, L., Zhou, M., Chen, T., & Shaw, C. (2013). Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie*, 95(9), 1784-1794. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.003>
- Gutiérrez, P. (2003). PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y APLICACIONES. *Actual Biol*, 12.
- Hernández-Aponte, C. A., Silva-Sanchez, J., Quintero-Hernández, V., Rodríguez-Romero, A., Balderas, C., Possani, L. D., & Gurrola, G. B. (2011). Vejevine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. *Toxicon*, 57(1), 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.008>
- Jiménez-Guerra, G., Heras-Cañas, V., Béjar Molina, L. del C., Sorlózano-Puerto, A., Navarro-Marí, J. M., & Gutiérrez-Fernández, J. (2018). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasa de espectro extendido en infecciones de vías urinarias: Evolución de la resistencia antibiótica y opciones terapéuticas. *Medicina Clínica*, 150(7), 262-265. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.07.023>
- Lamiyan, A. K., Dalal, R., & Kumar, N. R. (2020). Venom peptides in association with standard drugs: A novel strategy for combating antibiotic resistance – an overview. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 26(February), 1-15. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0001>
- Medzihradzsky, K. F., & Chalkley, R. J. (2015). Lessons in *de novo* peptide sequencing by tandem mass spectrometry: LESSONS IN *DE NOVO* PEPTIDE SEQUENCING. *Mass Spectrometry Reviews*, 34(1), 43-63. <https://doi.org/10.1002/mas.21406>
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Van Eldere, J., van der Walt, J., & Verdonck, F. (2002). Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa: Cytotoxic peptides in scorpion venom. *European Journal of Biochemistry*, 269(19), 4799-4810. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03177.x>
- Nie, Y., Zeng, X.-C., Yang, Y., Luo, F., Luo, X., Wu, S., Zhang, L., & Zhou, J. (2012). A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. *Peptides*, 38(2), 389-394. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.012>
- Osear, F. (1977). *Escorpiones y escorpionismo en el feru—Vi: Lista de especies y claves para identificar las familias y los géneros 1. 1-4.*
- Pérez-Delgado, O., Espinoza-Vergara, M. A., Castro-Vega, N. A., & Reyes-Montaño, E. A. (2019). Evaluación preliminar de actividad antibacteriana in vitro del veneno de escorpión *Hadruroides charcasus* (Karsch, 1879) contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. *Revista del Cuerpo Médico del HNAAA*, 12(1), 6-12. <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2019.121.477>
- Possani, L., Merino, E., Corona, M., & Becerril, B. (2002). Scorpion genes and peptides specific for potassium channels: Structure, function and evolution. *Perspectives in molecular toxinology*, 200.
- Prendini, L. (2011). Order Scorpiones. In: *Animal biodiversity: An outline of higherlevel classification and survey of taxonomic richness. Auckland: Magnolia Press*, 7, 115.
- Ramar Perumal, S., Bradley G, S., Octavio L, F., Sethi, G., & Lina HK, L. (2017).

- Venenos de animales como agentes antimicrobianos. *Farmacología Bioquímica*, 134(0), 127-138.
- Ramírez-Carreto, S., Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Corzo, G., Possani, L. D., Becerril, B., & Ortiz, E. (2012). Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. *Peptides*, 34(2), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.02.002>
- Requena, I., Pace, C. D., Torres, P., & Padrón, A. (2007). RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE BACTERIAS CAUSANTES DE INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO. 19(2), 10.
- Rivera, C., Flores, L., Pantigoso, C., & Escobar, E. (2011). Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de *Centruroides margaritatus*. *Revista Peruana de Biología*, 17(1), 129-132. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i1.61>
- Santibáñez-López, E., Francke, F., Ureta, C., & Possani, D. (2016). Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity. *Toxins*, 8.
- Schmidtchen, A., Frick, I.-M., & Björck, L. (2001). Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Molecular Microbiology*, 39(3), 708-713. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02251.x>
- Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., & Possani, L. D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*: Scorpion antimicrobial peptide. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 5023-5031. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x>
- Uawonggul, N., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Arkaravichien, T., Bunyatratchata, W., Ruangjirachuporn, W., Jearanaiprepame, P., Nakamura, T., Matsuda, M., Kobayashi, M., Hattori, S., & Daduang, S. (2007). Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon*, 49(1), 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.003>
- Wang, X., & Wang, G. (2016). Insights into Antimicrobial Peptides from Spiders and Scorpions. *Protein and Peptide Letters*, 23(8), 707-721. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160511151320>
- Zavaleta, A. (1983). El veneno del escorpión: Bioquímica y Farmacología. *Boletín de Lima*, 30, 75-88.
- Zeng, X.-C., Zhou, L., Shi, W., Luo, X., Zhang, L., Nie, Y., Wang, J., Wu, S., Cao, B., & Cao, H. (2013). Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. *Peptides*, 45, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.03.026>
- Zhu, S., & Tytgat, J. (2004). The scorpine family of defensins: Gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(14). <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4149-1>