Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Biología

Efectos biológicos del veneno de tres especies de escorpiones del género *Centruroides* (Scorpiones:Buthidae) sobre presas modelo

Tesis sometida a consideración de la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, para optar por el grado académico de

Licenciada en Biología con énfasis en Zoología

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2015

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Dr. Mahmood Sasa Marín _____
Director de Tesis

Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez _____
Integrante del comité de Asesor

Msc. Daniel Briceño Lobo _____
Integrante del comité de Asesor

Dr.Gilbert Barrantes Montero _____
Miembro extra del tribunal

Dr.Paul Hanson Snortum
Presidente del Tribunal _____

Jennifer Rivera Hidalgo
Postulante _____

DEDICATORIA

A mi Madre
Patricia
Tío
Luis Guillermo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor el Dr. Mahmood Sasa quien ha sido uno de mis principales formadores y gran amigo, durante mi formación académica. Agradezco sus consejos y sugerencias siempre certeros y su gran paciencia para conmigo. Agradezco sus aportes para con este proyecto, sin duda su guía y apoyo en este proyecto fue fundamental para que a buen puerto.

Este proyecto así mismo incluye el valioso aporte de muchos colegas y amigos quien me apoyó durante todo el proceso. Uno de ellos Fabián Bonilla a quien agradezco profundamente toda su ayuda. Así también agradezco a Erick Ballestero quien fue participe en la primera parte de la ejecución de este proyecto. Su compañía mi hizo más ameno la estadía en Santa Ana. Otros amigos como Tania Venegas quien fue mi compañía y apoyo durante extensas jornadas de experimentos. Agradezco a Davnia de la Universidad de Valencia, quien tomo varias de las fotos de los especímenes de las colecciones del vivario. A mi primo André quien me colaboró también con fotografías que contiene este trabajo.

Agradezco a los Investigadores del Instituto Clodomiro Picado Dra. Alexandra Rucavado y Dr. Bruno Lomonte por sus valiosos aportes en los experimentos y préstamo de equipo.

Así también es de resaltar la gran ayuda del Dr. José María Gutiérrez y Msc. Daniel Briceño en la corrección de este trabajo.

Agradezco a los colaboradores de la finca Experimental Santa Ana por su colaboración durante mi estadía en la finca.

Agradezco a Carolina Salas una gran amiga y colega por su gran apoyo durante todo el proceso de mi tesis. Su apoyo y cariño me ayudaron a salir a delante.

Agradezco a Leonardo por todo su apoyo incondicional durante este proceso de tesis.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS iv
INDICE GENERAL v
INDICES DE FIGURAS vii
INDICE DE CUADROS ix
Revisión de Literatura 1
Venenos de escorpiones y sus efectos sobre modelos de presas y depredadores 1
Objetivos del Estudio 7
Referencias 8
CAPITULO 1 11
Mantenimiento de animales 11
Plagas 12
Registro de datos 13
Aspecto ético 13
Especies mantenidas 13
Escorpiones (*Centruroides sp*) 13
Grillos (*Acheta domestica y A. assimilis*) 19
Cucarachas (*Periplaneta australasie y P. americana)* 29
Escarabajo de harina (*Tenebrio molitor*) 35
Moscas Carroñeras género *Peckia intermutans* (Sarcophagidae) 39
Conclusiones Generales 43
Rerefencias 44
CAPITULO 2 46
Efectos biológicos del veneno de tres especies de escorpiones del género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) sobre presas modelo
1. Introducción 47
2. Materiales y métodos 49
3. Resultados 52

4. Discusión.....61
5. Referencias.....65

CAPITULO 3.....70

Función de los pectenes en detección de presa en el escorpión *Centruroides margaritatus* (Scorpiones: Buthidae)

1. Introducción.....70
2. Materiales y Métodos.....72
3. Resultados.....75
4. Discusión.....76
5. Agradecimientos.....78
6. Referencias.....79

INDICES DE FIGURAS

CAPITULO1

Fig1. Especies de insectos de interés a mantener en colecciones en un vivario. *Acheta domesticus* (Fig.1A), *Acheta assimilis* (Fig.1B), *Periplaneta australasiae* (Fig.1C), *Peckia intermutans* (Fig.1D), *Tenebrio molitor* (Fig.1E)..... 12

Fig 2. Contenedores para alojamiento de los escorpiones. 15

Fig 3. Contenedor de alojamiento para escorpión con bebedero. 16

Fig 4. Dimorfismo sexual de *Centruroides edwarsii*. Derecha macho Izquierda hembra. 18

Fig 5. Hembra de *Centruroides edwarsii* con crías en el dorso. 18

Fig 6. Contenedor para reproducción para grillos..... 21

Fig7. Cámara de Incubación para grillos *Acheta domesticus* y *Acheta assilimis.*..... 22

Fig.8. Bebederos para aves empleados para grillos. Bebedero de 100 ml. Bebedero de 300 m 24

Fig 9. Hembra de *Acheta domesticus* séptimo instar con ovopositor desarrollado. 25

Fig10. Modelos de cama de ovoposición para grillos del genero *Acheta* 26

Fig11. Cría de *Acheta domesticus* sobre el sustrato con 1 día de eclosión 27

Fig12. Crías de grillos dentro de cartones de huevo usados como refugio..... 27

Fig 13. Procedimiento para inocular sustancias via intracelomica en *Acheta domesticus*..... 28

Fig 14. Dos especies de Genero *Periplaneta.* Izquierda *P. australasie.* Derecha *P. americana.* 29

Fig 15. Refugios de cucarachas en sus contenedores de mantenimiento. Izquierda ninfas de P.australasie. Derecha individuos adultos de *P. australasie.*..... 32

Fig 16. Ooteca de *Periplaneta australasie* adherida a cartón de huevo..... 34

Fig 17. *Tenebrio molitor*. Izquierda adulto. Derecha larva 35

Fig 18.Mantenimiento de escarabajos de la harina 36

Fig 19 *Peckia intermutans*. Derecha a izquierda larva pupa y adulto..... 42

CAPITULO 2

Fig 1. Capacidad de parálisis del veneno de *Centruroides edwarsii* sobre modelo presa. La parálisis se expresa como el porcentaje de individuos incapaces de desplazarse pero si muestran movimientos de apéndices al estímulo mecánico. Los rombos grises, cuadros blancos y triángulos negros representan la parálisis luego de 3, 6, y 12 horas posteriores a la inoculación del veneno respectivamente. 54

Fig 2. Capacidad de parálisis del veneno de *Centruroides bicolor* sobre modelo presa. La parálisis se expresa como el porcentaje de individuos incapaces de desplazarse pero si muestran movimientos de apéndices al estimulo mecánico. Los rombos grises, cuadros blancos y triángulos negros representan la parálisis luego de 3, 6, y 12 horas posteriores a la inoculación del veneno respectivamente. Las figuras (A-E) representan cinco especies de modelos presa invertebrados y un vertebrado (F).....56

Fig 3. Capacidad de parálisis del veneno de *Centruroides limbatus* sobre modelo presa. La parálisis se expresa como el porcentaje de individuos incapaces de desplazarse pero si muestran movimientos de apéndices al estimulo mecánico. Los rombos grises, cuadros blancos y triángulos negros representan la parálisis luego de 3, 6, y 12 horas posteriores a la inoculación del veneno respectivamente. Las figuras (A-E) representan cinco especies de modelos presa invertebrados.....57

CAPITULO 3

Fig. 1. Morfología del pecten. a). Pectenes del escorpión localizados en la superficie medio ventral del mesosoma (*C. margaritatus)*.b) Diagrama de amputación. La flecha indica la dirección de corte. mgl (lamella marginal), gp (papilas genitales), pgf (Pliegue posgenital) (Modificada de Polis & Sissom 1990).....73

Fig. 2. Arena experimental donde se realizan las pruebas comportamiento. La letra Z corresponde a las zonas de división del terrario, cada zona mide 5cm de ancho. 74

INDICE DE CUADROS

CAPITULO 2

Cuadro 1. Sintomatología mostrados por los diferentes modelos de presa durante los periodos de observación (3, 6,12h) post inyección de determinadas dosis del veneno de tres especies de Escorpión del género *Centruroides*.....52

Cuadro 2. Valor de Toxicidad (DL50, expresado en µg/g) del veneno de tres especies de escorpiones costarricenses del genero *Centruroides.* Los datos entre paréntesis corresponden a los límites de confianza al 95%. 58

Cuadro 3. Razón dosis letal (RDL) cincuenta / noventa y cinco de *Centruroides edwarsii* sobre cinco especies de invertebrados (Insectos) y un vertebrado (reptil). Los números entre paréntesis representan el intervalo de confianza al 95% de la razón de las dosis letales. 59

Cuadro 4. Razón dosis letal cincuenta / noventa y cinco (RDL) de *Centruroides bicolor* sobre cinco especies de invertebrados (Insectos) y un vertebrado (reptil). Los números entre paréntesis representan el intervalo de confianza al 95% de la razón de las dosis letales 60

Cuadro 5. Razón de dosis letal cincuenta / noventa y cinco (RDL) de *Centruroides limbatus* sobre cinco especies de invertebrados (Insectos) y un vertebrado (reptil). Los números entre paréntesis representan el intervalo de confianza de la razón de las dosis letales a un 95% de confianza. 61

CAPITULO 3

Cuadro 1. Descripción de los comportamientos observados en hembras *C. margaritatus* 74

Cuadro 2. Cuantificación de etograma de *C. margaritatus* en los grupos tratamiento y grupo control 76

Revisión de Literatura

Venenos de escorpiones y sus efectos sobre modelos de presas y depredadores

Introducción. El estudio de toxinas de origen animal y sus efectos es un apasionante campo de investigación que ha generado considerable información teórica sobre la estructura, composición y función de sustancias toxicas o venenos, así como sobre su cinética y modo de acción. Dentro de ese campo se analiza además el funcionamiento del aparato inoculador del veneno, así como el papel ecológico del veneno y sus componentes (Beccaloni y Brannan 2009). Importantes aplicaciones para la salud humana y animal se han derivado del estudio de toxinas. Sus efectos en organismos diana ha permitido además la elaboración de herramientas moleculares para el estudio de variados mecanismos fisiológicos y moleculares. Por ejemplo, la observación de las capacidades anticoagulantes de venenos de serpientes ha permitido el desarrollo de fármacos que permiten la destrucción de trombos y coágulos (Kini 2011). Los venenos de las serpientes, así mismo contienen péptidos con propiedades hemorrágicas, que son utilizados como antifibrinolíticos e inhibidores de serinas proteasas (Gutiérrez 2002) los cuales pueden usarse como anticoagulante para uso en cirugías a corazón abierto. Los Conopeptidos aislados del veneno de caracoles del género *Conus* son empleados en el tratamiento de la epilepsias y como agentes terapéuticos en desordenes neuromusculares y psiquiátricos (Tiffany et *al*. 2008).

En el caso de venenos de escorpiones y otros arácnidos, a las aplicaciones médicas pueden sumarse otras aplicaciones encaminadas al control de plagas, pues algunas de las toxinas que componen sus venenos actúan sobre el sistema nervioso de insectos presa, bloqueando el impulso nervioso y permitiendo la parálisis de insectos perjudiciales. Mazzoli-Palma et *al.* 2003 sostienen que los venenos de escorpiones y arañas son potenciales aliados en el control de insectos plaga, control que a la fecha ha sido efectuado primariamente con químicos peligrosos para la salud y el ambiente. Según estos autores, el principal problema con el uso de esos insecticidas químicos es que estos no son selectivos y por lo tanto, afectan tanto a especies consideradas como nocivas como a aquellos insectos benéficos (De Lima et *al*. 2007), además de que su uso indiscriminado ha contribuido con el desarrollo de resistencias. Por esta razón, la búsqueda de nuevas y más seguras maneras

de controlar plagas a partir de agentes naturales anti-insecto, como los que se encuentran en venenos de estos artrópodos, constituye una atractiva línea de investigación actual (Schwartz *et* al 2012).

Escorpiones como depredadores. Los escorpiones son un grupo de artrópodos quelicerados originados en el Silúrico hace aproximadamente 400 millones de años, que radiaron principalmente en regiones tropicales o subtropicales. A pesar de su antigüedad como grupo, la morfología de escorpiones se ha mantenido muy conservada durante su evolución, lo que sugiere que su diseño anatómico y posiblemente sus hábitos de vida han sido tremendamente exitosos en el tiempo. Unas 1270 especies son conocidas actualmente, agrupadas en159 géneros de 13 diferentes familias (Fet et *al.* 2000).

Todos los escorpiones actuales son venenosos y disponen de un eficiente mecanismo de inyección que incluye una sección distal del abdomen alargada y de gran movilidad, el metasoma, en cuyo último segmento (telsón) se sitúan las glándulas secretoras de toxinas y un agudo aguijón que permite el inóculo. Cada glándula se encuentra invertida medial y dorsalmente con músculos compresores que presionan las glándulas contra la cutícula a lo largo de la superficie lateral y ventral, exteriormente (Polis 1990). Las glándulas están separadas por un tabique medial muscular vertical. Cada glándula está provista de un ducto de salida que comunica al exterior por dos diminutas y estrechas aberturas justo antes de la punta del acúleo (Polis 1990). En el caso de escorpiones de la familia Buthidae, el metasoma se encuentra más desarrollado para atacar y e intentar inocular veneno a la presa. El metasoma tiene cinco segmentos, cada uno es más largo que el anterior, el segmento número cinco siempre es el más largo. La presencia de dos pares de fibras musculares inervadas en el metasoma permite el movimiento hacia atrás y adelante del telson para insertar el aguijón en la presa o en un potencial depredador. En gran medida, se asume que el éxito evolutivo de escorpiones está relacionado con el desarrollo de ese mecanismo de envenenamiento.

Veneno y sus efectos en diferentes presas. Los venenos de escorpiones son complejas mezclas de toxinas de bajo peso molecular donde prevalecen componentes neurotóxicos, aunque otros elementos también están presentes. Se incluyen compuestos inorgánicos como agua, sales minerales (Na^+ y K^+); además de compuestos orgánicos tales como carbohidratos (muco-polisacaridos), lípidos, proteínas, enzimas (hialuronidasa,

fosfolipasas), neurotransmisores (serotonia, histamina) así como inhibidores de proteasas.

En varias especies de escorpiones (como por ejemplo *Parabuthus transvaalicuns*) se ha observado una interesante estrategia de utilización del veneno: primero se produce una pequeña secreción transparente que es llamada preveneno para posteriormente secretar el veneno que consiste en una mezcla lechosa u opaca más densa (Nizani et *al.* 2012). El preveneno está compuesto principalmente de sales (usualmente de potasio) y varios péptidos que bloquean los canales de potasio y producen dolor y toxicidad debido a la despolarización masiva y sostenida de la membrana celular. Además incluye proteínas de cerca de 25kDa de peso. El veneno incluye los mismos componentes pero en diferente proporción, especialmente una gran diversidad de péptidos. La toxicidad del preveneno es alta, aunque por volumen inyectado, es menor que la del veneno. Ambos producen flacidez e inmovilidad en larvas de lepidóptero y díptero, aunque en ratones el preveneno produce inicialmente dolor e hiperactividad mientras que el veneno aquinesia y convulsiones. Inceoglu et *al*. (2003) y Nizani et *al.* 2012 proponen que el preveneno es un mecanismo efectivo para detener posibles depredadores y subyugar o inmovilizar presas, al tiempo que se conserva veneno que es metabólicamente más costoso.

Se sabe que algunos de los componentes de los venenos actúan de forma específica en insectos (Zlotkin et *al.* 1971), otros afectan mamíferos (Miranda et al. 1970), e incluso hay otros que afectan ambos grupos (Inceoglu et al. 2001). Las principales diferencias entre las toxinas que afectan a uno u otro grupo estriba en la activación o inactivación de los receptores en las membranas plasmáticas axonales. Los receptores pueden poseer un único sitio de unión para una toxina en particular o más de un sitio de unión para esa misma toxina. Los componentes tóxicos que afectan a insectos se distinguen en porque causan dos tipos de efectos: excitatorios causan una repetitiva actividad de los nervios motores; efectos depresores propician flacidez y parálisis progresiva, por lo que se inhiben los potenciales de acción (Abdel-Rahman et *al*. 2010). En el caso de las toxinas de escorpión que afectan los mamíferos se caracterizan por unirse a los receptores en los canales de sodio de dos formas: bloquean la inactivación de los canales en nervios y músculos, o activan los canales de sodio, lo cual propicia que estos permanezcan abiertos más tiempo y de esta manera se prolongan los potenciales de acción en músculos y nervios. Solo unas pocas especies de escorpiones actuales son capaces de consumir roedores y otros

mamíferos pequeños, en particular especies de gran envergadura como *Pandinus imperator*. En especies de tamaños moderados o pequeños, como los conocidos "escorpiones de corteza" (*Centruroides sp),* posiblemente las toxinas que afectan estos vertebrados tengan una función más bien defensiva.

Escorpionismo como problema en salud. Son precisamente aquellas toxinas que afectan a mamíferos los que hacen que algunas especies de escorpiones sean tan nocivos para los humanos: el escorpionismo o envenenamiento por escorpiones resulta del encuentro accidental. Se estima que el número de picaduras a causa de escorpión asciende los 1.2 millones por año a nivel mundial, lo que resulta en más de 3 200 muertes (Andreotti y Sabatier 2013). En México, Calderón-Aranda (1993) reportó 200 000 casos de picaduras por escorpión con una tasa de mortalidad de 700 a 800 personas por año. En Túnez, datos epidemiológicos colectados desde 1986-1996 revelan que 30 000 a 45 000 personas son anualmente picadas por escorpiones. El número de muertes varía de 35 a 105 por año. Altinkaynak et *al.* (2002) reportó en su estudio una incidencia del 29.2 % de picaduras por escorpiones en niños en el sur-oeste de Irán.

Actualmente, se reconoce que el orden Scorpionida a escala mundial contienen 13 familias, de las cuales en América se registran 10 de ellas con 61 géneros y 740 especies descritas hasta el año 1998. Según Fet et *al.* 2000 actualmente la mayoría de los escorpiones se distribuyen en trece familias, Bothriuridae (Simon, 1880), Buthidae (C. L. Koch, 1837), Caraboctonidae (Kraepelin, 1905) Chactidae (Pocock, 1893), Chaerilidae (Pocock, 1893), Euscorpiidae (Laurie, 1896), Hemiscorpiidae (Pocock,1893), Iuridae (Thorell, 1876), Microcharmidae Lourenço,1996), Pseudochactidae (Gromov, 1998), Scorpionidae (Latreille, 1802), Superstitioniidae (Stahnke, 1940), Vaejovidae (Thorell, 1876). Las especies más tóxicas conocidas se encuentran clasificadas en la familia Buthidae.

Evolución de venenos. Al tratarse de un grupo tan antiguo, no es sorprendente que los distintos linajes de escorpiones presenten diferencias marcadas en los componentes de sus venenos, así como de las actividades biológicas asociadas a los mismos. La interpretación general es que la diversidad de toxinas es mantenida evolutivamente y refleja los efectos que distintos ambientes ejercen, a través de selección natural, sobre las especies de escorpiones.

Autores como Brodie y Brodie (1990) sugieren que la evolución de la toxicidad de venenos en general ocurre en paralelo: los depredadores que se alimentan de presas venenosas o difíciles de doblegar deben adquirir un arsenal bioquímico que les permita acceder sus presas. Las presas a su vez son evolutivamente forzadas, mediante selección natural, a adquirir mejores mecanismos de protección, incluyendo resistencia a toxicidad. Como consecuencia, presas y depredadores coevolucionan. Si incrementa la adaptación de una de las especies, la evolución conduce la adaptación de la otra especie.

Así, a pesar que todos los escorpiones son depredadores, la disponibilidad y tipo de presas y así como de propios depredadores o enemigos varía entre las distintas especies, y esto a su vez podría mediar en selección de las toxinas que se expresan en sus venenos. Por ejemplo, la toxicidad del veneno del escorpión *Centruroides exilicauda* de Arizona en roedores parece depender de si las especies interactúan en simpatría o no: roedores como *Onychomys torridus* y *O. arenícola,* simpátricas al escorpión, son más resistentes a su veneno que especies alopátricas como *O. leucogaster* y *Mus musculus*, que exhiben susceptibilidad varios ordenes de magnitud mayor al mismo. A nivel intraespecífico, el mismo patrón emerge: poblaciones de *O. torridus* alopátricas a los escorpiones son menos resistentes que aquellas en simpatría (Rowe y Rowe 2008). Otro caso que ayuda a clarificar aún más estas relaciones de selección de toxinas a presas según su biogeográfica se evidencia en las relaciones entre especies de lagartijas y escorpiones en zonas desérticas. Castilla et *al*. 2015 argumentan la existencia de depredación cruzada entre especies de lagartijas y escorpiones (*Podarcis atrata, Buthus occitanus).* Lacertidos del mismo género pero de distintas especies difieren en sus niveles de resistencia a los venenos de escorpiones dependiendo de si cohabitan o no en simpatría. Por lo tanto, evaluar los efectos de venenos de escorpiones en los distintos grupos taxonómicos que constituyen sus presas o que son potenciales depredadores puede arrojar luz sobre los escenarios en los que distintos venenos han evolucionado. Así mismo esto podría ayudar en la determinación e identificación de toxinas anti-insecto que podrían emplearse en el control de plagas.

Evaluación de Toxicidad En la literatura se reportan distintos mecanismos para evaluar los efectos del veneno, tanto *in vivo* como *in vitro*. La prueba de letalidad, en particular la lectura de letalidad media, es uno de los "caballos de batalla" de estudios toxinológicos, y el método preferido de evaluar toxicidad en veneno de escorpiones, así

como un paso obligado para estudios de potencia de antivenenos y en la escogencia de extractos de veneno adecuados para la producción de antivenenos (WHO 1981). La dosis media letal (DL_{50}) es definida por la Organización Mundial para la Salud como la cantidad mínima de droga, fármaco o toxina (veneno) que causa la muerte en 50% de los sujetos experimentales. Esta prueba consiste en administrar diferentes dosis graduadas de sustancia química, por una vía específica a varios grupos de animales experimentales y monitorear signos visibles de toxicidad como aumento o disminución de la actividad neuromuscular y motora. Al final se cuantifica la cantidad de animales sobrevivientes en cada dosis, luego de un periodo determinado, usualmente 24 o 48 horas (Akhila et *al*. 2007).

La dosis letal media es comúnmente reportada de forma distinta dependiendo del estudio. Por ejemplo, Ismail 1993 indica que las estimaciones de DL50 para *L. quinquestriatus* muestran valores entre 0.23 y 6.5 mg/kg de hasta, lo que representa una letalidad 28 veces mayor en los estimados más altos. Esta situación podría deberse al efecto de muchos factores extrínsicos: método de obtención del veneno, localidad geográfica, especie o cepa de animal experimental empleado y la ruta de inoculación. Además, los ensayos in vivo de toxicidad toman tiempo y en el caso de emplearse roedores- requieren de mucho veneno y muchos animales experimentales. Otra importante limitante es que el resultado final de pruebas de toxicidad se mide en la afectación (mortalidad o efecto) del animal experimental y por lo tanto está sujeto a consideraciones de orden ético y legal. Krifi et *al.* (1998) realizaron pruebas para determinar los efectos del procedimiento de extracción de veneno de serpientes y escorpiones, vía de administración, efecto de tamaño peso, sexo, y cepa de roedor empleado como diana. Los resultados de este estudio permitieron dilucidar que toxinas del veneno extraído manualmente fue de dos a cuatro veces más toxico que cuando se colecto eléctricamente. Sin embargo, un resultado contrario fue reportado recientemente por Oukkache et *al.* (2013), quienes favorecen la electroestimulación para obtener venenos a emplear en estudios toxinológicos.

Otra manera de evaluar toxicidad es mediante el estudio de los efectos producidos a distintas dosis. En ese sentido, comúnmente se estudia citotoxicidad con líneas celulares tumorales, ensayos de neurotoxicidad con sinaptosomas empelando pruebas con voltaje controlado en ensayos *in vitro*, efectos sobre actividades enzimáticas: proteolítica,

fosfolipasa, lactato deshidrogenasa, creatina quinasa (Rodríguez de la vega et al. 2010). En este sentido es importante recalcar que si bien estos ensayos permiten medir de forma cualitativa y cuantitativa los efectos de las sustancias toxicas, es solo un complemento de los ensayos *in vivo* donde se miden los efectos de forma integral en el animal completo.

El efecto de veneno de algunas especies de escorpión se han evaluado principalmente en modelos murinos (ratones de laboratorio), por lo que la mayoría de la información sobre reacciones y toxicidad en vertebrados son extrapolados de ellos. En menor grado hay alguna información disponible sobre efectos en otros vertebrados: pollos *Gallus gallus*, ratas *Rattus norvergicus* y conejos de indias. En invertebrados, los estudios de toxicidad son escasos, enfocados en unas pocas especies: larvas de las moscas *Sarcophaga argyrostoma* (De Lima et al. 1986, 1989), *Musca domestica* (Kopeyan et al. 1993), adultos de la cucaracha germánica *Blatella germánica*, (Gordon et al. 1996, Borchani et al. 1997), larvas de lepidóptero *Spodoptera litura* (Corzo et al. 2000, Ali et al. 2001). El limitado número de especies artrópodos empleadas en este tipo de análisis posiblemente resulte de la baja disponibilidad de especies en los números y condiciones necesarias para realizar ensayos biológicos.

Objetivos del Estudio

El propósito del presente trabajo es comparar el veneno de especies de escorpión en una serie de animales diana que modelan presas y/o depredadores. Para ello, tuvimos primero que implementar una colección de escorpiones y de potenciales modelos presa. La tesis por lo tanto está conformada por tres capítulos. El primero de ellos resume la experiencia tejida en el establecimiento de una colección de artrópodos que fueron empleados en los estudios descritos en capítulos posteriores. Este primer capítulo pretende servir como protocolo de mantenimiento de invertebrados experimentales.

El segundo capítulo subraya la variación en la letalidad y capacidad paralítica de venenos de tres especies de escorpiones del género *Centruroides* filogenéticamente relacionados. El trabajo muestra que pese a su proximidad, las tres especies muestran importantes diferencias en toxicidad y capacidad de parálisis en distintas especies diana.

Finalmente, el capítulo 3 describe los resultados de un experimento diseñado para determinar el papel de los pectenes de escorpión en la identificación de presas a partir de cambios en vibraciones del medio. Para este trabajo se compararon las habilidades de

detección de presa en individuos con pectenes alterados versus individuos con pectenes no alterados. La modificación de apéndices sugiere un efecto cualitativo en la capacidad de individuos a localizar presas, lo que sugiere que otros receptores posiblemente jueguen un papel más importante en la percepción de vibraciones.

Referencias

Abdel-Rahman, M. A. M. A. A. Omran, I. M. Abdel-Nabi, O. A. Nassier, B. J. Schemerhorn. 2010. Neurotoxic and cytotoxic effects of venom from different populations of the Egyptian *Scorpio maurus palmatus*. Toxicon 55: 298–306.

Akhila, J. S, S, Deepa and M. C. Alwar. 2007. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. Current science. 93:7. 917-920.

Andreotti, N. and J.M. Sabatier. 2013. The Deciphered Genome of *Mesobuthus martensii* Uncovers the Resistance Mysteries of Scorpion to Its Own Venom and Toxins at the Ion Channel Level Toxins 5: 2209-2211.

Ali, S.A, S, Stoeva, J.G., Grossmann, A. Abbasi, W. Voelter. 2001.Purification, characterization and primary structure of four depressant insect-selective neurotoxin analogs from scorpion (*Buthus sindicus*) venom. Arch. Biochem. Biophys. 15: 197–206.

Altinkaynak, S.,V.Ertekin and H. Alp. 2002. Scorpion envenomation in children. Turk Arch. Ped 37:48-54.

Beccaloni, J. and T. Brannan. 2009. Arachnids. University of California Press. 320p

Borchani,L.,P.Mansuelle.M.Stankiewcz.F.F.Grolleau. S. Cestele. H. Karoui. B. Lapied, H. Rochat. M. Pelhate and M. El Ayeb. 1997. A new scorpion venom toxin paralytic to insects that affects Na+ channel activation Purification, structure, antigenicity and mode of action. Eur. J. Biochem. 241: 525-532.

Brodie, E, D., III and E.D Brodie, JR.1990. Tetradotoxin resistance in garter snakes: An evolutionary response of predators to dangerous prey. Evolution 44:651-659.

Castilla. A.M., R.B. Huey, J.J. Calvete, R. Richer, A.H.M. Al-Hemaidi. 2015. Arid environments: Opportunities for studying co-evolutionary patterns of scorpion venoms in predator prey systems. Journal of Arid Environments 112:165-169.

Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C.P., Nakajima, T., 2000. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of deltapalu toxins IT,

novel insecticidal toxins from the spider Paracoelotes luctuosus (Amaurobiidae). Eur. J. Biochem. 267: 5783–5795.

De Lima, M.E., M.F. Martin, C.R. Diniz, H. Rochat. 1986. *Tityus serrulatus* toxin VII bears pharmacological properties of both beta-toxin and insect toxin from scorpion venoms. Biochem. Biophys. Res. Commun. 139: 296–302.

De Lima, M.E., M.F. Martin-Eauclaire, B.Hue, E. Loret, C.R . Diniz., H, Rochat, 1989. On the binding of two scorpion toxins to the central nervous systemof the cockroach *Periplaneta americana*. Insect Biochem. 19: 413–422.

De Lima, M.E. S.G. Figueiredo, A.M.C. Pimenta, D.M. Santos, M.H. Borges, M.N. Cordeiro, M. Richardson, L.C. Oliveira, M. Stankiewicz, and M. Pelhate. 2007. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 146: 264–279.

Fet, V. and G. Lowe. 2000. Family Buthidae. Pp. 54- 286 in: Fet, V., W. D. Sissom, G. Lowe and M. E. Braunwalder. Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998). 690 pp. New York: New York Entomological Society.

Gordon, D., Martin-Eauclaire, M.F., Cestele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Ben Khalifa, R., Pelhate, M., Rochat, H., 1996. Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brainand insect sodium channels. J. Biol. Chem. 271: 8034–8045.

Gutiérrez, J.M. 2002.Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. Revista de Biología.502.

Inceoglu, B.J. Lango, J. Wu, P. Hawkins, J. Southern, and B.D Hammock. 2001. Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae). Eur. J. Biochem. 268: 5407–5413.

Inceoglu, B., J.Lango., J Jing., L. Chen, F. Doymaz, I.N. Pessah., and B.D.Hammock. 2003. One scorpion, two venoms: prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100: 922–927.

Ismail, M. 1993. Serotherapy of the scorpion envenoming syndrome is irrationally convicted without trial. Toxicon 31: 1077-1083.

Instituto Clodomiro Picado 2008. Determinación de Actividades Tóxicas de Venenos de Serpientes y su Neutralización por Antivenenos. Manual de Métodos de Laboratorio. Instituto Clodomiro Picado. San José, Costa Rica.

Kini, R.M. 2011. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 9: 195–208.

Kopeyan, C., Mansuelle, P., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H., Miranda, F., 1993. Characterization of toxin III of the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*: a new type of alpha-toxin highly toxic both to mammals and insects. Nat. Toxins 1: 308–312.

Krifi, M.N.,N. Marrakchi., M. El Ayeb., and K. Dellagi. 1998. Effect of some variables on the in vivo determination of scorpion and viper venom toxicities. Biologicals. 26: 277–288.

Manzoli-Palma, M. F., N. Gobbi., M. S. Palma.2003. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 9: 1-8.

Miranda, F., C., Kupeyan, H, Rochat, C. Rochat, S. Lissitzky. 1970. Purification of animal neurotoxins. Eur. J. Biochem. 16:14–523.

Nisani, Z. D.S. Boskovic, S. G. Dunbar, W. Kelln, and W. K. Hayes. 2012. Investigating the chemical profile of regenerated scorpion (*Parabuthus transvaalicus*) venom in relation to metabolic cost and toxicity. Toxicon 60: 315–323.

Oukkache, F. C, M. Lalaoui, A .C. Alagón. and N. Ghalim. 2013. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco Naoual. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 9:1-5.

Polis, G.A. y W.D. Sissom. 1990. Life history. p. 161-223. In G.A. Polis (Ed.) The biology of scorpions, Stanford University Press, Stanford, California

Rodríguez de la Vega, R. C. E.F. Schwartz, L. D. Possani. 2010. Mining on scorpion venom biodiversity. Toxicon 56:1155–1161.

Rowe, H. and M. Rowe. 2008. Physiological resistance of grasshopper mice (Onychomys spp.) to Arizona bark scorpion (*Centruroides exilicauda*) venom Ashlee. Toxicon. 52: 597–605.

Schwartz, E.F., Moreira, K.G. Camargos. T.S. Mortari M.R.2012. Arthropod venoms: a vast arsenal of insecticidal neuropeptides. Biopolymers. 98:385-40.

Tiffany, H.S.; T. Russell; O, Baldomero; B. Grzegorz. 2008. Conus Venoms - A Rich Source of Peptide-Based Therapeutics. Current Pharmaceutical Design 18:.2462-2479.

Zlotkin, E., G. Fraenkel, F. Miranda, and S. Lissitsky. 1971a. the effect of scorpion venom on blowfly larvae. A new method for the evaluation of scorpion venoms potency. Toxicon. 9: 1-8.

Zlotkin, E., F Miranda., C. Kopeyan,., S. Lissitzky.1971b. A new toxic protein in the venom of the scorpion Androctonus australis Hector. Toxicon 9: 9–13.

CAPITULO 1

Mantenimiento de una colección de invertebrados con fines científicos

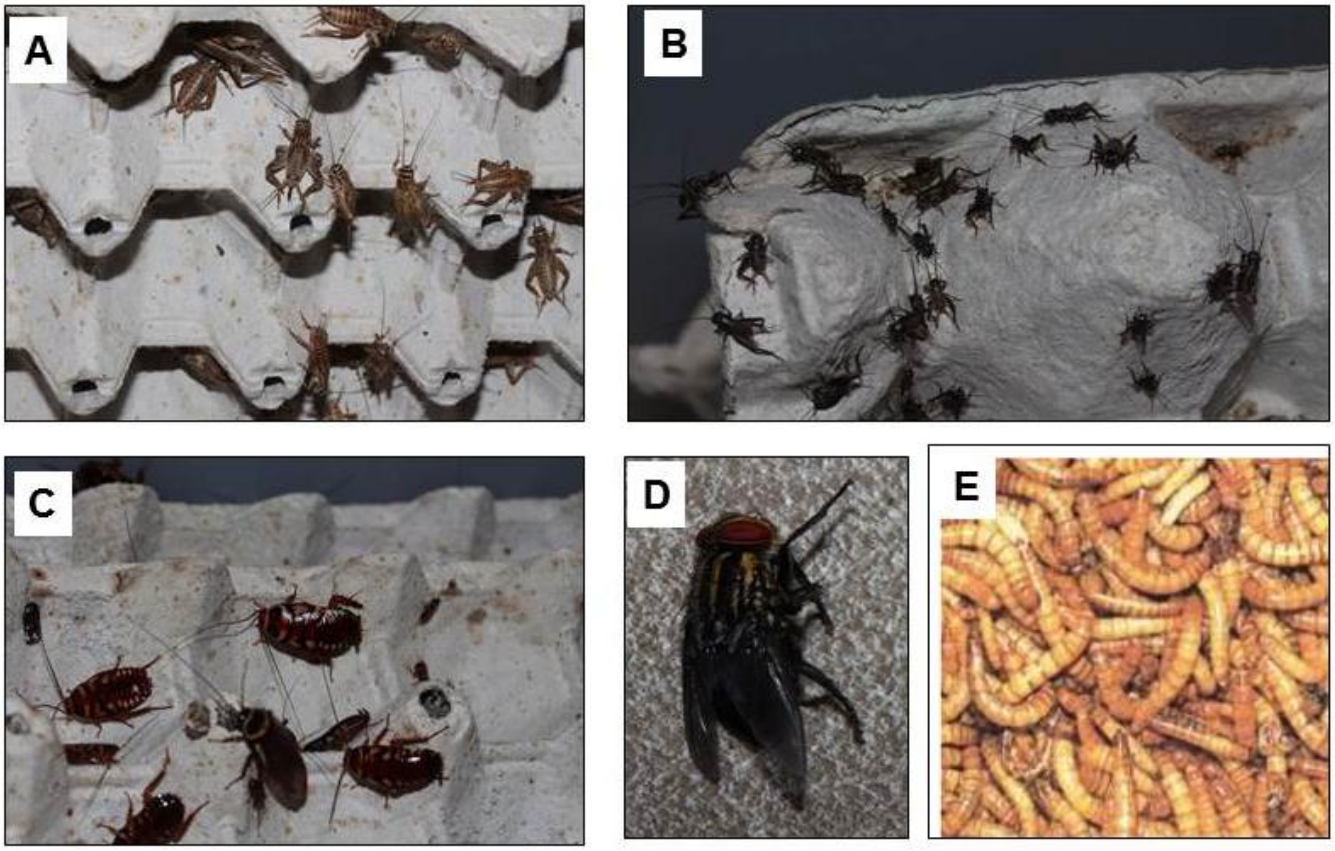
Mantenimiento de animales

El bioterio de artrópodos constituye la base para la cría y el mantenimiento de diferentes clases de artrópodos entre ellos arácnidos, insectos o dípteros que se utilizan con fines investigación, docencia u otros. Es requisito importante en la cría y mantenimiento de insectos, y otros artrópodos el conocimiento de técnicas y condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de estos, lo que justifica la creación de una guía de manejo. El objetivo es lograr mantener material óptimo, homogéneo y de calidad ya sea para ser empleado en investigación, como alimento vivo para otras especies de invertebrados y vertebrados, o para otros fines (Pérez et *al.* 2004).

Dentro de las especies de interés a criar en un vivario que puedan emplearse como organismo para realizar bioensayos se encuentran especímenes de los siguientes ordenes: Ortóptera *Acheta domesticus* (Fig.1A), *Acheta assimilis* (Fig.1B), Blattaria: *Periplaneta australasiae* (Fig.1C), Diptera: *Peckia intermutans* (Fig.1D), Coleoptera: *Tenebrio molitor* (Fig.1E). Además pueden mantenerse diversas especies de escorpiones. Estas especies pueden ser útiles como organismos modelo en bioensayos por presentar ciclos de vida cortos, con altas tasas reproductivas y no ser estacionales, con lo cual su abundancia no se limita a una época del año. Así mismo estos organismos pueden a su vez servir de alimento "vivo" para otras especies dentro del vivario.

El mantenimiento de colecciones vivas bajo condiciones controlas permite la obtención de un gran número de animales de forma rápida y segura. Para obtener organismos con características uniformes, estos deben de reproducirse bajo condiciones ambientales controladas, mantenerlos libres de enfermedades o patógenos y definir su población microbiológica (Villanueva y Hernández 2004). Dentro de las posibles razones que limitan la cría a gran escala de especies artrópodas como biomodelos se encuentra el costo que implica el mantenimiento de colecciones que garanticen la disponibilidad de animales y tallas para uso en los diferentes bioensayos. A lo anterior se suma la dificultad de ciertas especies silvestres para aclimatarse a las condiciones de cautiverio. De ahí la importancia de establecer criaderos, los cuales suplan animales que respondan a determinadas características y que cumplan con requerimientos sanitarios que permitan garantizar la calidad de los especímenes. Así mismo el establecimiento de protocolos de cría y manejo que asegure un control de calidad de los organismos criados, y a su vez permitan la obtención de datos cualitativos y cuantitativos sobre la biología de los

artrópodos, optimizando tiempo y esfuerzo



1. Especies de insectos de interés a mantener en colecciones en un vivario. *Acheta domesticus* (Fig.1A), *Acheta assimilis* (Fig.1B), *Periplaneta australasiae* (Fig.1C), *Peckia intermutans* (Fig.1D), *Tenebrio molitor* (Fig.1E).

Plagas

Dentro de una colección viva de insectos es frecuente la aparición de plagas, referido a cualquier organismo de una especie determinada que afecte la estabilidad de la colonia y que de no controlarse puede causar el exterminio parcial o total de ella. Entre las que más comúnmente atacan colecciónes de invertebrados están las hormigas, los ácaros y las moscas parasíticas de la familia Phoridae. Otros organismos tales como hongos oportunistas, pueden Para controlar el ingreso de plagas dentro de la colección viva es importante evitar el uso de sustancias químicas tales como plaguicidas en aerosol, esto porque las moléculas pueden viajar en el aire y pueden afectar al resto de las colonias de la colección. Es mejor el uso de sustancias inoloras. Durante la aplicación de este tipo de sustancias los individuos a los cuales se les aplica el tratamiento deben ser separados del resto de la colonia. Puestos

en cuarentena de 48 a 72 horas o hasta eliminar la plaga. Además debe mantenerse la limpieza de restos de comida, excrementos o individuos muertos que propicien la aparición de este tipo de organismo plaga dentro de los contenedores o recintos en los que se mantienen los individuos pertenecientes a las diferentes colecciones.

Registro de datos

Es importante llevar el control de datos cuantitativos y cualitativos de cada una de las colecciones. Para ello se debe mantener una bitácora de trabajo con apartados para cada contenedor o caja de mantenimiento de la colección donde anote datos tales como: especie, número aproximado de reproductores (si aplica), estadío.

Se deberá llevar control de la cantidad de individuos muertos por contenedores y fecha para poder realizar cálculos de tasas de mortalidad.

Aspecto ético

Como parte del manejo de una colección de organismos vivos para uso en bioensayos, el uso de invertebrados, en este caso insectos debe realizarse de acuerdo a normas éticas donde se respete la vida. A pesar de que estos organismos son considerados de menor orden jerárquicos en las cadenas tróficas, no debe darse un uso indiscriminado de estos organismos.

Especies mantenidas

Escorpiones (*Centruroides sp*)

1. Generalidades de la especie

En Costa Rica se reconocen 14 especies de escorpiones. Pese a que el sentir popular es que los habitas apropiados para los escorpiones se relacionan con lugares cálidos, muchas de las especies presentes en el país se distribuyen en ambientes fríos y húmedos. Los escorpiones pueden encontrarse en una gran diversidad de microhabitats, desde campos de cultivo, bajo la vegetación nativa o incluso bajo cortezas de árboles, troncos huecos, o lugares donde pueden permanecer secos y a oscuras.

Centruroides edwarsii: Es la especie más conocida en el valle central y el pacifico norte. La coloración es generalmente oscura. Carlos Víquez en su libro Escorpiones de Costa Rica (1991) se refiere a esta especie como *Centruroides margaritatus,* sin embargo Armas et *al.* 2012 indica que la especie que está presente en Costa Rica es *C. edwarsii*.

El tamaño de esta especie varía de 60 a 100mm. La coloración es generalmente oscura, las tenazas son más gruesas. Los tubérculos y gránulos están muy marcados y espaciados por todo el cuerpo

Centruroides bicolor: Según Víquez 1999 es una de las especies más grandes y coloridas, puede llegar alcanzar 120mm de largo. Presenta una coloración atractiva, las tenazas son negruzcas, igual que el último segmento de la cola, el aguijón, el cefalotórax y parte del abdomen es amarillenta. Los machos son más delgados y alargados que las hembras y estas presentan un número menor de dientes pectinales.

Centruroides limbatus: es la segunda especies de mayor tamaño en Costa Rica puede superar 110mm. Presenta gran variedad de coloración, se considera una especie polimórfica. En la coloración más frecuente el cefalotórax es oscuro, mientras que el resto del cuerpo es amarillento. Otra variación es la cantidad y distribución de los gránulos en el cuerpo: escasos y espacios en las variedades típicas y claros y abundantes en las variedades oscuras.

2. Adquisición de los especímenes:

Los especímenes serán adquiridos mediante colectas con los debidos permisos establecidos por ley. Además se aceptaran individuos que sean donados por terceras personas sin afán de lucro.

3. Ingreso de especímenes:

Los individuos que lleguen al "vivario" serán registrados en un libro de ingreso donde de anotará los siguientes datos: Especie, fecha de ingreso, colector, localidad de procedencia, sexo, peso, y tamaño (longitud total) y observaciones. Se asignara un único número continuo de ingreso a cada espécimen que ingrese a la colección con el fin de evitar que la información de duplique. La información anterior será digitalizada en una base de datos, revisada y actualizada cada mes.

4. Recintos y contenedores

Contenedor. Las cajas de mantenimiento deben ser oscuras y de materia resistente. Se probaron dos tipos de cajas plásticas. Una de ellas es de plástico grueso de dimensiones 14cm de diámetro por 8 de alto. El otro modelo es de plástico más flexible de menor altura y mayor diámetro (17cm de diámetro y 5cm de alto). El modelo que resulto ser más adecuado y funcional para el alojamiento de los escorpiones fue el segundo modelo, debido la apertura de la tapa es más fácil, sin embargo se debe tener cuidado al abrir y cerrar las cajas para no romper la tapa, para evitar el escape de espécimen (Fig. 2).

Fig 2. Contenedores para alojamiento de los escorpiones.

a) Ventilación A las cajas de mantenimiento se les hará agujeros en la superficie de las tapas para permitir la ventilación. Los agujeros no deben ser de más de 4mm. No es recomendable la colocación de materiales tal como cedazo de mosquitero, los escorpiones pueden trepar y quedarse por debajo de la tapa, lo cual representa un riego al momento de abrirla. El escorpión puede salirse con mayor facilidad del contenedor y esto aumenta la probabilidad de una picadura accidental.
b) Refugios Para especies arborícolas tales como *C. limbatus* se probaron varios modelos de refugios varios modelos de refugios: trozos de cortezas, ramas secas, trozos de servilletas o papel krarf. El segundo y tercer modelo no son muy útiles. Las ramas al ser de formas irregulares y gruesas pueden romper la tapa. Las servilletas se ensucian muy rápido de los restos de comida y esto provoca la aparición de moho y hongos. Trozos de corteza son más aptos para estas especies, proveen un medio donde el escorpión puede esconderse o camuflarse y sentirse menos expuesto

c) Recipientes de agua y comida Se probaron dos formas alternativas para proveer agua. Una con algodones saturados con agua y colocados en un extremo del recipiente. La segunda fue colocar algodones saturados con agua y colocados dentro de tapas de refresco gaseoso. Esta última resulto ser la más efectiva. Los trozos de algodón se desecan muy rápido, por lo que se corre el riesgo de que los animales la provisión de agua necesaria y mueran por falta de hidratación (Fig. 3).

Fig 3. Contenedor de alojamiento para escorpión con bebedero.

d) Sustrato. Para escorpiones de los géneros *Centruroides*, se probaron como sustratos hojas secas de árboles, tierra, arena de rio, arena de playa. Los tres primeros resultaron no ser adecuados pues al mojarse pierden contextura y liberan sustancias que pueden ser toxicas para el escorpión. El sustrato que mejor resultado mostró fue la mezcla de tierra orgánica con arena, que permite un sustrato oscuro donde el animal puede sentirse menos expuesto y que resulta inerte si se humedece (Fig. 3). Una capa de 1 cm de profundidad es suficiente para especies terrestres o arborícolas. Este tipo de sustrato mantiene un buen drenaje en caso de derrame de agua.

5. Parámetros abióticos

a) Temperatura Se determinó que las temperaturas más favorables para el mantenimiento de los especímenes deben mantenerse en un rango entre los 22 y 27 gados centígrados. Temperaturas por encima de 29 a 32 grados centígrados favorece la desecación de los recipientes con agua dentro de los contenedores.

b) Humedad: la humedad se mantuvo en 25 (±3) ºC.

6. Alimentación

a) Planificación de alimentación: cada 15 días se realiza la alimentación a cada uno de los especímenes la cantidad y número de presas ofrecidas a cada especie de escorpión varía de acuerdo a su estado ontogénico. De acuerdo con Polis (1990) el tiempo de desarrollo podría estar en función de la disponibilidad de presas y la temperatura.

En el caso de los escorpiones mantenidos en el vivario tres dietas fueron ofrecidas:

1) Cucaracha común casera *Periplaneta australasiae*: Se utilizan las ninfas de tercer o cuarto instar para alimentar a especies de mayor tamaño.

2) Grillos (*Acheta domesticus y Acheta assimilis*): se utilizaran ninfas de segundo o tercer instar para la alimentación de crías y especies pequeñas de escorpiones de 3-4 cm

3) Larva de escarabajo de harina *Tenebrio molitor*: Se utiliza para la alimentación de especies adultas de tamaño de más de 5cm.

La presa que mejor es consumida por los escorpiones es el grillo *A. domesticus* o *A. assimilis*. Se comprobó que las cucarachas grandes de más de (1.50g) no son convenientes, para escorpiones pequeños. El escorpión pica a la cucaracha mas no la consume, esto propicia la aparición de moscas dentro del contenedor.

b) Hidratación: La hidratación se realiza cada semana mediante piezas de 3cm de algodón saturado con agua, las cuales se colocan sobre tapas plásticas para evitar la desecación del mismo y mantener la humedad dentro del recipiente. Se observo que en los meses más calurosos (Enero-mayo) se debe revisar el contenido del agua de las especies de bosque húmedo como es el caso de *C. limbatus*, estos especímenes requieren mayor cantidad de agua.

7. Reproducción

a) Diferenciación sexual: En el caso de escorpiones del género *Centruroides* los machos se diferencian de las hembras por presentar el último segmento (telsón) más largo, además las hembras suelen ser más pesadas que los machos (Fig. 4)

b) *Ciclos reproductivos*: El ciclo reproductivo de los escorpiones es complejo, presenta un cortejo largo que puede durar alrededor de varias horas, luego el macho coloca una estructura reproductiva llamada espermatóforo, el cual es transmitido a la hembra. El periodo de gestación

varía según la especie. En promedio va desde dos meses a un año.

c) Ovoposición o viviparismo: Los escorpiones son vivíparos, por lo que las crías emergen desde el gonoporo de la hembra y se trasladan a su dorso. Se observó una sincronía del parto en *C. edwarsiii*. Las hembras que fueron colectadas en las mismas fechas del año presentaron crías cinco meses después, lo cual podría pensarse que se dé una sincronía del parto en especies que se mantienen en cautiverio. El número de crías por hembra varía con el tamaño de la hembra, en promedio cada hembra tiene entre 35 a 43 crías. Las cuales se colocan de forma asimétrica en el dorso de la hembra (Fig 5).

Fig 4. Dimorfismo sexual de *Centruroides edwarsii*. Derecha macho Izquierda hembra

.

Fig 5. Hembra de *Centruroides edwarsii* con crías en el dorso.

8. Mantenimiento de Neonatos y crianza

Las crías se mantienen con la madre durante los primeros dos meses, periodo que duran las criar en bajar totalmente del dorso de la madre. Las crías fueron alojadas en dos tipos de contenedores: recipientes plásticos transparentes de 25cm de alto y 20cm de ancho, y en recipientes de plástico oscuro de dimensiones circulares 17 de diámetro y 5 cm de alto (Fig 3). En ambos recipientes se colocó una capa de arena de río de 3cm de espesor como sustrato. Los recipientes que mejor resultado dieron fueron los de plástico oscuro de menor altura.

En cada recipiente se colocaron como máximo 12 crías y se colocaron hojas secas como refugio. Esto evita la depredación de las crías entre sí. Al colocar más de 20 crías en un mismo recipiente se observó que la mortalidad de las crías aumenta.

9. Manipulación de individuos

a) Manipulación y sujeción Los individuos se manipularon con pinzan de más de 15 cm de longitud. Cuando se requería trasladar el espécimen de un contenedor a otro. Se observo que el empleo de pinzas más cortas aumenta el riego de una picadura. Durante la extracción del veneno los especímenes fueron manipulados manualmente, la sujeción se realiza de forma rápida, se sujeta al animal por el último segmento de la cola, de forma que se inhabilite el movimiento para del telsón.
b) Inmovilización y sujeción: los animales fueron anestesiados en frio. Colocando el animal en la nevera por 4min, esto disminuye la actividad metabólica del animal y facilita la inoculación de la sustancia.
c) Inoculación: para la inoculación de la sustancia se procede a colocar el escorpión en posición ventral. La colocación de tiras de plasticina de 5 cm de largo para inmovilizar las patas. Esto da muy buen resultado porque permite mantener inmovilizado el animal sin maltratarlo. Posteriormente se inocula la sustancia via intrapleural en el segundo segmento del preabdomen.

Grillos (*Acheta domestica y A. assimilis*)

1. *Generalidades e historia natural de la especie*

El grillo europeo domestico fue introducido en Norteamérica desde Europa en el siglo XVII. *Acheta domesticus* ha sido utilizado como un importante modelo experimental en estudios de fisiología y toxicología, además es utilizado como alimento vivo para muchas especies de anfibios o reptiles (Szelei et *al*. 2011). Por su parte *A. assimilis*, conocido como grillo de campo jamaiquino ha sido utilizado en

bioensayos y estudios toxicológicos.

2. Adquisición de los especímenes:

Estos grillos no son nativos por lo que los individuos que conforman el pie de cría suelen obtenerse de criaderos comerciales. Para reducir problemas por endogamia, el pie de cría deberá ser renovado periódicamente, con el fin de aumentar la variabilidad.

3. Ingreso de especímenes

Cada vez que ingresen nuevos especímenes a la colección viva deberán mantenerse en contenedores aislados del resto de la colección permanente para evitar posible contaminación. Los especímenes deben permanecer aislados por cinco días para monitorear la mortalidad, posterior a este periodo se integran como parte de la colección según sea su estado ontogénico.

4. Recintos y contenedores

Los especímenes serán colocados en contenedores plásticos de acuerdo a su tamaño. A cada contenedor se le hará un hueco en la tapa o dos ventanas en los lados opuestos. Los huecos se deberán cubrir con mosquitero para permitir una adecuada ventilación y así evitar la entrada de otros insectos o parásitos dentro del contenedor. Para el mantenimiento de especímenes de *A. domesticus* se debe tener dos tipos de contenedores: uno para las crías y otros para la reproducción. Contenedores plásticos de 80-90L para mantener ejemplares adultos reproductores (Fig. 6).

Contenedores plásticos de 30-40L pueden ser empleados para el mantenimiento de crías y juveniles. De igual manera, contenedores de 30L pueden emplearse como "cámara de incubación" donde se mantengan los recipientes que contienen los huevos. A esta cámara de incubación debe mantenerse a temperaturas más altas, empleando una lámpara o bombillo para suministrar calor de forma permanente (Fig. 7).

a) Contenedor: El contenedor requerido para el mantenimiento de especímenes de *A.domesticus* debe ser amplio para poder incluir de forma separada los refugios, del recipiente de agua y comida. Esto para permitir espacios secos y húmedos dentro del recinto.

b) Ventilación: Para permitir la ventilación en los contenedores se realizaron varios

procedimientos. Se colocaron mallas de cedazo fino de ½ cm de diámetro para evitar el ingreso de otros insectos que pudieran dañar la colonia. Se hicieron huecos de medio centímetro de diámetro alrededor de los contenedores de reproducción.

c) Refugios: la utilización de cartones para huevos resulto ser la mejor opción para permitir que los grillos se refugien, tengan mayor área superficial y se disminuya la depredación entre individuos. (Fig. 6).

Fig 6. Contenedor para reproducción para grillos

d) Recipientes de agua y comida. Se probaron varios tipos de recipientes para el suministro de agua. Platos Petri con algodones saturados con agua, bebederos para aves. Los bebederos y los comederos para grillos colocados fueron colocados a baja altura, así los grillos puedan trepar fácilmente sobre estos, y también deben ser amplios para que una gran cantidad de grillo puedan beber, y comer a un mismo tiempo dentro de cada uno. Deben tener forma de una pequeña bandeja con poca profundidad, y con fondo plano.

e) Sustrato: se utilizo cartones de huevo, colocados en la parte basal de la caja de los contenedores No se recomienda la colocación de otro porque se corre el riesgo que los individuos lo ingieran o que las hembras lo utilicen como sustrato para ovopositar.

5. Parámetros abióticos

a) Temperatura. Se determino que las temperaturas más favorables para el mantenimiento de los especímenes deben mantenerse en un rango entre los 24 (±4)°C. Temperaturas por encima de 29 a 32 grados centígrados favorece la desecación de los recipientes con agua dentro de los

contenedores.

b) Humedad: la humedad se mantuvo en 60 (±3) º C. A temperaturas menor de 20ºC los individuos mueren a causan de deficiencias en el mecanismo de termorregulación.

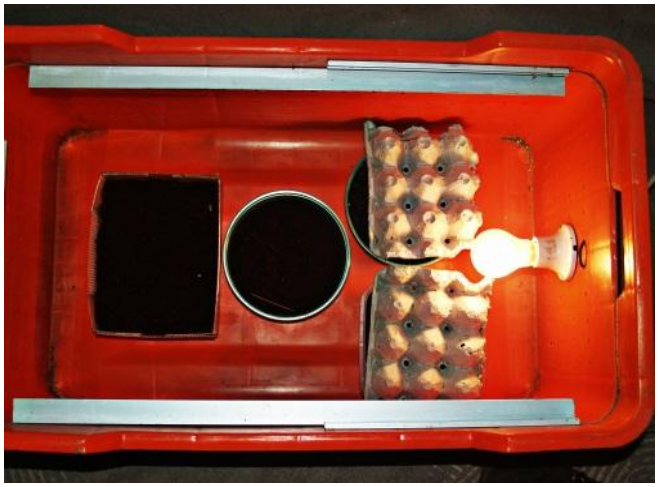


Fig7. Cámara de Incubación para grillos *Acheta domesticus* y *Acheta assilimis.*

6. Alimentación

El grillo doméstico es una especie omnívora por naturaleza, pero en cautiverio no es considerado necesario darle nutrientes de origen animal. La calidad de los nutrientes usados para mantener a los grillos debe ser la mejor posible para mantener a todos los grillos saludables (Gaiba 2007, Davenpor 2013). La alimentación de los grillos con una adecuada dieta es importante por varias razones: primero los grillos necesitan una adecuada nutrición para sobrevivir y reproducirse, además los grillos deben permanecer saludables por que serán el alimento de otras especies por lo que se debe suministrar una buena nutrición (Nakagaki y Dbfoliart. 1991). Los grillos requieren una dieta alta en proteínas para evitar el canibalismo. A continuación se detalla la elaboración de dos de las dietas suministradas a *A. domesticus* y *A. assimilis*

Dieta 1: Se mezclan 5 partes de comida para gallina ponedora con una parte de multivitaminico Pecutrin® con biotina y dos partes de alimento para roedores de laboratorio. Todos los ingredientes se mezclan muy bien durante 3 min y se coloca en un recipiente hermético y se mantiene tapado bajo refrigeración a 5ºC

Dieta 2: se mezclan 5 partes de alimento para gato (adulto), 1 parte de leche en polvo y parte de Ca^{+2} (pastillas de Calcio molidas). Se debe moler o pulverizar previamente el alimento para facilitar el consumo por parte de los grillos. Posteriormente se mezclan los demás ingredientes por 5min para permitir una mezcla homogénea.

Se recomienda el suministro de comida para peces en hojuelas por su alto contenido vitamínico y proteico. Durante el mantenimiento de la colección de ambas especies de grillos la adición de este tipo de alimento a los grillos recién eclosionados (0 a 2 semanas) ha dado un buen resultado para el buen crecimiento y desarrollo de las ninfas de ambas especies. Además de disminuir la mortalidad durante los primeros estadios. El Cuadro 2 detalla los porcentajes nutricionales de los componentes de las dietas utilizadas.

a) Planificación de alimentación: La alimentación se realizó tres veces a la semana. Durante el mantenimiento se realizó primero 2 veces a la semana pero se observó que los individuos ingirieren muy rápido el alimento y queden desprovistos de recursos por un día, por lo que se realizó la alimentación más veces durante la semana para asegurarse que todos los individuos tuvieran acceso a comida

b) *Hidratación*: En nuestra propia experiencia así como en la literatura (Gaiba 2007), el agua más recomendable para la zootecnia del grillo es el agua electropurificada. El agua se colocó en bebederos y se revisó constantemente. El agua fue reemplazada cuando se observo sucio o con color verdoso. El agua se suministro *ad libitum d*e acuerdo al tamaño de los grillos, para ello se utilizaron los siguientes bebederos.

Grillos recién eclosionados de 2-3mm se les proporciono agua mediante viales pequeños de plástico con agua, el extremo se coloca un trozo de algodón húmedo.

Grillos Pequeños de 3-10mm. Se utilizaron bebederos de 100ml (Fig. 8) los cuales fueron colocados sobre un plato de Petri (para facilitar el acceso de los grillos) y en la salida del agua se cubrieron con algodón o "espuma floral" para evitar que grillos pequeños se ahoguen.

Grillos medianos (10-15 mm) y adultos (15-25mm) se le suministra agua mediante bebederos para pollitos (Fig. 8).

Se observó que también el uso excesivo de algodón puede dentro de los platos de Petri provoca la aparición de hongos debido a que los grillos contaminan el material con restos de comida y heces.

Además la hidratación se complementó aportando frutas frescas y vegetales frescos. El agua líquida se substituye por rebanadas muy delgadas de frutas frescas y vegetales frescos, las cuáles deben ser cambiadas por nuevas rebanadas justo cuando comienzan a secarse o pudrirse. Todas las frutas y vegetales fueron lavadas antes de ser puestos en el bebedero. Los recipientes empleados para el agua deben ser cambiados dos veces a la semana. Pueden ser usados simultáneamente estas dos formas de agua dentro del mismo contenedor. Esto le da a los grillos más de una opción para elegir.

Fig.8. Bebederos para aves empleados para grillos. Bebedero de 100 ml. Bebedero de 300 m

7. Reproducción

Los grillos son ovíparos y depositan sus huevos dentro del suelo, raíces de plantas o dentro de sus madrigueras (Alexander 1968).

a) Diferenciación sexual: las hembras se diferencian de los machos por el número de apéndices que tiene al final del abdomen. De ser macho, tendrá solo dos, de ser hembra, tendrá un tercer apéndice entre estos dos, este es el oviscapto, utilizado para realizar la ovoposición (Fig. 9). Esta característica se puede apreciar a partir de las dos últimas mudas y con mucha facilidad al llegar a su estado adulto, pudiendo llegar a medir el oviscapto hasta los 20mm.
b) Ciclos de reproducción: *Acheta domesticus* y *Acheta assimilis* son dos especies muy proliferas. Si se le suministrada agua y comida de forma permanente su ciclo reproductivo no estará limitado por factores estacionales. Ambas especies presentan picos de actividad reproductiva durante la noche.

c) Cópula: el macho corteja a la hembra por medio de su canto. Aunque los cantos no suelen llegar a niveles de intensidad perturbadores, se recomienda que espacio destinado a alojar la colección de grillos esté separado de ambientes tranquilos (como oficinas y estudios) o que sea mantenido en condiciones de aislamiento acústico. El macho deposita una estructura llamada. espermatóforo en forma de saco membranoso, con forma redondeada, de color blanquecino. Esta estructura contiene en su interior el esperma. En la copula el macho cede el espermatóforo a la hembra, y lo deposita en la bursa y emigra hasta el receptáculo seminal de la hembra, donde se almacena. La hembra controla la liberación de unos pocos espermatozoides, que fecundan los óvulos en el momento de la puesta.

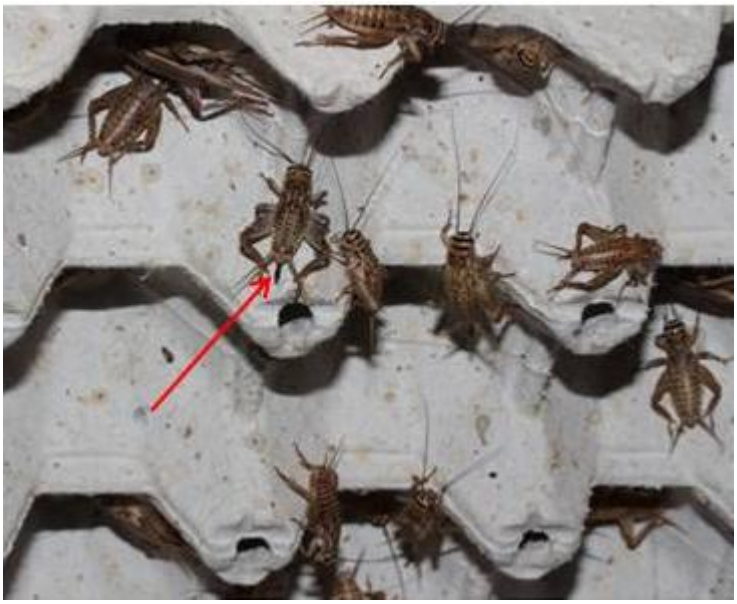


Fig 9. Hembra de *Acheta domesticus* séptimo instar con ovopositor desarrollado.

d) Ovoposición: los grillos son ovíparos depositan los huevos dentro de un sustrato húmedo y suave. Se utilizaron dos tipos de recipientes como *camas de puesta*: a) circulares de 20 cm de diámetro y b) rectangulares de 20x 10x 6cm (Fig10). Ambos modelos de recipientes resultaron ser adecuados. Sin embargo el recipiente en forma circular limita el espacio para ovopositar por lo que la cantidad de hembras que lograron ocupar un sitio para colocar sus huevos es menor que en los recipientes rectangulares.

e) El substrato se colocó dentro de los recipientes hasta un centímetro por debajo del borde del recipiente, la superficie del substrato debe quedar plana y uniforme. El substrato debe tener un mínimo de tres centímetros de profundidad. Esto para evitar el disturbio de parte de los machos

o de las mismas hembras cuando excavan para ovopositar. El sustrato utilizado para ovoposición será una mezcla de sustrato hidropónico con fibra de coco previamente esterilizado. Se colocó una rejilla metálica encima de la cama para evitar que los machos disturben los huevos ya puestos. Se observó que la colocación de este tipo de malla evita que los grillos adultos pasen al substrato escarbando por las orillas (Fig. 10).El sustrato para la ovoposición se colocó dentro de los recipientes y se humedeció. Las camas se colocaron 8 días. Posteriormente se retiraron y fueron colocados dentro de contenedores de incubación (Fig. 7). La temperatura fue constante y las camas se revisaron periódicamente. La humedad se mantuvo mediante el rocío de agua cada dos días.

Fig10. Modelos de cama de ovoposición para grillos del genero *Acheta*

f) Incubación: Se determinó que en promedio el periodo de incubación fue de 13 (±5) días. La temperatura de incubación fue de 29 (±2°C).

g) Emergencia de larvas: Posterior al periodo de eclosión la cama se mantuvo 4 días más dentro del contenedor de cría para permitir la salida de todos los grillos (Fig 11) El sustrato de las camas posteriormente a su utilización se desinfectó mediante una disolución de cloro al 8% para eliminación de bacterias y hongos.

Fig11. Cría de *Acheta domesticus* sobre el sustrato con 1 día de eclosión

8. Mantenimiento de neonatos y crianza

Las crías se mantuvieron en cajas contenedoras con abundantes cartones de huevo, para brindar refugio (Fig. 12). Cada 2 días se alimentaron con comida de peces en hojuelas. Se observó que este tipo de alimento provee los nutrientes necesarios para disminuir la mortalidad en estadios mayores de crecimiento. Cada semana se registra el control de crecimiento de las ninfas.

Fig12. Crías de grillos dentro de cartones de huevo usados como refugio

9. *Manipulación de individuos*

a) Manipulación y sujeción: Ambas especies de grillos son muy delicadas, por lo que en nuestra experiencia no se recomienda el uso de pinzas rígidas para su sujeción. Los individuos fueron manipulados manualmente para no ocasionar daño en sus estructuras, en especial en las ninfas. También puede emplearse pinceles finos y pinzas flexibles para capturar algunos individuos, pero siempre con mucho cuidado.

b) Inmovilización: durante los bioensayos los individuos fueron anestesiados en frío, colocándoles en la nevera por 4min a 5°C.

c) Inoculación: Durante los ensayos para determinar letalidad y parálisis media, los individuos fueron inoculados en bajo la membrana intersegmental del lado ventral entre el segundo y tercer par de patas (Fig. 13). Se realizaron controles negativos con solución salina para insectos, en este caso el volumen inyectado fue de 8 µl. anteriormente se realizaron pruebas con otros volúmenes varios de 50, 30, 10 µl, sin embargo estos volúmenes ocasiona la muerte del animal.

Fig 13. Procedimiento para inocular sustancias via intracelomica en Acheta domesticus

Cucarachas (*Periplaneta australasie y P. americana)*

1. *Generalidades e historia natural de la especie*

La cucaracha americana (*Periplaneta americana*) y la australiana (*Periplaneta australasie*) son insectos de tamaños moderados, con cuerpos comprimidos dorsolateralmente. A diferencia de la inmensa mayoría de las especies que integran el orden Blataria, estas especies sí se asocian al ser humano, adaptándose a ambientes interiores de las construcciones humanas. Son omnívoras y sus partes bucales constituyen un sistema masticador no especializado que contribuye con sus capacidades a aprovechar residuos y desechos dejados por humanos, lo que suele resultar en explosiones poblacionales de estos insectos, convirtiéndose en plagas. A pesar de su similitud, ambas especies pueden ser diferenciadas (Fig. 14). La cucaracha australiana es de color canela, y es ligeramente más pequeña de la cucaracha americana, pudiendo distinguirse de esta por las rayas amarillas en sus alas, y por el contorno amarillo en su cabeza (Vargas 1995). La coloración del adulto australiano es similar a la de la cucaracha americana, pero con unas marcas claras en los laterales en los bordes superiores de las tegminas (primer par de alas, que son protectoras; Ponce et al. 2005). El pronoto está anillado con una coloración similar. Los adultos son un poco más pequeños que los de la cucaracha americana midiendo de 32-35mm. En ambas especies, las hembras maduran en un año y típicamente viven otros 4-6 meses. Una hembra puede producir unos 20-30 ootecas de unos 11mm de largo con unos 24 embriones. El desarrollo embriónico es de unos 40 días. Sus hábitos son predominantemente nocturnos con picos de actividad durante las primeras horas de la noche (Boyer y Rivault 2004).

Fig 14. Dos especies de Genero *Periplaneta.* Izquierda *P. australasie.* Derecha *P. americana.*

*2**. Adquisición de los especímenes.***

Debido a la gran explosión poblacional de ambas especies de cucarachas en entornos antropizados, los especímenes para el pie de cría pueden colectarse del medio. Esto tiene la ventaja de asegurar variabilidad genética en el grupo reproductor, pero a su vez tiene la desventaja de que los especímenes del medio pueden acarrear bacterias, nemátodos, ácaros, e incluso varios protozoarios como Toxoplasma gondii (Chinchilla 1976) y otros parásitos que pongan en peligro tanto la colección como la salud de quienes la manejan. Por ello, es muy importante que los animales capturados permanezcan en cuarentena en espacios separados de la colección, y que de ser posible sean tratados de forma profiláctica con garrapaticidas. Para la captura de ejemplares se utilizaron las siguientes trampas de colecta

Modelo 1: Envases de refrescos cortados en forma de embudo. En el fondo del recipiente se colocó un algodón humedecido con vino. Las trampas se pusieron aleatoriamente en sitios oscuros y se revisaron cada 15min.foto

Modelo 2: Se colocó miel de abeja en un trozo de papel adhesivo, similar a los utilizados en trampas caceras para ratones. Se colocó encima una caja de cereal cortada a la mitad semejando un refugio. Se realizaron orificios con dimensiones cuadradas para permitir la entrada de las cucarachas. Los orificios son pequeños para evitar posterior fuga. Las trampas se coloraran en sitios oscuros de forma aleatoria y se revisaron cada 30 min.

El segundo modelo de trampa no resulto ser efectivo, la miel provoca que otros insectos tales como hormigas se acerquen al piso de la trampa, lo cual ahuyenta a las cucarachas. Además el tiempo entre cada revisión, es muy largo, esto aumenta la probabilidad de escape de los individuos en la trampa. En cambio el modelo 1 permitió la colecta de un gran número de individuos en poco tiempo (10-15 individuos por revisión). Debe anotarse que para este modelo de trampa se debe ponerse cuidado a la cantidad de vino colocado (no más de 3ml) por que los individuos pueden consumirlo rápidamente y morir a causa del etanol.

3.Ingreso de especímenes.

Los individuos colectados se separaron según su estado ontogénico (ninfas o adultos) se colocaron en contenedores cilíndricos de 56cm de alto y 44 cm de diámetro. Los individuos permanecieron en los contenedores por al menos 10 días, como periodo de cuarentena para evitar que el resto de la colonia se contamine.

4. Recintos y contenedores

a) Contenedores. El ambiente propicio para el mantenimiento de cucarachas debe presentar las siguientes características: oscuro, seco, ventilado para permitir una adecuada regulación entre la temperatura y humedad. Así como la prevención de formación de mohos u hongos que contaminen la colonia

b) Ventilación. Para permitir la ventilación en los recintos de mantenimiento se realizaron agujeros en la superficie de las tapas. Las dimensiones de los agujeros no deben exceder los 3cm de diámetro. Se observó que las crías pueden entrar o salir por estos agujeros, por lo que nos es conveniente que los huecos excedan este diámetro, para evitar fugas. En el caso de los contenedores de crías se colocó una malla de medio centímetro de diámetro. Se determinó que la colocación de este tipo de malla evita la fuga de las crías de menos de un centímetro.

c) Refugios y estructura. Se utilizaron cartones de huevo como refugio, esto resulto ser la mejor opción para que los individuos se refugien y así evitar la depredación (Fig. 15). Así mismo los cartones permitir la colocación de las ootecas. Los cartones se probaron en tres posiciones: horizontales, verticales e inclinadas. La posición que resulto más apta fue la inclinada. De esta forma las cucarachas pueden refugiarse y sus heces no se acumulan en el fondo de la caja de mantenimiento, además que se facilita el recambio de los cartones sucios.

d) Recipientes de agua y comida. Se probaron varios tipos de recipientes para el suministro de agua Platos Petri con algodones saturados con agua, bebederos para pollos (300 ml) y bebederos para ave (100 ml). El primero resulto no ser conveniente porque el algodón se deseca muy rápido. El segundo resulto ser adecuado solo para los adultos: individuos de menos de 0.5g se ahogan fácilmente dentro del bebedero lo que ocasiona además que el agua se contamine con individuos muertos. El bebedero para ave resultó muy conveniente, especialmente si se le coloca a la entrada de la boca del bebedero un trozo de esponja para lavar platos. Esto evita la entrada de individuos dentro del bebedero y el agua no se derrama. La comida se colocó en platos Petri de 3 cm de alto. Esto facilita el acceso a la comida por parte de todos los individuos. Se probó también la colocación de comederos para pollo, sin embargo estos no son muy útiles por que limitan el acceso a los individuos más pequeños.

e) Vegetación. No se recomienda la colocación de vegetación dentro de las cajas de mantenimiento. Estas pueden propiciar la aparición de otros insectos dentro de los contenedores

y aumentar peligrosamente la humedad en los recipientes de plástico.

f) Sustrato. Se probaron varios tipos de sustratos tales como viruta de madera, papel periódico en tiras y trozos de cartones de huevos. El primero resulto no ser adecuado al mojarse y mezclarse con las heces comienza a adherirse en el fondo de las cajas de mantenimiento, por lo que dificulta la limpieza de los mismos. El papel periódico en tiras es adecuado solo para individuos adultos. Los cartones de huevo resultan ser adecuados para crías y adultos. Si el cartón se moja debe ser retirado pues podría propiciarse la aparición de moho.

Fig 15. Refugios de cucarachas en sus contenedores de mantenimiento. Izquierda ninfas de *P.australasie.* Derecha individuos adultos de *P. australasie*.

5. Parámetros abióticos

a) Temperatura mantenerse en un rango de 26-28°C
b) Humedad relativa se mantuvo en un rango de 60- 76%.

6. Alimentación.

Se utilizó para alimentar dietas artificiales a) Comida para gato molida para proveer proteína y así evitar canibalismo. b) Mezcla de comida para gallina ponedora y Multivitaminico Pecutrin ®. Las dos dietas resultaron ser efectivas para propiciar el desarrollo de las ninfas.

a) Planificación de alimentación: la alimentación se llevó a cabo cada tres días. Dos veces por semana se colocan en platos Petri trozos de zanahoria, papa o algún otro vegetal que proporcione nutrientes. La zanahoria resulto ser la más adecuada y preferida por las cucarachas. Si se coloca papa, se debe tener cuidado porque podría darse la aparición de moho y hongos

b) Hidratación: se realizó dos y tres veces por semana. El mejor resultado lo dio la hidratación tres veces por semana. De esta forma se asegura que todos los individuos tengan acceso al agua.

7. Reproducción

a) Diferenciación sexual: Los macho de *P. australasie* se distinguen por su abdomen más fino y alargado, con genitalia externa, dorsalmente achatada. La terminalia de la hembra que es más robusta, son más anchas y tienen una placa subgenital redondeada y en forma de quilla en vista ventral. Asociada a esta placa subgenital hay una cámara genital relativamente grande en la cual se desarrolla la ooteca (Vargas 1995).

b) Ciclos reproductivos. La reproducción es sexual y los ciclos reproductivos se presentes cada vez que la hembra se encuentre receptiva para la copula. Los individuos son sexuales maduros luego de pasar por 6 o 7 mudas

c) Cópula. La cópula en las cucarachas típicamente es precedida por un comportamiento de apareamiento facilitado por feromonas sexuales. En una mezcla de compuestos volátiles es producido por las hembras vírgenes para atraer y orientar a los machos. Una vez que el comportamiento de apareamiento es iniciado en el macho, gira de la hembra, levanta las alas para exponer las glándulas tergales dorsales; la hembra se alimenta de la feromona exudada y el macho se agarra de la genitalia de la hembra. La copula se da en una posición – terminal con terminal-. Durante la hora más o menos que dura el proceso, se forma un espermatóforo el cual es pasado a la cámara genital de la hembra. Sólo como un 20% de las hembras copula nuevamente luego de este primer ciclo gonotrófico.

d) Ovoposición o viviparismo. Esta especie presenta formación de ootecas, de las cuales eclosionan de las crías. De cada una de estas estructuras pueden nacer alrededor de 20 ninfas

e) Lugar de ovoposición. Las hembras depositan las ootecas en lugares secos. Las cuales se adhieren a sustratos duros mediante una secreción blanquecina se recubre y protege la capsula. Se observo que los individuos que se mantuvieron dentro de la colección usualmente depositaban las ootecas en los cartones de huevo.

f) Desarrollo de embrión: Cada semana se revisaron las cajas de mantenimiento en busca de ootecas adheridas al cartón de huevos (Fig. 16). Estos fueron extraídos y colocados en

contenedores aparte para incubarlos. Este procedimiento se realizó cada veintidós días, sin embargo se observo que algunas de las ootecas eclosionaban antes, las ninfas se mezclaban con los adultos, por lo que resulto mejor realizar una revisión semanal

g) Emergencia de las crías: la eclosión de las ootecas ocurre entre 22 y 35 días de incubación

Fig 16. Ooteca de *Periplaneta australasie* adherida a cartón de huevo

8. ***Mantenimiento de Neonatos y crianza***

Las ninfas que eclosionaron de las ootecas se mantuvieron en cajas de plástico pequeñas, ventiladas, a temperatura ambiente, empleando cartones de huevo como sustrato, con agua y comida *ad libitum.* Las cajas se mantuvieron en un sitio oscuro, protegido de la luz. La alimentación de las crías se realizo tres veces por semana con dieta artificial elaborada a partir de comida de gato pulverizada y vitaminada con Pecutrin. Esta dieta resulto ser la más adecuada por que brinda el contenido necesario de nutrientes que potencian el crecimiento de esta especie. Adicionalmente se coloco finas rodajas de zanahoria y pedazos pequeños de chile dulce como complemento de agua.

9. ***Manipulación de individuos***

a) Manipulación y sujeción: durante el mantenimiento los individuos fueron manipulados manualmente para no ocasionar daño en sus estructuras, en especial en las ninfas.
b) Anestesia o relajación: durante los bioensayos los individuos fueron anestesiados en frio, colocándoles en la nevera por 4min a 5°C.
c) Inoculación: Durante los ensayos para determinar letalidad y parálisis media, los individuos

fueron inoculados bajo la membrana intersegmental del lado ventral entre el segundo y tercer par de patas. Se realizaron controles negativos con solución salina para insectos, en este caso el volumen inyectado fue de 20 µl. Anteriormente se realizaron pruebas con otros volúmenes varios de 50, 30 µl, sin embargo estos volumen ocasiona la muerte del animal.

Escarabajo de harina (*Tenebrio molitor*)

1. Generalidades de la especie

Aunque existen numerosas especies de escarabajos de la familia Tenebrionidae, aquellas que se constituyen plagas de granos, como *Tenebrio molitor*, son mejores para la cria en cautiverio (*Fig. 17*). La larva del escarabajo *Tenebrio molitor* (*Fig. 17*) es frecuentemente utilizada como alimento para animales en cautiverio pero pueden emplearse también como modelos para diferentes bioensayos y experimentos de comportamiento. La larva crece a medida que muda proceso que ocurre múltiples veces (9-11). Después de un período de tres meses la larva eventualmente pasa a ser pupa. El período de pupa es al menos de dos semanas, luego de ese período el escarabajo emerge de la pupa (Smith and Welch 2005). Al comienzo es de un color beige claro posteriormente se oscurece pasando por colores rojizo, café oscuro y por último negro después de dos días.

Fig 17. Tenebrio molitor. Izquierda adulto. Derecha larva

2. Adquisición de los especímenes

Los individuos que conformen el pie de cría pueden ser obtenidos de suplidores comerciales. En ciertas regiones es posible localizar pies de cría en graneros y lugares de almacenamiento de semillas.

***3.Ingreso de especímenes*.**

Los individuos colectados se separaron según su estado ontogénico (larvas, pupas o adultos) se colocaron en contenedores plásticos de 35x25x6 cm.

4. Recintos y contenedores

De acuerdo al estadio larval los individuos fueron separados en diferentes cajas plásticas de mantenimiento de 35x25x6 cm.

Larvas: se colocaron en recipientes plásticos. En el fondo del contenedor se coloca el sustrato/alimento. Los recipientes se cubrieron con una malla de mosquitero muy fina para permitir la ventilación y evitar el ingreso de otros insectos.

Pupas: Se extrajeron del recipiente donde se alojan las larvas y fueron colocados en contenedores de plástico con una capa de sustrato/alimento.

Adultos: se colocaron con el mismo sustrato que las larvas y se colocó un trozo grande de algodón para simular refugio (Fig 18).

Fig 18.Mantenimiento de escarabajos de la harina

a) Ventilación: Para ventilar los contenedores donde se alojaron los especímenes, se abrieron huecos en dos de sus lados y se colocaron mallas de tela de ½ mm de diámetro. Platos de Petri fueron empleados como recipientes para el agua y comida.
b) Sustrato: La mezcla de comida fue utilizada como sustrato (ver adelante). Se observo que los

individuos ovipositan, o sobre del sustrato. El sustrato se recambia cada 22 días

5. Parámetros abiótico

a) Temperatura: La colonia se mantuvo con una temperatura ambiente de 27 (±3) °C
b) Humedad alrededor de un 60 (±3) %.

6. *Alimentación:*

a) Planificación de alimentación: el cambio del sustrato se realizó cada 22 días. Se probaron dos tipos de dieta a) mezcla de cereales: 100 g. de afrecho, 100 g. de germen de trigo con 200 g. de avena molina. A esta mezcla se le adiciono 50 g. de soya en polvo. b) 5 partes de comida para gallina ponedora con una parte de multivitamínico Pecutrin® con biotina. Todos los ingredientes se mezclan muy bien durante 3 min. y se colocaron en recipientes herméticos y se mantuvieron en refrigeración bajo 5ºC. Ambas opciones de alimento resultaron ser adecuadas como sustrato y alimento para larvas y adultos. Sin embargo la primera opción no es económicamente sostenible en el tiempo. Para preparar 1kg de alimento a base de la opción de dieta se debe invertir el doble de dinero del que se invierte para la segunda opción. Por lo que el alimento de gallina ponedora resultó ser la mejor opción para alimentar la colección de *Tenebrio molitor.*

b) Hidratación: la hidratación se realizo cada 4 días. A los adultos se les suministro agua por medio de algodones saturados con agua, así como trozos finos de verduras (zanahoria, papa).

7. *Reproducción:*

a) Diferenciación sexual: el macho adulto mide entre 10-15 mm siendo las hembras un poco más grandes (10-18) mm. En las pupas hembras el séptimo segmento está claramente dividido verticalmente en dos, mientras que en los machos solo se muestra una apertura pequeña en medio. En los adultos la tibia del primer par de patas es curveada, mientras que en las hembras son rectas.
b) Ciclos reproductivos El ciclo de vida completo del *Tenebrio molitor* comprende cuatro fases distintas que son: Huevo – larva – pupa – escarabajo, completando todo el ciclo en aproximadamente cuatro a cinco meses. Cada hembra puede ovopositar de 500 a 1000 que eclosionan entre los 10 y 15 días. Conforme crecen efectuarán de 5 a 7 mudas. Es común observar la presencia de pieles sobre el lugar de desove, pues en esta fase las larvas se mantienen agrupadas, separándose más tarde con el crecimiento que durará aproximadamente unos 60 días,

cuando alcanzan su tamaño máximo, alrededor de 18 a 24 mm para luego pupar en forma casi inmediata.

c) Cópula: la hembra ovoposita de 500 a 1000 huevos de coloración blanca de forma ovalada, envueltos por una sustancia pegajosa que permiten la adherencia de los mismos a los materiales del sustrato.

d) Ovoposición: Las hembras realizaran la puesta de los huevos en el mismo sustrato que a su vez es el alimento. Se observó que algunas hembras también depositan los huevos dentro el algodón que se les coloco para refugio.

a) Incubación Desarrollo de embrión huevos de color blanco y de 1.5 mm se desarrollan después de 5 a 7 días

b) Emergencia de larva: La eclosión se verifica de 10 a 15 días.

8. ***Mantenimiento de neonatos y crianza***

El tamaño de las crías varía entre 1 a 2 mm las larvas pueden medir 1.6 a 2 mm teniendo un color amarillento que luego a las dos semanas empieza a oscurecerse, a las cuatro semanas tienen alrededor de 1.5 cm y en el curso de 6 a 7 semanas las larvas cambian de piel entre 9 y 12 veces hasta lograr el tamaño de larva madura de 3.5 cm

9. ***Manipulación de individuos***

a) Manipulación y sujeción: para realizar los bioensayos se utilizan larvas de (0.13 ± 0.02 g). Durante el mantenimiento los individuos fueron manipulados manualmente esto para evitar que los individuos sean maltratados.

b) Inmovilización: durante los bioensayos los individuos fueron inmovilizados manualmente y en frío a 4 ºC.

c) Inoculación: Durante los ensayos para determinar letalidad y parálisis media, los individuos fueron inoculados en el lado dorso lateral del tórax. Se realizaron controles negativos con solución salina para insectos, en este caso el volumen inyectado fue de 3 µl. Anteriormente se realizaron pruebas con otros volúmenes 20, 10, 15, 10 y 5 µl, sin embargo estos volúmenes provocan la ruptura de la membrana del cuerpo al incrementar la presión de hemolinfa y la larva muere rápidamente.

Moscas Carroñeras género *Peckia intermutans* (Sarcophagidae)

1. Generalidades e historia natural de la especie

Las moscas de la familia Sarcophagidae tienen hábitos necrófagos, depredadores y parásitos (Pape 1996), por lo que comúnmente se les encuentra dentro de la fauna que participa en la descomposición de los cadáveres de animales invertebrados y vertebrados. Generalmente son dípteros de tamaño grande, el adulto posee una expectativa de vida de larga (3 a 4 días). Son ovolarviparos es decir colocan directamente las larvas, poseen un ciclo reproductivo rápido, así como su desarrollo larval. Por lo que los hace organismos carroñeros muy competitivos (Pape et *al.* 2004). Las larvas son una fuente importante de proteínas por lo que resulta un excelente alimento vivo.

2. *Adquisición de los especímenes:*

Los adultos de *Peckia* fueron capturados directamente en campo por medio de redes entomológicas, utilizando carne en descomposición como sebo (Gonzáles 1999). Los adultos capturados se colocaron en cajas de madera con cedazo de mosquitero de 47x41x47cm y un orificio en la parte superior con una manga para depositar a los individuos capturados.

3. Ingreso de especímenes

Los especímenes adultos que fueron colectados en las trampas en campo se colocaron en una jaula de cedazo de mosquitero. Los individuos pertenecientes a otras especies de sarcophagidos o caliphoridos fueron descartados. Solamente se dejaron los individuos de *P. intermutans,* dentro de la caja y se mantuvieron solo 20 hembras y 10 machos de *P. intermutans*.

3. *Recintos y contenedores*

a) Ventilación: en el caso de los adultos se colocaron en la jaula de cedazo de mosquitero. Larvas se colocaron en cajas plásticas de tipo pecera de dimensiones rectangulares de 30 cm de largo x10 cm ancho x15 cm alto. A cada caja se le agrego 5 cm^3 de arena de rio en el fondo de la caja para permitir que los individuos puparan dentro de la arena. Así mismo cada caja fue cubierta con un trozo de malla cedazo de ½ cm de ancho. Esto para evitar la entrada de otros insectos.

b) Recipientes de agua y comida: se colocaron platos de Petri con algodón saturado con agua como para permitir la hidratación de los individuos adultos. Así mismo la comida fue colocada en platos de Petri de fondo alto. Esto para permitir que los individuos se posaron en la orilla del plato de Petri

para succionar el alimento con la probóscide

c) Sustrato: en el caso de los especímenes adultos no se utilizó ningún tipo de material como sustrato porque dificulta la limpieza del recinto, así como la extracción de los recipientes de agua y comida sucios. Además se observó que colocar algún tipo de sustrato por ejemplo cartones de huevo, limita el espacio para el vuelo dentro del recinto y la sobrevivencia de los adultos disminuye.

5. Parámetros abióticos

a) Temperatura: La temperatura adecuada para el mantenimiento de los adultos varía entre 25 ±3 ºC. La temperatura que los individuos se mantengan activos que su tasa de reproducción sea alta. Se observo una tasa de mortalidad alta a temperaturas menor de 20º C.

b) Humedad: La humedad relativa del cuarto de mantenimiento de la colonia se mantuvo entre 60-70%.

6. Alimentación

a) Planificación de alimentación:

Larvas: se suministró carne en descomposición cada 3 días por un período de una semana y media. Al término de ese lapso se retiró la carne. El trozo de carne se colocó encima de un pliego de papel aluminio y se depositó en un contenedor plástico, el cual, para evitar la entrada de otros insectos se cubrió la tapa con un trozo rectangular de tela de mosquitero fino

Pupas: durante periodo de pupa no se suministrara alimento alguno.

Adultos: se suministró una mezcla de azúcares (2 partes leche en polvo, 1de azúcar refinada y 1 de levadura de cerveza).

b) Hidratación: para los adultos se suministró trozos de algodón saturados con agua. El recambio de agua se realizó 3 veces a la semana.

7. Reproducción

Los sarcofágidos pueden reconocerse por la presencia de tres bandas negras conspicuas sobre fondo gris en el tórax, así como por la combinación de características como la presencia de dos a cuatro setas notopleurales, la coxa posterior con setas sobre la superficie posterior y arista comúnmente plumosa. Las hembras son vivíparas u ovovivíparas, depositando larvas vivas de primer instar.

a) Diferenciación sexual: Los individuos de *P. intermutans* machos presentan características distintivas con respecto a las hembras, estas son notoriamente difíciles de identificar como muchas otras especies de sarcophagidos. Sin embargo características en su genitalia pueden ayudar a identificar esta especie.

b) Ciclos reproductivos: Esta especie de díptero es conocida como una especie pionera en sitios urbano-rurales. Su ciclo reproductivo se encuentra relacionado a la disponibilidad de sitios para depositar las larvas (animales muertos o tejidos expuestos en descomposición).

c) Frecuencia: La hembra puede depositar las larvas 48 horas después de la cópula. Luego de este período la hembra puede copular con otros machos.

d) Cópula: El cortejo se realiza durante el vuelo. En la copula la hembra se posa en sitios oscuros o sobre hojas de arbustos, el macho se posa sobre la hembra e inserta su genitalia por alrededor de 4 min. Luego la hembra alza el vuelo.

e) Parámetros abióticos para reproducción: las hembras de *P. intermutans* poseen picos de actividad para depositar las larvas sobre tejidos en descomposición, el lapso varía entre las 10 am a 2 pm. El pico más alto es alrededor de las 11 am. Las hembras de esta especie evitan depositar las larvas durante la noche, las bajas temperaturas no les son favorables.

f) Lugar de ovoposición: para permitir la puesta de larvas se colocaron trozos de carne de res con dos días de descomposición. La carne se colocó en cajas de plástico. Se ofreció a los individuos adultos durante la mañana (de las 9 a las 14 horas) luego de este período la carne fue retirada. Posteriormente la carne fue colocada sobre un trozo de papel aluminio y se mantuvo dentro de la caja de plástico, la cual se cubrió con una malla fina para evitar la entrada de otros insectos.

g) Desarrollo de embrión: las hembras depositan las larvas sobre tejidos en descomposición, estas inmediatamente comienzan a alimentarse y a crecer. La tasa de crecimiento se relacionada al disponibilidad de carne o tejidos en descomposición. Esta parte del ciclo de vida de la larva dura alrededor de 4 a 5 días. Luego de esto la larva se entierra en arena de rio para pasar a estadio de pupa. El estadio de pupa dura alrededor de 10 días, luego de esto emerge el adulto.

Fig 19 Peckia intermutans. Derecha a izquierda larva pupa y adulto

8. ***Manipulación de individuos:***

a) Manipulación y sujeción: para realizar los bioensayos se utilizan larvas de (0.25±0.03 g). Durante el mantenimiento los individuos fueron manipulados manualmente esto para evitar que las larvas sean dañadas.

b) Anestesia o relajación: durante los bioensayos los individuos fueron inmovilizados manualmente y en frio. Sin embargo los individuos que se inmovilizaron en frio murieron durante la inoculación, por lo que el mejor método resulto ser la manipulación manual cuidadosamente

c) Inoculación: Durante los ensayos para determinar letalidad y parálisis media, los individuos fueron inoculados en el lado dorsolateral del tórax. Se realizaron controles negativos con solución salina para insectos, en este caso el volumen inyectado fue de 5 µl. Anteriormente se realizaron pruebas con otros volúmenes 20 10 15 10 µl, sin embargo estos volúmenes provocan la ruptura de la membrana del cuerpo al incrementar la presión de hemolinfa.

Conclusiones Generales

El mantenimiento de colecciones vivas debe realizarse de forma tal que se optimice tiempo y esfuerzo, asegurándose que las condiciones en las cuales se mantienen los animales sean las más óptimas para cada especie dentro de la colección. Es importante la eliminación de cualquier plaga dentro de las colecciones, sobre todo cuidar los pies de cría para salvaguardar el acervo genético de la población.

Así también es importante llevar un adecuado registro de datos cuantitativos y cualitativos que permitan un control de la biología de cada una de las colecciones. Esto contribuye al conocimiento mas preciso de datos tales picos de reproducción, tasas de mortalidad, lo cual permite una mejor planificación para realizar múltiples bioensayos.

Rerefencias

Boyer, S. and C. Rivault. 2004. Interspecific competition among urban cockroach species. Entomologia Experimentalis et Applicata113:15–23.

Davenport, C. Arb reptiles. 2013. Estados Unidos Americanos (U.S.A.).Breeding the common house cricket. [en línea]: http://www.arbreptiles.com/bugs/crix.shtml(consulta- Enero 2013).

Gariba, R. 2007. Zootecnia del Grillo. Tesis de Grado para Medico veterinario zootecnista Universidad Michoacana de San Nicolas Hidalgo. Morelia, Michoacán 36pp.

Gonzáles, R. 1999.Estudio del desarrollo larva en una especie pionera *Peckia intermutans* (Diptera: Sarcophagidae) asociado a la determinación del tiempo post mortem. San José, Costa Rica : V Congreso Nacional de Entomología p. 144.

Hallet, I. 1995. Breeding and Raising the House Cricket *Acheta domestic*. http://www. Breeding and Raising the House Cricket.html

Nakagaki, B. J and G.R. Dbfoliart. 1991. Comparison of Diets for Mass-Rearing Acheta domesticus (Orthoptera: Gryllidae) as a Novelty Food and Comparison of Food Conversion Efficiency with Values Reported for Livestock. J. Econ. Entomol. 84: 891-896.

Pérez, O.J. Rodríguez, J. A. Bisset , M. Leyva., M. Díaz, O. Fuentes.,F. Ramos, R.González y I. García.2004. Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios. Ciudad de La Habana, Editorial Ciencias Médicas.59p

Polis, G. and W., Sissom 1990.Life history. The Biology of scorpions. Stanford University California.California.EE.UU.

Ponce, G., P. C. Cantú., A. Flores, M. Badii, A. Barragán, R. Zapata e I. Fernández.2005. Cucarachas: Biología e importancia en salud pública. Revista salud pública y nutrición. 6:1-3.

Pape.T.1996. Catalogue of the Sarcophagidae of the World (Insecta: Memoirs on Entomology International. 8: 1 – 72.

Pape, T., M, Wolff. y E. Amat. 2004. Los califóridos, oéstridos, rinofóridos y sarcofágidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. Biota Colombiana. 5:201-208.

Smith, M. J. and A. M. Welch. 2005. Manual for Rearing Crickets, Flies and Mealworms University of Missouri – Columbia.8p

Szelei, J., J. Woodring, M.S. Goettel, G. Duke, F.-X. Jousset, K.Y. Liu, Z. Zadori,Y.Li, E. Styer, D.G. Boucias , R.G. Kleespies, M. Bergoi, P. Tijssen. 2011. Susceptibility of North-American and European crickets to Acheta domesticus densovirus (AdDNV) and associated epizootic. Journal of Invertebrate Pathology 106: 394–399.

Vargas, M. 1995. La cucaracha un curioso insecto (Dictyoptera:Blattaria).Editorial de la universidad de Costa Rica. 90p

Villanueva, O., R. Hernández. 2004. Manual en la ciencia de los animales de laboratorio. Instituto Nacional de ciencias médicas y nutrición Salvador Zubiran. México.

Víquez, C. 1999.Escorpiones de Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Santo Domingo, Heredia. 84 pp.

CAPITULO 2

Efectos biológicos del veneno de tres especies de escorpiones del género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) sobre presas modelo

Resumen

El veneno en los escorpiones es una mezcla variada de componentes que incluye elementos proteicos y no proteicos. Los componentes proteicos son en mayor medida los que desencadenan cuadros patológicos que pueden desembocar en la muerte del organismo. El efecto de los componentes tóxicos de los venenos es diferenciado según sea la presa. En este trabajo se evaluó la variación en letalidad y capacidad de parálisis de tres venenos de especies de escorpiones del género *Centruroides (C.edwarsii, C.limbatus y C.bicolor)* en presas que pudieran modelar potenciales presas y/o depredadores. Se utilizaron cinco especies de insectos (*Acheta assimilis*, *Acheta domesticus*, *Periplaneta australasie*, *Tenebrio molior* y *Peckia intermutans*), una especie de lagartija *Hemidactilus frenatus* y un ratón (*Mus musculus*). Los resultados obtenidos muestran que las tres especies de escorpiones poseen venenos que difieren en letalidad y capacidad de parálisis. Aunque en los modelos artrópodos y en el caso de *H. frenatus* los ensayos permitieron determinar letalidad, las tres especies de escorpión evaluadas mostraron venenos no letales para el modelo murino. De los análisis de letalidad media (DL_{50}) *C. bicolor* presenta el veneno más letal para *Acheta domesticus*. Esta especie de grillo parece ser el modelo presa más sensible a los tres venenos. Sin embargo, se observan diferencias en cuanto a sensibilida de modelos presa entre los diferentes venenos. Al realizar comparaciones de toxicidad en términos de letalidad media (DL_{50}) entre modelos presa para cada uno de los venenos, se obtiene para *C. edwarsii, que A. domesticus* es la especie más susceptible y *P. australasie* la más resistente. Con respecto al veneno de *C. bicolor* y *C. limbatus* la especie más susceptible es *Acheta domesticus* y la más resistente es *T. molitor*. Los efectos de parálisis de los tres venenos varían dependiendo de la presa. Los resultados se discuten en términos de la capacidad de los venenos para causar efectos letales, o parálisis en los modelos presa evaluados. Se observó que las diferencias en susceptibilidad (o contrariamente, resistencia) parecen asociarse a aspectos inherentes a la especie, aquellas que son más susceptibles a un tipo de veneno suelen serlo igualmente a otros, por tanto el veneno podría verse como una herramienta útil que le permite al escorpión proveerse de presas. Sin embargo otras estrategias podrían operar a la hora de subyugarlas.

Palabras clave

Letalidad media, veneno escorpión, modelo presa, *Centruroides edwarsii, C. limbatus, C. bicolor*

1. Introducción

El veneno en los escorpiones es una mezcla de componentes biológicamente activos, producido en glándulas ubicadas en el telsón (De Lima et *al.* 2007). Dentro de sus principales funciones están paralizar, capturar, y digerir presas así como defenderse y disuadir depredadores (Inceoglu et *al*. 2003, Bosmans y Tytgat 2007, De Lima et *al.* 2007, Miyashita et *al.* 2010).

Dentro de los componentes que integran el veneno hay péptidos y proteínas de bajo peso molecular entre los 2 y 40 kiloDaltons (kD) (Zlotkin et *al.* 1978; Yahel-Niv y Zlotkin 1979), además de componentes no protéicos que suelen estar en cantidades menores (mucopolisacáridos, nucleótidos, lípidos, mucoproteínas (De Lima et *al.* 2007). Sin embargo, los componentes proteicos son los que presentan la mayor actividad biológica (Borges et *al*. 2004). Su efecto inmediato causa la prolongación de los potenciales de acción, debido a una masiva y recurrente despolarización de la membrana axónica y de otros tejidos excitables. Durante el envenenamiento, se alteran los mecanismos de permeabilidad iónica fundamentales para la homeostasis celular (Barona et *al.* 2005, De Sousa et *al.* 2009); con la consecuente aparición de reacciones orgánicas como sobreexcitación, alteración en la frecuencia cardíaca o respiratoria, dolor y posterior parálisis. Estos efectos actúan como adaptaciones para impedir el ataque de potenciales depredadores (defensa) o el escape de presas (alimentación). En general, las intoxicaciones con venenos de escorpiones en humanos producen dolor, adormecimiento e inflamación de la zona afectada. Se reporta en modelos mamíferos (ratas, conejos, conejillos de indias) disfunción de los sistemas cardiovascular, respiratorio, nervioso e inflamatorio que puede conducir a falla multiorgánica (Mazzei et *al.* 2002).

El veneno de los escorpiones puede ejercer efectos biológicos de forma diferencial en las presas, según sea la resistencia a sus componentes tóxicos. Las neurotoxinas exhiben secuencias de aminoácidos homólogas, sin embargo la mayoría de ellas actúan selectivamente en diferentes grupos taxonómicos (Hassani et *al.* 1999). Por ejemplo, Possani et *al.* (1999) e Inceoglu et *al.* (2001) señalan que –en general– el veneno de los escorpiones presenta toxicidad diferencial en mamíferos y artrópodos. Otros trabajos evidencian la selectividad de las toxinas específicas sobre sus dianas (Zlotkin et *al.*1972, 1975 (crustáceos); Zlotkin et *al.* 1971 a, b (insectos), D´ Suze et *al.* 2004 (mamíferos).

Aunque existen algunos estudios que versan acerca de cómo el veneno de escorpión actúa sobre presas tanto reptiles como mamíferos (Castilla et *al*. 2009, Rowe y Rowe 2009) e invertebrados (Inceolgu et al. 2003), la mayoría de los estudios evalúan los efectos en modelos murinos (Krifi et *al*. 1998, Nasar et *al*. 2009, De Sousa et *al*. 2009), con una clara tendencia a modelar las patologías que se observan en humanos durante los envenenamientos.

Sin embargo, conocer las relaciones entre depredadores venenosos y sus presas es clave en el entendimiento de la especificidad del veneno y dilucidar cómo los depredadores influyen en la dinámica poblacional de las presas. Así mismo el análisis de la composición del veneno a nivel molecular o bioquímico provee evidencia de adaptación, sin embargo el significado funcional de esa adaptación no se conoce en detalle. Por lo que en última instancia esto, sólo puede ser evaluado si se mide el efecto del veneno sobre presas y depredadores naturales (Barlow et *al*. 2009).

Modelos presa han sido utilizados para investigar el significado adaptativo de la variación ontogénica del veneno en serpientes (Richards *al*. 2012). El efecto del veneno sobre presas conocidas permite entender el significado adaptativo del veneno, estas adaptaciones pueden a su vez explicar variaciones ontogénicas e interespecíficas de los componentes del veneno (Mackessy et *al.* 2003). En el caso particular de escorpiones, variaciones intraespecíficas del veneno pueden estar relacionadas con variaciones geográficas en la dieta, lo cual puede contribuir a variaciones en los componentes del veneno que podrían operar de modo paralelo con otros factores determinados por interacciones con las presas locales (Abdel-Rahman et *al.* 2009).

Pocos son los trabajos que describen los efectos biológicos de venenos de escorpiones en presas o modelos presa de forma integral (De Dianous et *al.* 1987 Mazzoli-Palma et *al.* 2003). En su mayoría, estos estudios emplean solo una o unas pocas especies presa, adicionado el modelo murino, lo que dificulta la extrapolación a otros organismos diana. Entender los efectos en diferentes modelos presa puede ayudar a dilucidar aspectos de la biología de los escorpiones: hábitos de cacería, preferencia de presas, rangos de hogar y distribución. Así también podría ayudar a comprender el contexto en el que evolucionan sus venenos.

El género *Centruroides* (Marx, 1890) es uno de los más diversos y de más amplia distribución geográfica en el continente americano, así como el de mayor importancia médico-sanitaria en Norte y Centro América, debido a la toxicidad de algunas de sus especies, entre ellas *C.noxius, C.suffusus, C.limpidus, C.exilicauda* (Armas y Martín-Frías 2008). En Centroamérica, se reportan diez especies de este género, cinco de las cuales existen en Costa Rica (Víquez 1999). Aunque la toxicidad de las

especies costarricenses es desconocida, las intoxicaciones por escorpiones en el país corresponden mayoritariamente a casos leves (Rivera 2003). Las especies más abundantes en el país son *C. edwarsii (C. margaritatus),* distribuída en la Meseta central y Guanacaste*; C. limbatus* distribuída en toda la vertiente del Caribe y Pacifico sur *y C. bicolor,* que se encuentra en la Vertiente Pacífico sur (Víquez 1999).

Con el fin de evaluar la variación en letalidad y capacidad de parálisis, se realizaron pruebas de potencia (dosis letales) con venenos de escorpiones del género *Centruroides* en modelos diana que pudieran modelar potenciales presas y/o depredadores. La tres especies de escorpiones son filogenéticamente cercanas (*C.edwarsii, C.limbatus y C.bicolor*) se espera que los efectos de los veneno en términos de letalidad y capacidad de parálisis presenten un patrón similar.

2. Materiales y métodos

Los escorpiones fueron colectados según su distribución geográfica en Costa Rica: *Centruroides edwarsii* Pacífico Norte: Parque Nacional Palo Verde 10°20'41.50"N 85°20'20.90"W, Parque Nacional Santa Rosa 10°50'2.75"N, 85°36'45.32"W. *Centruroides limbatus:* Estación Biológica La Selva Sarapiquí *10°25'55.83"N 84° 0'21.64"W y* Parque Nacional Hitoy Cerere, *Centruroides bicolor* Pacífico sur Playa Piro 8°23'14.29"N 83°17'7.11"W. Los individuos se trasladaron al laboratorio para posterior extracción de veneno. Los ejemplares se ingresaron, depositaron y catalogaron dentro de la colección viva del Instituto Clodomiro Picado, en la Finca Experimental Santa Ana de la Universidad de Costa Rica.

2.1 Obtención del veneno

El veneno fue obtenido mediante, electroestimulación del V segmento del metasoma (=telson). El segmento fue colocado entre dos electrodos donde se aplicó una descarga aproximada de 0.7 a 0.8 milivoltios y recolectado mediante capilares y depositado en tubos Ependorf de 1.5ml. El veneno se preparó en mezclas según la especie. Los venenos fueron almacenados bajo -70°C por 24h, posteriormente liofilizados. Las muestras de cada veneno congeladas y secas fueron almacenado a-20 °C hasta su utilización. El veneno fue resuspensido en solución salina para insectos (en mM: 154 NaCl, 2.68KCl, 2.25 CaCl2. pH=6.85) (Friedel y Nentwing 1989).

2.2 Especies modelo

La escogencia de cada una de las presas modelo no es aleatoria, obedece a la experiencia en el trabajo previo del mantenimiento de colecciones vivas de escorpiones. Los hábitos alimenticios de los escorpiones marcan una clara tendencia a ser generalistas sin embargo, en condiciones de cautiverio se puede modelar la diversidad de presas consumidas empleando modelos. Se determinó la letalidad en los siguientes modelos presa (media± desviación estándar del peso). Artrópodos: ninfas de (Ortoptera) *Acheta assimilis* (0.40±0.05g) *y Acheta domesticus* (0.30±0.04g) del sétimo instar; individuos adultos de (Blattaria) *Periplaneta australasie* (1.0 ±0.5g); larvas del último instar de (Coleoptera) *Tenebrio molitor* (0.13 ± 0.02g); y larvas de *Peckia intermutants* (Diptera) de 4 días de edad (0.25±0.03g). Todos los especímenes empleados en los bioensayos se obtuvieron del criadero (vivario) establecido en la Finca experimental Santa Ana de la Universidad de Costa Rica, criados y mantenidos con dietas artificiales. Entre los vertebrados, se empleó ratones CD-1 (10.00±2.00 g) y lagartijas *Hemidactylus frenatus*, la dosis fue ajustada según el peso (1.00-4.00g).

En este estudio se emplearon cuatro diferentes órdenes de insectos (Ortoptera, Blattaria, Coleoptera y díptera). Algunos reptiles representan posibles depredadores, tal es el caso especies de lagartijas gecónidos como *Hemidactylus frenatus* procedente de África y Asia que han invadido muchos nichos urbanos-rurales. Además, es conocido que *C. limbatus y C. edwarsi* consumen algunas especies de lagartijas del género *Anolis* de forma natural (observación personal), y que pueden capturar y consumir *H. frenatus* en lugares donde este ha sido introducido (Fig. 1 Apéndice). Esto hace que esta especie sea un interesante modelo para evaluar la toxicidad del veneno de especies de escorpiones. Por último el empleo del modelo murino permite comparar y clarificar aún más la especificidad de venenos de escorpiones sobre determinados organismos, sea invertebrados o vertebrados; así como extrapolar posibles efectos de estos venenos en vertebrados superiores.

2.3 Bioensayos

Para cada especie modelo, individuos previamente pesados (al 0.01g más próximo) fueron seleccionados aleatoriamente para formar los grupos homogéneos que fueron inoculados con las distintas dosis de veneno. Se realizaron dos réplicas de cada ensayo. Para los modelos se determinó la letalidad media (DL_{50}) y letalidad al noventa y cinco (DL_{95}) a las 24h posterior a la inyección del veneno. El porcentaje de animales paralizados fue determinado a las 3, 6 y 12 horas posteriores a la

inoculación de veneno. La parálisis fue definida como la incapacidad del individuo para regresar a su posición ventral. Sin embargo persiste el movimiento de apéndices cuando se aplica un estímulo táctil. En el caso de modelos en estado larval (*T. molitor* y *P. intermutans*) la parálisis se evidencia por retraimiento de la cutícula y ausencia de movilidad. El cuadro 1 muestra los síntomas escogidos como criterio de toxicidad para cada uno de los modelos presa.

2.3 Inyección

Las inyecciones dentro de los artrópodos se realizaron utilizando jeringas de vidrio Hamilton® de 10 y 50µl. Los puntos de inyección dependen de las especies utilizadas: membrana intersegmental del lado ventral (*A.assimilis, A.domesticus, P.australasiae*). *T.molitor y P.intermutans* lado dorsolateral del tórax. Todas las dosis de veneno fueron disueltas en solución salina para insectos (Friedel y Nentwing 1989). La toxicidad en lagartija (*Hemidactylus frenatus)* fue determinada por inyecciones intraperitoneales de diferentes dosis de veneno crudo. En el modelo murino el inóculo del veneno fue administrado vía intraperitoneal.

2.4 Análisis Estadístico

Para determinar letalidad del veneno, se estimó la DL_{50} y DL_{95} mediante el método de Probitos (Finney 1971). Para probar el ajuste de los datos al modelo se empleó la prueba de bondad de ajuste de Chi^2. Se comparó la toxicidad relativa de cada veneno (o entre pares de presas), se evaluó el intervalo de confianza (95%) de la razón entre estimados de letalidad pareados, utilizando el programa Polo Plus® Versión 2.0 (LeOra Software, Robertson et *al*. 2007). Este intervalo se calcula a partir de los estimados de intercepción y pendientes de los modelos de probitos así como de la matriz de variancia-covariancias (Payton et *al*. 2003). Si el intervalo de confianza de la razón de dos estimados de letalidad incluye el 1, entonces las DLs no son significativamente diferentes (Robertson et *al*. 2007). La determinación de la razón es un método de comparación potente para el análisis del traslape de intervalos de confianza (Payton et *al*. 2003).

Cuadro 1. Sintomatología mostrados por los diferentes modelos de presa durante los periodos de observación (3, 6,12h) post inyección de determinadas dosis del veneno de tres especies de Escorpión del género *Centruroides*.

	Modelo Presa invertebrado					Modelo Presa vertebrado	
Síntomas	*A. domesticus*	*A. assimilis*	*P. australasie*	*T.molitor*	*P. intermutans*	*H. frenatus*	*Mus musculus*
Incapacidad para caminar	X	X	X				
Perdida de Balance	X	X	X			X	X
Tendencia a volverse sobe el lado dorsal	X	X	X				
Movimientos espasmódicos apéndices abdomen	X	X	X		X	X	X
Ataxia						X	X
Sobreexcitación	X	X	X	X		X	X
Rigidez corporal						X	X
Movimientos espasmódicos de patas traseras							X
Flacidez				X	X		
Incremento salivación							X
Pilo erección							X
Defecación						X	X

3. Resultados

Todos los controles de cada una de las especies diana se mantuvieron vivas después de las 24h posteriores a la inyección de solución salina. Aunque en los modelos artrópodos y en el caso de *H. frenatus* nuestros ensayos permitieron determinar letalidad, en el modelo murino solo se determinaron efectos subletales del veneno de *C. edwarsi.* Para todas las especies modelo sin embargo, se muestran efectos que indican diferencias importantes tanto entre venenos como en especies diana.

3.1 Efectos del veneno de *Centruroides edwarsii*

La capacidad de parálisis del veneno de *C. edwarsii* en términos del porcentaje de individuos paralizados luego de 3, 6 y 12 horas posteriores a la inoculación del veneno se muestran en la Figura 1. La acción de este veneno sobre individuos *A. assimilis* evidencia claros signos de toxicidad. La dosis mínima que causo parálisis fue 163µg/g (Figura 1A). Los individuos afectados presentan una primera fase caracterizada por una excesiva actividad motora. Este comportamiento se presenta durante los primeros 10 minutos posteriores a la inoculación. Se observó que algunos individuos recuperan su movilidad normal, mientras que otros permanecieron inmóviles. La inoculación del veneno de *C. edwardsii* sobre *Acheta domesticus* con lleva una fase excitatoria: los individuos saltan de forma errática entro de la caja de observación durante al menos 1min, luego la actividad locomotora decrece, se observan contracciones espásmicas del abdomen e incapacidad para retornar a la posición ventral. La dosis mínima que causa parálisis es de 7 µg/g (Figura 1.B). Se observó además que a diferencia de los bioensayos realizados en *A. assimilis*, en *A. domesticus* los signos de toxicidad se registraron a dosis menores.

Los individuos de *P. austalasie* mostraron gran resistencia al inóculo del veneno de *C. edwarsii*. La dosis mínima que cauda la parálisis fue de 381µg/g. Los síntomas de intoxicación observados fueron: pérdida balance, movimientos erráticos, dificultad para regresar a la posición ventral. Luego de aplicar una dosis de 571.43µg/g o más el porcentaje de individuos paralizados tiende a ser cercano al 100% (Figura 1C).

Para el caso de *T. molitor y Peckia intermutans* es notorio resaltar que *T. molitor* es el modelo que presenta la mayor resistencia al inóculo del veneno de *C. edwarsii* con respecto a los demás modelos. La dosis mínima que causo la parálisis fue 5 veces mayor a la inoculada en *P. intermutans* (Figura 1E). En el caso de *P. intermutans* se observó patrones de reversión de parálisis en el tiempo. Al inyectar dosis de 95.04 µg/g, 3 h después se observó que un 67% de los individuos inoculados presentaron parálisis, sin embargo durante los registro de 6 y 12 h solo el 50% de los individuos se encontraron paralizados (Figura 1D). El signo más notorio de intoxicación observado tanto en *T.molitor* como en *P. intermutans* fue la flacidez del cuerpo.

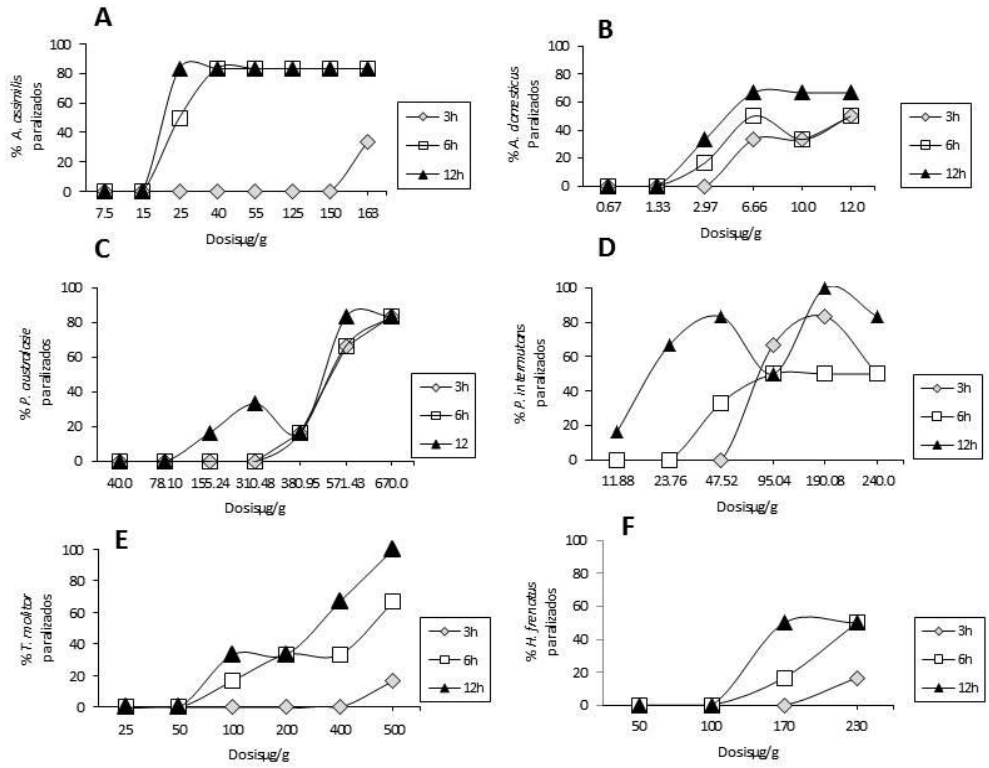


Fig 1. Capacidad de parálisis del veneno de *Centruroides edwarsii* sobre modelo presa. La parálisis se expresa como el porcentaje de individuos incapaces de desplazarse pero si muestran movimientos de apéndices al estimulo mecánico. Los rombos grises, cuadros blancos y triángulos negros representan la parálisis luego de 3, 6, y 12 horas posteriores a la inoculación del veneno respectivamente.

En el caso de la lagartija la dosis mínima de parálisis fue de 230µg/g. A esta dosis solo el 25% de los individuos presentaron parálisis. Los síntomas de toxicidad van desde ataxia, perdida de balance coropral, movimientos descoordinados de patas y cuerpo. Se observo un comportamiento distintivo al inocular la dosis mínima de parálisis: inmediatamente aplicada la dosis todos los individuos se voltearon para morderse justo en el sitio donde fueron inoculados.

En el caso del modelo murino a pesar de que no se logró determinar cuantitativamente letalidad media, si se observaron signos evidentes de envenenamiento. La inoculación de 10.85 µg/g causa una fase de excitación del individuo. Se observo como el individuo lamia repetidas veces la zona del inoculo, por lo que esto podría ser un indicativo de molestia o dolor. Dosis de 21.85 µg/g causan alteración de la actividad motora y dificultad para respirar. Se incrementa la salivación y la frecuencia

respiratoria disminuye. La fase de ataxia que se prolonga por al menos 20 min luego de este período el individuo logra recuperarse.

3.2 Efectos del veneno de *Centruroides bicolor*

Las dos especies de grillo del genero *Acheta* estudiadas muestran gran sensibilidad al veneno de *C. bicolor*. Los primeros signos de toxicidad son visibles al inocular dosis de 7.50 y 2.97 µg/g respectivamente. La sintomatología producto del inoculo del veneno de *C. bicolor* en estos dos modelos muestran una similitud con el veneno de *C. edwarsii*. Se destaca un comportamiento de sobrexcitación (saltos repentinos, movimientos espasmódicos) seguido de fases de relajación.

El veneno de *C. bicolor* sobre *P.australasie* no produjo la parálisis de los individuos posterior a las 3 h (Figura 2C). Dosis de 19 µg/g causaron el siguiente comportamiento: los individuos corrían de un extremo al otro de la caja de observación durante períodos de 50s aproximadamente. Luego de esto se observo un comportamiento de hidratación, precedido por lapsos de 5min de inmovilidad y de movimientos espasmódicos del abdomen. A esa concentración al estimular los de forma mecánica, hubo respuesta positiva

La larva de coleóptero *Tenebrio molitor* resulto ser muy resistente al veneno de *C. bicolor.* La dosis mínima de parálisis fue de 600 µg/g. Los signos de toxicidad observados fueron movimientos giratorios por al menos 5s, luego. Este comportamiento se repitió al menos 5 veces durante los primeros 15 min posteriores a la inoculación de las dosis más altas (600 y 700 µg/g). Posterior a este comportamiento el espécimen permanecía inmóvil y flácido.

La acción del veneno sobre la larva de la mosca *P. intermutans* provoco un comportamiento de contracción inmediata del cuerpo de la larva en todas las dosis evaluadas. Este comportamiento no fue revertido al inocular dosis de 29 y 43 µg/g, donde el 33% de los individuos que fueron inoculados presentaron parálisis luego de 3h posteriores a la inoculación (Figura 2.D).

Durante el bioensayo con el veneno de *C. bicolor* en *H. frenatus*, la lagartija tuvo un comportamiento similar al presentado con el inoculo de *C. edwarsii,* este tendía a morderse la zona inyectada. Así mismo se observo que el inoculo de este veneno causo que algunos de los individuos incrementaran su actividad locomotora, y realizaran repetidos giros sobre el cuerpo. Posterior a las 3 h del la inyección la parálisis no se evidencio.(Figura 2 F). La parálisis es acompañada de movimientos ocasionales de cola. Los individuos muertos a las 24 horas presentaban las orbitas de los ojos hundidos y la mitad de la lengua afuera, síntomas asociados a deficiencia respiratoria.

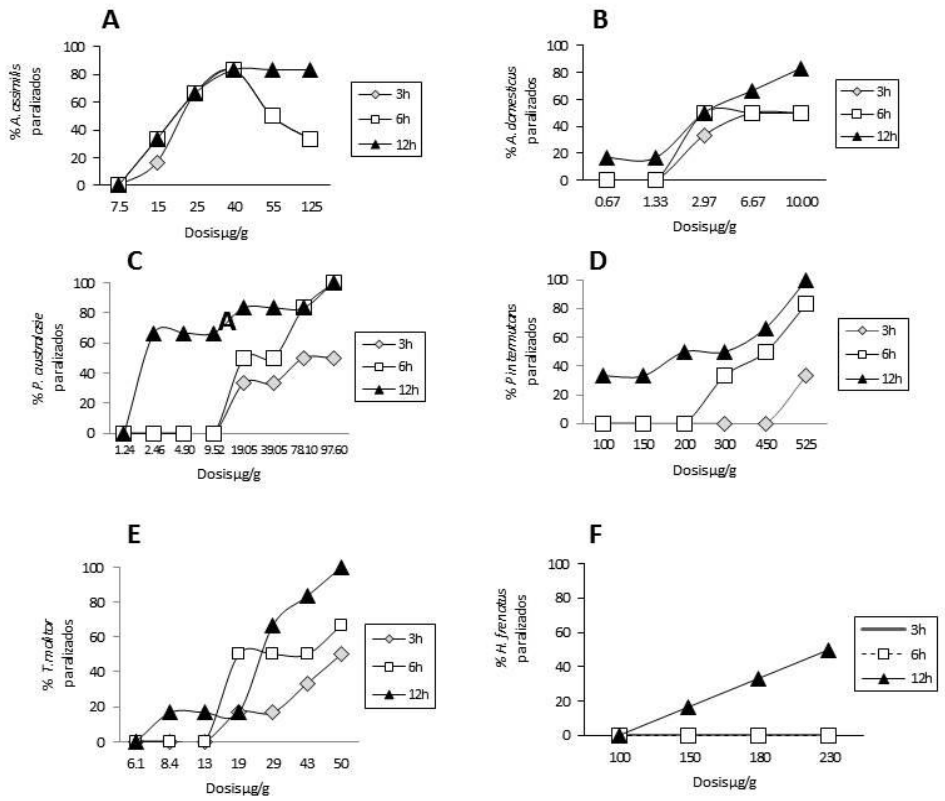


Fig 2. Capacidad de parálisis del veneno de *Centruroides bicolor* sobre modelo presa. La parálisis se expresa como el porcentaje de individuos incapaces de desplazarse pero si muestran movimientos de apéndices al estimulo mecánico. Los rombos grises, cuadros blancos y triángulos negros representan la parálisis luego de 3, 6, y 12 horas posteriores a la inoculación del veneno respectivamente. Las figuras (A-E) representan cinco especies de modelos presa invertebrados y un vertebrado (F).

3.3 Efectos del veneno de *Centruroides limbatus*

Los efectos de toxicidad producto de la inoculación del veneno de *C. limbatus* en dos especies de grillo (*Acheta assimilis* y *Acheta domesticus*) son más evidentes para *A. domesticus*. La dosis mínima de parálisis para ambos modelos fue de 15 y 3 µg/g respectivamente (Fig 3 A). Los signos de toxicidad fueron los siguientes: incapacidad para voltearse, repetidos movimientos circulares de apéndices (antenas y tercer par de patas). Esta conducta se repitió por al menos 4 veces. Luego de esto se observo que los individuos lograban recuperarse. Ocasionalmente los individuos se hidrataban y alimentaban.

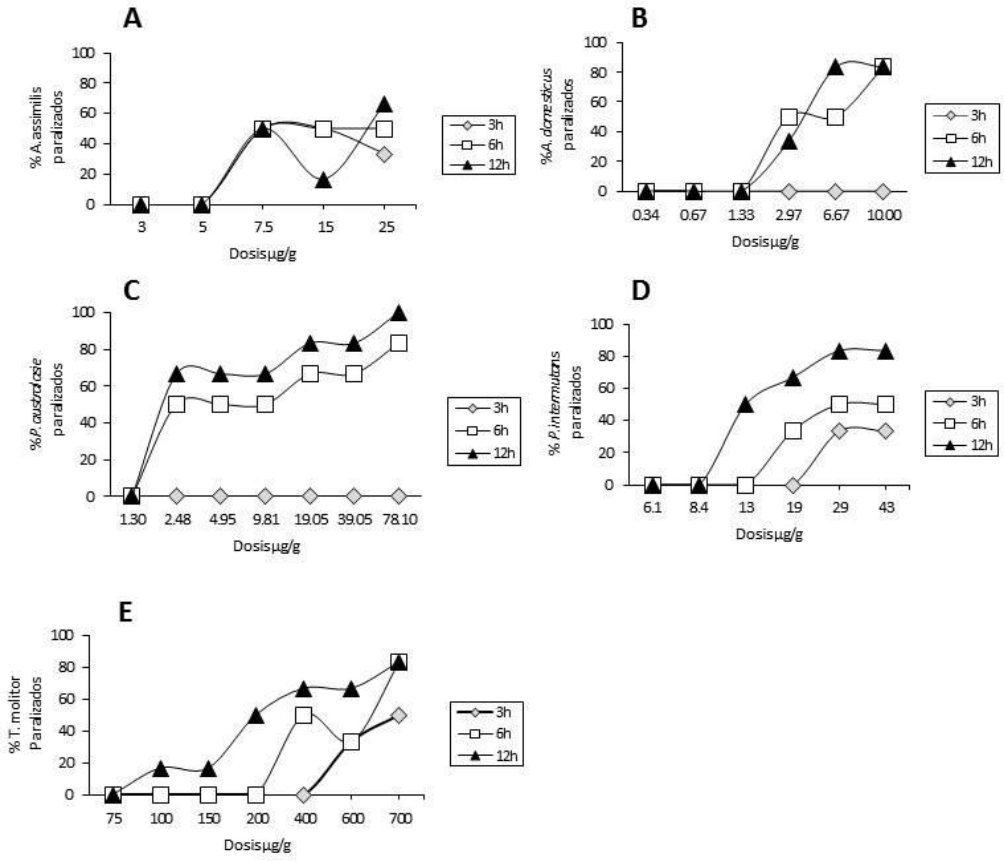


Fig 3. Capacidad de parálisis del veneno de *Centruroides limbatus* sobre modelo presa. La parálisis se expresa como el porcentaje de individuos incapaces de desplazarse pero si muestran movimientos de apéndices al estimulo mecánico. Los rombos grises, cuadros blancos y triángulos negros representan la parálisis luego de 3, 6, y 12 horas posteriores a la inoculación del veneno respectivamente. Las figuras (A-E) representan cinco especies de modelos presa invertebrados.

El veneno de *C. limbatus* sobre *P. australasie* posee una gran capacidad de parálisis. El efecto se incrementa con el tiempo y la dosis. La dosis mínima de parálisis fue de de 19 µg/g. Esta dosis causa que el 50% de individuos se paralice, el porcentaje se incrementa a un 100% luego de 6 horas. Los síntomas de toxicidad en este modelo van desde actividad locomotora excesiva, tendencia a voltearse sobre el costado movimiento erráticos de apéndices, en especial tercer par de patas. Los individuos que no presentan este comportamiento tienen a quedarse quietos en un mismo punto por al menos 60s, al ser estimulados mecánicamente responden positivamente y realizar movimientos rápidos de apéndices (patas y antenas) por al menos 15s, luego de eso el animal queda paralizado. Al comparar *P. intermutans con T. molitor*, la larva del díptero es notablemente más susceptible. La especie de

coleóptero puede resistir la inoculación de dosis de 500 µg/g sin presentar ningún efecto de parálisis o toxicidad.

Para efectos de este trabajo no se logró evaluar el efecto del veneno de *C. limbatus* sobre *H. frenatus* debido la cantidad de veneno no fue suficiente para realizar el bioensayo, sin embargo se está trabajando para conseguir el veneno requerido para realizar la prueba y completar los datos para la publicación de este manuscrito.

Letalidad

Los resultados de los ensayos de letalidad (DL_{50} y DL_{95}) del veneno de las especies de *Centruroides* sobre diferentes presas modelo con sus respectivos límites de confianza al 95% se muestran en el Cuadro 2. Los venenos que presentan los valores generales de letalidad media más bajos son respectivamente *C. bicolo*r 1.62 (0.93-2.78) µg/g, seguido de *C. edwarsii* 3.56 (2.08-5.52) µg/g y por último *C. limbatu*s 4.25 (2.28-10.61 µg/g). Al realizar comparaciones de la toxicidad en términos de letalidad media (DL50) entre modelos presa para cada uno de los venenos por, se obtuvo que para *C. edwarsii, A. domesticus* es la especie más susceptible y *P. australasie* es la más resistente. Con respecto al veneno de *C. bicolor* y *C. limbatus* la especie más susceptible es *Acheta domesticus* y la más resistente es *T. molitor* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valor de Toxicidad (DL50, expresado en µg/g) del veneno de tres especies de escorpiones costarricenses del genero *Centruroides.* Los datos entre paréntesis corresponden a los límites de confianza al 95%.

	A. assimilis	*A. domesticus*	*P. australasie*	*T. molitor*	*P. intermutans*	*H. frenatus*
C. edwarsii	LD50=47 (26.32-84.12) LD95=27.57 (140.57-167.38)	LD50=3.56 (2.08-5.52) LD95=10.88 (6.96-33.63)	LD50=212.63 (114.06-351.24) DL95=950.92 (534.38-4752)	LD50=147.48 (86.92-236.1) LD95=465 (289-1695.70)	LD50=97.5 (59.59-174.86) LD95=307.18 (185.62-1458.75)	DL50= 124.34 (68.46-200.26)
C. bicolor	LD50=9.11 (5.45-17.16) LD95=26.45 (15.77-152.91)	LD50=1.62 (0.93-2.78) LD95=5.50 (3.08-28.20)	DL50=13.33 (5.2-47.5) LD95=193.63 (60.43-9978)	DL50=313.6 (207.34-548.35) LD95=1100.60 (630.53-4992)	LD50=14.76 (10.12-20.96) LD95=35.03 (24.10-100.09)	DL50= 168.44 (143.98-241.85)
C. limbatus	LD50=17.17 (9.2-25.05) LD95= 42.28 (28.81-135.2)	LD50=4.25 (2.28-10.61) LD95=16.97 (8.52-203.8)	LD50=7.94 (2.71-17.38) LD95=117.07 (44.03-1629.66)	LD50=232.8 (169.82-304.87) LD95=448.7 (340.4-917.134)	DL50=22.71 (16.71-33.43) LD95=61.2 (40.2-178.2)	

Los efectos de parálisis de los tres venenos varían ampliamente dependiendo de la especie presa inyectada. El Cuadro 4 muestra la toxicidad relativa (razones de la dosis letal) del veneno de *C. edwarsii* sobre varios modelos presa con límites de confianza al 95% comparado una especie con todas las demás. Se observa que para el caso de este veneno P.*australasie, P. intermutans, T. molitor y H. frenatus* difieren significativamente *de A. assimilis*. *A. domesticus* difiere solo con P .*australasie, P. intermutans, T. molitor y H. frenatus (Cuadro3)*. Con respecto al veneno de *C. bicolor* se observan diferencias significativas entre *A. domesticus, P. intermutans, T. molitor* con respecto *A. assimilis* (Cuadro 4). Con respecto al veneno de *C. limbatus* diferencias significativas se observan al comparar los radios de las dosis letales medias de *T. molitor* con respecto a *A. assimilis* (Cuadro 4).

Cuadro 3. Razón dosis letal (RDL) cincuenta / noventa y cinco de *Centruroides edwarsii* sobre cinco especies de invertebrados (Insectos) y un vertebrado (reptil). Los números entre paréntesis representan el intervalo de confianza al 95% de la razón de las dosis letales.

Especie Presa	*A. domesticus*	*P.australasie*	*P. intermutans*	*T.molitor*	*H. frenatus*
A. assimilis	RDL50=12.74 (6.92-23.45) RDL95=0.29 (0.08-1.05)	RDL50=0.22 (0.11-0.41)* RDL95=0.29 (0.08-1.05)	RDL50=0.47 (0.25-0.85)* RDL95=0.90 (0.26-3.06)	RDL50=0.30 (0.16-0.55)* RDL95=0.59 (0.18-1.94)	RDL50=0.37 (0.21-0.64)* RDL95=1.28 (0.43-3.84)
A. domesticus		RLD50=0.01 (0.01-0.03)* RDL95=0.01 (0.004-0.03)*	RLD50=0.03 (0.02-0.06)* RDL95=0.03 (0.01-0.09)*	RDL50=0.02 (0.01-0.04)* RDL95=0.02 (0.009-0.05)*	RDL50=0.02 (0.01-0.04)* RDL95=0.05 (0.02-0.11)*
P.australasie			RDL50=2.12 (1.18-3.79) * RDL95=3.09 (1.01-9.44)*	RDL50=1.36 (0.76- 2.44) RDL95=2.04 (0.69-5.97)	RDL50 =1.68 (1.00- 2.83)* RDL95=4.43 (1.68- 11.68)*
P.intermutans				RDL50=0.64 (0.36-1.12) RDL95=0.660 (0.24-1.79)	RDL50=0.79 (0.48-1.30) RDL95=1.431 (0.58-3.48)
T.molitor					RDL50=1.23 (0.75-2.02) RDL95=2.17 (0.94-5.00)

*significativamente diferentes a p=0.05

Cuadro 4. Razón dosis letal cincuenta / noventa y cinco (RDL) de *Centruroides bicolor* sobre cinco especies de invertebrados (Insectos) y un vertebrado (reptil). Los números entre paréntesis representan el intervalo de confianza al 95% de la razón de las dosis letales

Especie Presa	*A. domesticus*	*P.autralasie*	*P.intermutans*	*T.molitor*
A. assimilis	RDL50=5.75 (3.20-10.35)*	RDL50=0.62 (0.27-1.37)	RDL50=0.60 (0.38-0.97)*	RDL50=0.02 (0.01-0.05)*
	RDL95=4.80 (1.53-15.06)*	RDL95=0.13 (0.01-0.96)*	RDL95=0.75 (0.29-1.95)	RDL95=0.02 (0.01-0.07)*
A. domesticus		RDL50=0.10 (0.04-0.24)*	RDL50=0.10 (0.06-0.18)*	RDL50=0.01 (0.00-0.01)*
		RDL95=0.02 (0.00-0.20)*	RDL95=0.15 (0.05-0.42)*	RDL95=0.01 (0.00-0.01)*
P.australasie			RDL50=0.98 (0.45-2.10)	RDL50=0.04 (0.02-0.05)*
			RDL95=5.52 (0.85-35.78)	RDL95=0.17 (0.02-1.25)
T. molitor			RDL50=0.04 (0.03-0.07)*	
			RDL95=0.03 (0.01-0.08)*	

*significativamente diferentes a p=0.05

Cuadro 5. Razón de dosis letal cincuenta / noventa y cinco (RDL) de *Centruroides limbatus* sobre cinco especies de invertebrados (Insectos) y un vertebrado (reptil). Los números entre paréntesis representan el intervalo de confianza de la razón de las dosis letales a un 95% de confianza.

Especie Presa	*A. domesticus*	*P.autralasie*	*P.intermutans*	*T.molitor*
A. assimilis	RDL50=5.75 (3.20-10.35)*	RDL50=0.62 (0.27-1.37)	RDL50=0.60 (0.38-0.97)*	RDL50=0.02 (0.01-0.05)*
	RDL95=4.80 (1.53-15.06)*	RDL95=0.13 (0.01-0.96)*	RDL95=0.75 (0.29-1.95)	RDL95=0.02 (0.01-0.07)*
A. domesticus		RDL50=0.10 (0.04-0.24)*	RDL50=0.10 (0.06-0.18)*	RDL50=0.01 (0.00-0.01)*
		RDL95=0.02 (0.00-0.20)*	RDL95=0.15 (0.05-0.42)*	RDL95=0.01 (0.00-0.01)*
P.australasie			RDL50=0.98 (0.45-2.10)	RDL50=0.04 (0.02-0.05)*
			RDL95=5.52 (0.85-35.78)	RDL95=0.17 (0.02-1.25)
T. molitor			RDL50=0.04 (0.03-0.07)*	
			RDL95=0.03 (0.01-0.08)*	

*significativamente diferentes a p=0.05

4. Discusión

De nuestros análisis se desprende que tres especies de escorpiones del género *Centruroides* poseen venenos que difieren en letalidad y capacidades de parálisis a potenciales presas. Diferencias en los efectos y constitución de venenos se han observado también en otras especies de *Centruroides*, entre ellas *Centruroides noxius* y *Centruroides suffusus.* La purificación y clonación de genes de estas dos especies ha revelado la presencia de péptidos de cadena corta con carácter neurotóxico en C. *noxius*, no así en el caso de *C. suffusus*, cuyo veneno presenta péptidos tóxicos de cadena larga (Corzo et *al*. 2009). Otro dato que sobresale es la presencia de fosfolipasas en el veneno de *C. noxius*, no así en *C. suffusus*.

Las diferencias en susceptibilidad (o contrariamente, resistencia) parecen asociarse a aspectos inherentes a la especie diana: aquellas que son más susceptibles a un tipo de veneno suelen serlo igualmente a otros (Cuadro 2). Las respuestas tóxicas pueden ser del tipo "todo o nada" o pueden ser respuestas graduadas y se detectan gracias a los cambios fisiológicos y bioquímicos, como alteración de una vía metabólica particular o la aparición de una enzima o sustancia que sea indicativa de daño patológico (García 2005). En nuestro caso grillos del género *Acheta* son susceptibles al veneno de *Centruroides*, mientras que larvas de coleópteros del género *Tenebrio* son más resistentes a sus efectos. Así los grillos pueden constituirse un interesante insecto modelo para bioensayos, en el cual se puedan detectar pequeños cambios en la actividad metabólica y/o comportamiento debido a que son muy sensibles al veneno de escorpión.

Se debe considerar que la selección natural por sí sola no es la única responsable de generar cambios en la composición de los venenos. Las relaciones depredador-presa constituyen una potente fuerza selectiva. En este sentido se estable una carrera paralela entre depredador y presa que conduce a una recurrente adopción de nuevas estrategias bioquímicas que le permitan al depredador acceder a presas venenosas. En este sentido se cita en la literatura ejemplos de cómo especies depredadores que cohabitan en simpatría con sus presas venenosas, presentan algún grado de resistencia a sus venenos. Lo anterior se ejemplifica muy bien en *Taricha granulosa*, especie de salamandra venenosa que es presa *Thamnophis sirtalis*. Ambas especies cohabitan en simpatría. Esta especie de serpiente es resistente a la neurotoxina (TTX) presente en la salamandra (Hanifin et *al.* 1999). Poblaciones de ardillas californianas (*Spermophilus beecheyi*) que cohabitan con serpientes de cascabel del pacifico norte (*Crotalus viridis oreganus*) exhiben resistencia al veneno de esta especie de serpiente; mientras que poblaciones de ardillas que son allopatricas con las serpientes de cascabel no son resistentes (Poran et *al*. 1987). En el caso de escorpiones y sus depredadores el caso más notable se ejemplifica en los roedores del genero *Onychomys* del sur este de los Estados Unidos y sus principales presas los escorpiones de corteza. Especies de roedores simpátricas con escorpiones del genero *Centruroides*, son altamente resistentes a sus venenos y los escorpiones constituyen parte importante de la dieta de estos roedores.

Aunque todavía está pendiente una comprehensiva evaluación de las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman el género, las tres especies estudiadas son cercanamente emparentadas (Borges et al. 2003). Recientes análisis moleculares indican que el Género *Centruroides* divergió de otros géneros asiáticos e irradio en el nuevo mundo, distribuyéndose mayormente en zonas tropicales pudiendo colonizar un amplio espectro de hábitat (Fet et *al.* 2003). Así, la diversidad en efectos y

composición de venenos no parece limitarse a la historia evolutiva de este grupo de escorpiones: posiblemente otros factores como dieta, biogeografía y distribución por microclimas favorezcan el origen y mantenimiento de esa diversidad.

La diversidad en efectos del veneno refleja la diferencia estructural entre especies diana. Estas variaciones posiblemente se basen en diferencias en la afinidad de las toxinas por receptores específicos en diferentes especies diana, o en tejidos diferentes dentro de individuos de una especie (García et *al*. 2005). Mutaciones en los residuos de aminoácidos esenciales de los escorpiones, implicados en la interacción entre las toxinas de los venenos y sus receptores podrían ser el mecanismo relacionado con la resistencia observada en uno u otro organismo (Borchani et *al.* 1996, Legros et *al.* 1998). La habilidad de una toxina para producir un efecto tóxico en uno o varios blancos, así también podría depender de la dosis de toxina y/o de la conformación del sitio de unión. Si la dosis es baja, una mínima unión en un solo sitio sobre el receptor podría resultar en ninguna toxicidad medible. Si la dosis es alta, se incrementa la unión en un solo sitio o en múltiples sitios sobre el receptor, resultando en una toxicidad significativa (Wallace, 2007). Los receptores pueden poseer un único sitio de unión para una toxina en particular o más de un sitio de unión para esa misma toxina (Tinacopa 2007).

Por otro lado, nuestros ensayos reflejan además importantes diferencias en la susceptibilidad al veneno de las distintas especies modelos evaluadas. Este patrón ha sido observado en otras especies de artrópodos, retadas con venenos de escorpiones u otros arácnidos. Por ejemplo, Manzoli-Palma et *al.* (2003) reportan diferencias en la toxicidad del veneno de *Tytius serrulatus* sobre distintos insectos. En la abeja *Apis mellifera*, la acción del veneno va desde una fase excitatoria hasta el decrecimiento en la locomoción, seguida de incapacidad para voltearse, contracciones espásmicas del abdomen y eventualmente la muerte. Los síntomas de envenenamiento en *Acheta assimilis* es distinta, caracterizada por una abrupta interrupción de movimiento y un estiramiento evidente del abdomen, casi separándolo del tórax. Se observa además ruptura de la línea de ecdisis, posiblemente asociada a un incremento en la presión de hemolinfa y eventualmente la muerte. Finalmente, la actividad del veneno sobre larvas del lepidóptero *Diatraea saccharalis* es más lenta: las larvas decrecen su actividad y se vuelven flácidas, pudiendo solamente alzar su cabeza como respuesta al estímulo mecánico. Las letalidades del veneno en estos insectos también difieren sustancialmente: mientras la LD50 en *A. mellifera* y *A. assimilis* es relativamente baja (<20 ng/mg), la del lepidóptero es extremadamente alta (>1500ng/mg).

La media del contenido del veneno de los escorpiones estudiados es 2.95 mg/ml lo que corresponde a 1.3 veces más veneno necesario para paralizar grillos. Sin embargo, esta cantidad de

veneno no es suficiente para matar o incluso inmovilizar modelos resistentes, como es el caso de *Hemidactylus* o *Tenebrio*. Es evidente que si bien el veneno es una herramienta importante que facilita la obtención de presas, otras estrategias –distintas al uso del veneno– podrían operar a la hora de poder subyugarlas (Binford 2001, Gwee et *al.* 2002).

Los venenos de los escorpiones posiblemente han evolucionado en términos de su medio ambiente, para proveerse de presas que como recurso les brinde el medio (Gómez y Otero 2007). En el caso de depredadores generalistas como los escorpiones que consumen en su dieta un amplio espectro de presas, se observa que poseen una gran capacidad para adaptarse a medios cambiantes. Esta plasticidad les permite mantener un arsenal bioquímico capaz de subyugar a un número variado de presas. Los escorpiones generalistas como *Centruroides* son mucho más susceptibles a dispersiones y a nivel de taxa pueden utilizar una gran variedad de hábitats (Ponce y Moreno 2005). La composición y variación de sus venenos posiblemente este dirigido a amortiguar los cambios del medio y generar adaptación. Producto de la fuerza de selección ejercida por los cambios ambientales, nuevas combinación de genes resultan en venenos más o menos tóxicos para un grupo taxonómico en particular (Casewel et. *al* 2013).

Algunas teorías han sido establecidas para poder entender las relaciones entre susceptibilidad o resistencia a un veneno particular. Entre ellas la economía del veneno, la cual predice que al disminuir la secreción de grandes cantidades de veneno, el depredador genera un cambio en la resistencia de la presa a su veneno (Casewell et *al*. 2013). La optimización del veneno tiene también grandes implicaciones en el buen entendimiento de este fenómeno. Por ejemplo en el escorpión *Pandinus imperator* el veneno es usado exclusivamente por los juveniles, los adultos discontinúan el uso del veneno (Casper 1985). En otras especies el uso del veneno es limitado a encuentros largos en donde la presa supera el tamaño del escorpión y a este se le dificulta la movilización de la presa con sus pedipalpos. Esta diferencia en el uso del veneno podría resultar en diferencias en la trayectoria evolutiva de las toxinas de los venenos (Gwe et *al.* 2002).

Las diferencias en resistencia, susceptibilidad o letalidad del veneno de las tres especies de escorpiones evaluadas en los distintos modelos muestran que hay un efecto diferencial según sea la presa, por lo que veneno *per se* no es en última instancia el factor determinante para la obtención de presas. Otros mecanismos pueden estar involucrados para este fin, como el uso de apéndice desarrollados en robustas tenazas que permiten la sujeción e inmovilización de la presa. El veneno en los escorpiones podría verse como una herramienta costosa que le confiere una ventaja adaptativa para

proveerse de presas. El veneno será usado según sea la exigencia que demande la presa o depredador. Otro aporte importante de este estudio estriba en el desarrollo de nuevos protocolos para realizar bioensayos estandarizados en modelos presa alternativos que permitan evaluar posibles agentes con acción insecticida como el caso de venenos de escorpión.

Finalmente dentro de los posibles alcances de este trabajo se podría establecer una línea de investigación en bioprospección, al estudiar en detalle las capacidades insecticidas de los venenos de escorpiones y su uso como bioinsectididas, que no afecten a especies benéficos y que no representen un peligro para la salud pública. Es importante resaltar que al realizar bioensayos para evaluar la toxicidad de venenos o componentes tóxicos de este, es necesario tener en cuenta algunos aspectos tales como: la sensibilidad de las pruebas de los insectos a los venenos específicos; la facilidad de la cría y el mantenimiento de cada insecto; peso corporal adecuado (para consumir la mínima cantidad de veneno); descripción adecuada de la parálisis, y la aparición de patrones de comportamiento fácilmente observables, que faciliten la caracterización de los efectos tóxicos de cada veneno (Manzoli-Palma et *al*. 2003). Así también se pueden considerar otras aplicaciones, como lograr índices de toxicidad más adecuados para especies de escorpiones que son no tóxicos para modelos murinos. Ello permitiría el uso de otros organismos que resulten ser más sensibles en detectar pequeñas variaciones en la toxicidad.

5. Referencias

Abdel-Rahman, M. A., M. A. A. Omran, I. M. Abdel-Nabi, H. Ueda, and A. McVean. 2009. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. Toxicon. 53: 349–359.

Armas, L. F. y E. Martín-Frías. 2008. El género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones:Buthidae) en el estado de Veracruz, México. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa 4: 7–22.

Barlow, A., C.E., Pook, R.A., Harrison W.Wüster.2009. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. Proc. R. Soc. B. 276: 2443–2449.

Barona, J., R.Otero., y V. Nuñez. 2005. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno de escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. Biomédica. 24: 42-49 pp

Binford, G.J. 2001. Differences in venom composition between orbweaving and wandering Hawaiian Tetragnatha (Araneae) Biological Journal of the Linnean Society. 74: 581–595.

Borchani,L.,P.Mansuelle.M.Stankiewcz.F.F.Grolleau. S. Cestele. H. Karoui. B. Lapied, H. Rochat. M. Pelhate and M,El Ayeb.1996. A new scorpion venom toxin paralytic to insects that affects Na+ channel activation Purification, structure, antigenicity and mode of action. Eur. J. Biochem. 241, 525-532.

Borges, A., M. Alfonzo., C.Garcia., N.Winand., E. Leipolde. and S.Heinemann. 2004. Isolation, molecular cloning, and functional characterization of a novel beta-Toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus.* Toxicon. 43: 671-684 pp.

Bosmans, F and J. Tytgat. 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α-toxins. Toxicon. 49: 142–158.

Casper, G. S. 1985. Prey capture and stinging behavior in the Emperor scorpion, *Pandinus imperator* (Koch) (Scorpiones, Scorpionidae). J. Arachnol. 13:277-283.

Corzo, G., A. Prochnicka-Chalufour, B. I. García, L.D. Possani, M. Delepierre. 2009. Solution structure of Cn5, a crustacean toxin found in the venom of the scorpions *Centruroides noxius* and *Centruroides suffusus suffuses*. Biochimica et Biophysica Acta 1794: 1591–1598.

Casewell, N. R. W. Wuster, F.J. Vonk, R. A. Harrison and B. Fry .2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms Trends in Ecology and Evolution.4: 219-229.

Castilla, A.M. A.Herrel and A. Gosá.2009. Predation by scorpions (*Buthus occitanus*) on *Podarcis atrata* from the Columbretes Islands. Munibe (Ciencias Naturales-Natur Zientziak) 57: 191-194.

De Dianous, S., Hoarau, F., Rochat, H. 1987. Re-examination of the specificity of the scorpion *Androctonus australis hector* insect toxin towards arthropods. Toxicon. 25: 411–417.

De Lima, M.E. S.G. Figueiredo, A.M.C. Pimenta, D.M. Santos, M.H. Borges, M.N. Cordeiro, M. Richardson, L.C. Oliveira, M. Stankiewicz, and M. Pelhate.2007. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 146: 264–279.

De Sousa,L.,P.Parrilla.,P.Perez.,L.Romero y M. Quiroga. 2009. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones:Buthidae) en ratones C57BL/6 Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 21: 47-59.

D'Suze, G. V, Salazar., P., Díaz, C. Sevcik., H. Azpurua., and N. Bracho. 2004. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. Toxicon. 44:851–60.

Finney, DJ. 1971.Probit analysis. Cambridge: Cambridge University Press

Friedel, F and G.Nentwing. 1989. Inmobilizing and lethal effects of spider venoms on the cockroach and the common meal beetle.Toxicon.27:305-317.

Inceoglu, B.J. Lango, J. Wu,P. Hawkins,J. Southern, and B.D Hammock. 2001. Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae). Eur. J. Biochem. 268: 5407–5413.

Inceoglu, B., J.Lango.,J Jing.,L. Chen, F. Doymaz, I.N. Pessah., and B.D. Hammock. 2003. One scorpion, two venoms: prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100: 922–927.

García-Gómez, B.I. F.I.V. Coronas, R. Restano-Cassulini, R.R. Rodríguez, L.D. Possani. Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. Toxicon 58:18–27.

Gwee, M. CE, S. Nirthanan, H. E. Khoo, P. Gopalakrishnakone, R.N Kini and L.S. Cheah. 2002. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 29: 795–801.

Gómez, J.P., R. Otero. 2007. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 25: 50-60

Hassani, O., P. Mansuelle., S. Cestèle., M. Bourdeaux., H. Rochat., and F. Sampieri. 1999. Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Ts gamma) from the scorpion *Tityus serrulatus*. Eur. J. Biochem. 260:76–86.

Krifi, M.N.,N. Marrakchi., M. El Ayeb., and K. Dellagi. 1998. Effect of some variables on the in vivo determination of scorpion and viper venom toxicities. Biologicals. 26: 277–288.

Legros, C. M., F. Martin-Eauclaire and D. Cattaert. 1998. The myth of scorpion suicide: are scorpions insensitive to their own venom?. The Journal of Experimental Biology. 201: 2625–2636.

Machessy, S.P.,Williams,K. Ashton,K.G.2003. Ontogenetic varitation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venoms Paedomorphosis? Copeia.769-782.

Manzoli-Palma, M. F., N. Gobbi., M. S. Palma.2003. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 9: 1-8.

Mazzei-Davila, C.A., D.F.Davila., J. Donis., G. Arata-Bellabarba, V. Villarreal., and L. Barboza. 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. Toxicon. 40: 1339-1346.

Miyashita, M. S., N.Atsushi, Y. Matsushita.,Y. Hanai,Y. Nakagawa., and H. Miyagawa. 2010. A Novel Amphipathic Linear Peptide with Both Insect Toxicity and Antimicrobial Activity from the Venom of the Scorpion *Isometrus maculatus* Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 364–369.

Nasar, H. B., H. Serriaa, S. Chaker, B. Riadhb, S. Zouheir, J. Kamel , R. Tarekb. and Z. Khaleda. 2009. Some biological effects of scorpion envenomation in late pregnant rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 61: 573–580.

Payton M.E, M. H, Greenstone, N. Schenker. 2003. Overlapping confidence intervals or standard error intervals: What do they mean in terms of statistical significance?. Journal of Insect Science, 3:1-6.

Polis, G.A. y W.D. Sissom. 1990. Life history. p. 161-223. In G.A. Polis (Ed.) The biology of scorpions, Stanford University Press, Stanford, California.

Ponce Saavedra, J y R. J. Moreno Barajas. 2005. El género *Centruroides* Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en México. Biologicas 7:42-52.

Possani, L.D., B. Becerril.,M., Delepierre, and J. Tytgat. 1999. Scorpion toxins specific for Na+-channels. Eur. J. Biochem. 264: 287–300.

Richards, D.P., A. Barlow y W. Wüster.2012. Venom lethality and diet: Differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (*Echis*) Toxicon 59:110–116.

Rivera, R. 2003. Envenenamiento por escorpión. Acta Pediátrica Costarricense. 17:84-89.

Rowe, H. and M. Rowe. 2008. Physiological resistance of grasshopper mice (*Onychomys spp*.) to Arizona bark scorpion (*Centruroides exilicauda*) venom Ashlee. Toxicon. 52: 597–605.

Tincopa, L.R. 2007.Estudio bioquímico del veneno del escorpión *Tityus sp.* (aff. *T. silvestris* Pocok 1987). Tesis sometida para optar por el grada académico de Biología celular y genética. Universidad Nacional de San Marcos. Lima, Perú.36pp.

Víquez, C. 1999.Escorpiones de Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Santo Domingo, Heredia. 84 pp.

Yahel-Niv, A., E., Zlotkin. 1979. Comparative studies on venom obtained from individual scorpions by natural stings. Toxicon. 17: 435–446.

Zlotkin, E., G. Fraenkel, F. Miranda, and S. Lissitsky. 1971a. The effect of scorpion venom on blowfly larvae. A new method for the evaluation of scorpion venoms potency. Toxicon. 9: 1-8.

Zlotkin, E., F Miranda., C. Kopeyan,., S. Lissitzky.1971b. A new toxic protein in the venom of the scorpion *Androctonus australis Hector*. Toxicon 9: 9–13.

Zlotkin, E., F.Miranda and S. Lissitzky. 1972. A factor toxic to crustacean in venom of the scorpion *Androctonus australis.* Toxicon 2:123-117.

Zlotkin, E., G. Martinez., H. Rochat,.and F.Miranda.1975.A protein toxic to crustacean in venom from the scorpion Androctonus australis. Insect Biochem.5:243

Zlotkin, E., F. Miranda., and H.Rochat. 1978. Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In: Bettini, S. (Ed.), Arthropod Venoms. Springer, Berlin, p. 317.

1. Especificaciones de dieta artificial para la alimentación de los modelos presa (Insectos)

Dieta 1: Se mezclan 5 partes de comida para gallina ponedora con una parte de multivitaminico Pecutrin® con biotina y dos partes de alimento para roedores de laboratorio. Todos los ingredientes se mezclan muy bien durante 3 min y se coloca en un recipiente hermético y se mantiene tapado bajo refrigeración a 5ºC

Dieta 2: se mezclan 5 partes de alimento para gato (adulto), 1 parte de leche en polvo y parte de Ca+2 (pastillas de Calcio molidas). Se debe moler o pulverizar previamente el alimento para facilitar el consumo por parte de los grillos. Posteriormente se mezclan los demás ingredientes por 5min para permitir una mezcla homogénea.

Apéndice 2. Escorpión *Centruroides edwarsii* cazando especie de geco *Hemidactylus frenatus*

CAPITULO 3

Función de los pectenes en detección de presa en el escorpión *Centruroides margaritatus* (Scorpiones: Buthidae)

1. Introducción

La comunicación a través de vibraciones se emplea de diversas formas en el reino animal. Muchos grupos de organismos (mamíferos, reptiles, serpientes) captan información sensorial del medio circundante por medio de vibraciones propagadas a traves del sustrato (Barnett et *al*. 1999, O'Connell-Rodwell et *al.* 2001) .Esta información puede estar relacionada con alimentación (O'Connell et *al.* 1997), reproducción-cortejo (Lewis & Narins 1985), comportamiento antidepredador y alarma (Hill 2001).

En el caso particular de artrópodos, las vibraciones cumplen varias funciones entre ellas: agregación (atracción de parejas y formación de parejas), cortejo precopulatorio y copulatorio mantenimiento de la pareja, agresión (establecer dominancia y territorialidad), protesta y alarma social (señales de reconocimiento) encontrar alimento y localización del nido formación de enjambres, direccionar la ubicación de presas o la fuente del recurso alimenticio (Devetak et *al*. 2007, Mencinger-Vracko & Devetak 2008), alertar o huir de depredadores (Brownell 1977), así como para localizar y cortejar potenciales parejas y juegan un papel importante durante la cópula de algunas especies de chinches (Elias et *al.* 2003). Por otra parte las vibraciones pueden ser empleadas en interacción predador-presa. Fertin & Casas (2007) señalan que las larvas de hormiga león *Euroleon nostras* (Neuroptera: Myrmeleontidae) utilizan las ondas vibratorias propagadas en la arena para detectar presencia de presas en los túneles trampa. También las orugas son capaces de distinguir en forma cualitativa y cuantitativa las vibraciones provenientes de sus depredadores. Castellanos & Barbosa (2006) observaron que las larvas de *Semiothisa aemulataria* (Geometridae) presentan un comportamiento defensivo ante señales emitidas por estímulos vibratorios provenientes de predadores.

Los escorpiones (Arachnida: Scorpiones) son depredadores, con hábitos diurnos y nocturnos; tienen la habilidad de extraer información proveniente de vibraciones propagadas por sustratos sólidos (Hill 2009). Estos artrópodos poseen numerosos receptores mecánicos y propioreceptores (censan el estado biomecánico) que aumentan la sensibilidad a ondas vibratorias (Blass & Gaffin 2008). Abusama (1964) sugiere que estos artrópodos detectan las vibraciones a través de tricobotrios, receptores cutilares embebidos en cavidades (botrios), localizados en los pedipalpos. Otros autores como Brownell & Farley

(1979 a) sugieren que esto ocurre a través del uso de hendiduras sensitivas en las patas. En general los escorpiones muestran gran capacidad para detectar vibraciones e identificar con precisión la fuente de estas. Brownell (1984) argumentó sobre la capacidad de los escorpiones desérticos, para determinar la distancia de presas usando la información proveniente de ondas de compresión tipo (P). Experimentos realizados con el escorpión desértico *Smeringurus mesaensis* sugieren que esta especie utiliza la información conducida a través del sustrato arenoso para localizar el origen, la dirección y distancia de la fuente de vibración, por medio de sensores mecánicos ubicados en las patas (Brownell & Farley 1979 a,b).

Otra estructura asociada con la percepción de información a través de vibraciones en los escorpiones son los pectenes (Brownell 1988). Estas estructuras son apéndices medio ventrales, se originan desde la superficie ventral cerca de la coxa en los últimos pares de patas (Gaffin & Brownell 1997, Wolf 2008, Knowlton & Gaffin 2010). Son consideradas autopomorfías por ser caracteres únicos derivados en el grupo (Polis & Sissom 1990) Comparten características con el sistema visual y somatosensorial (Root 1990) al detectar características particulares de espacios físicos (Brownell 2001). Brownell (1998) sugiere que las neuronas pectinales conservan la información espacial acerca de la localización de estímulos por proyecciones de neuronas en el ganglio subesofágico. Por otra parte, evidencia morfológica y electrofisiológica demuestran la presencia de receptores de estímulos mecánicos en los pectenes (Melville 2000). Estos receptores median en funciones mecánicas y motoras como el intercambio del espermatóforos durante el cortejo o la detección de cambios en la textura del sustrato. Otras funciones atribuidas a los pectenes incluyen sensibilidad táctil, equilibrio, audición y algunas otras funciones relacionadas con reproducción (Fet et *al.* 1998).

Las funciones de los pectenes relacionadas con detección y localización de presa son controversiales. Cloudsley-Thompson (1955) reportó que los pectenes detectan las vibraciones del sustrato provocadas por una presa. Abushama (1964) argumentó acerca de la capacidad de los pectenes para monitorear cambios en las características mecánicas y químicas de los sustratos en relación a la presencia o no de presas. Posteriormente Krapf (1986) evidenció la importancia de los pectenes como estructuras accesorias en la detección y localización de presas muertas y sus secreciones, por incremento en actividad de barrido del sustrato. Por otra parte los estudios sobre funciones de pectenes en su mayoría emplean especies desérticas (Swoveland 1978, Gaffin et *al.* 1992, Gaffin & Brownell 1992, Knowlton & Gaffin 2011). Mineo & Del Claro (2006) sugieren considerar posibles adaptaciones específicas que puedan ocurrir. Polis & Sissom (1990) señalan que algunas especies muestran

adaptaciones ecomorfológicas a diferentes suelos o microhábitats, sin embargo similitudes en apariencia entre escorpiones solapan las diferencian morfológicas.

El presente estudio utiliza el escorpión *Centruroides margaritatus* (Gervais 1841) perteneciente a la familia Buthidae, el grupo de escorpiones modernos más numerosos y ampliamente distribuidos. Considerada la especie más abundante en bosques estacionales y caducifolios de Centroamérica (Escobar et *al.* 2003). En Costa Rica se distribuye desde tierras bajas de boques tropicales secos, en la costa Pacífica hasta el Valle central (1300m) (Víquez 1999).

El objetivo de este estudio fue determinar la función de los pectenes de *C. margaritatus* como estructuras relacionadas con detección de presas.

2. Materiales y Métodos

El estudio se realizó entre los meses de Setiembre a Noviembre del 2011. Se utilizaron hembras de 7-8 cm de longitud del prosoma hasta el aculeus. Los individuos utilizados fueron colectados en el Parque Nacional Santa Rosa, Parque Nacional Palo Verde y depositados en la colección viva de escorpiones del Instituto Clodomiro Picado.

Sesenta hembras fueron asignadas aleatoriamente a cuatro grupos en números iguales. Tres grupos fueron designados como tratamientos y uno como control. Cada grupo recibió una larva de *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae) cada 15 días. Los especímenes se mantuvieron individualmente en cajas de plástico, con múltiples agujeros, algodón húmedo y un trozo de papel tipo… como refugio. Las condiciones en el laboratorio se mantuvieron constantes (20-24°C, una humedad 65%-75% ,12h luz).

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:1) Obstrucción de los pectenes con parafina: se utilizó parafina histológica (Polifin®), derretida para mejor manipulación. Se colocó una sola capa fina de parafina líquida con un pincel de punta plana en ambos pectenes. 2) Amputación aleatoria de un pecten: de forma alterna se amputó el pecten en el punto de unión de la lamela marginal y el pliegue posgenital sin dañar las estructuras reproductoras (Fig. 1). El corte se realizó con una tijera quirúrgica estéril previamente autoclavada. 3) Amputación de ambos pectenes: se amputó ambos pectenes simultáneamente. Los escorpiones en el grupo control permanecieron con sus pectenes intactos, pero también fueron manipulados para causarles estrés similar a los tratados. Todos los individuos se inmovilizaron enfriándolos a -4°C por 3min. Todos los especímenes comieron una semana antes de aplicar cada tratamiento. Posterior a la aplicación de cada tratamiento se les dio un período de

recuperación de al menos tres días, antes de iniciar el experimento. Todos los individuos fueron utilizados una única vez.

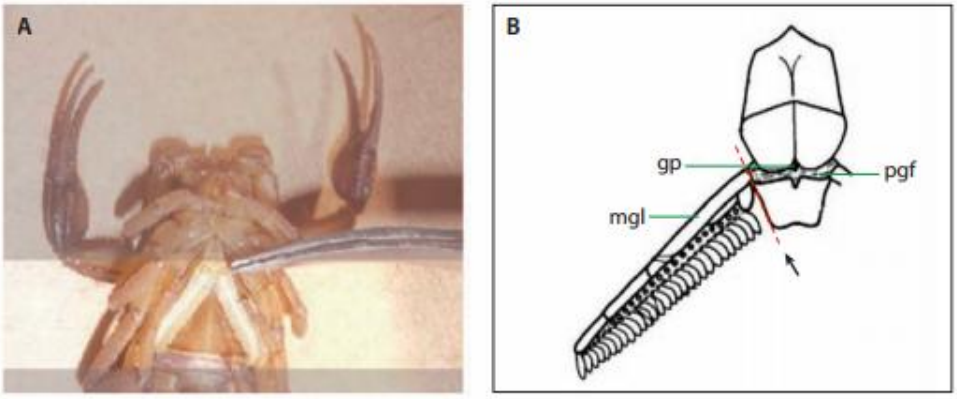


Fig. 1. Morfología del pecten. a). Pectenes del escorpión localizados en la superficie medio ventral del mesosoma (*C. margaritatus)*.b) Diagrama de amputación. La flecha indica la dirección de corte. mgl (lamella marginal), gp (papilas genitales), pgf (Pliegue posgenital) (Modificada de Polis & Sissom 1990).

Las pruebas de comportamiento fueron realizadas en una arena experimental cuadrada de plástico con dimensiones de 34.6x21x12.4cm rellena con arena de río (Fig. 2). A ambos lados del terrario se ubico una jaula plástica de 3.5x3.5x2 cm (Fig. 2), dentro de ella se colocó la presa y se alterno la posición de esta (izquierda o derecha) para cada prueba. La presa (*Acheta domesticus*) permaneció en la jaula experimental en contacto directo con el sustrato durante el período experimental. La presa siempre estuvo dentro de la jaula sin posibilidad de escape. Antes de iniciar se la presa dentro de la jaula experimental y luego se colocó al escorpión en el centro del terrario (Fig. 2), encima se le coloco una jaula de plástico 4x4x2 cm y se le dio un período de aclimatación de 15min. La jaula fue retirada y se observó el comportamiento durante 20 min. Las pruebas fueron filmadas con una cámara de video digital Sony DCR-HC36 equipada con luz infrarroja. Las grabaciones se realizaron en un cuarto completamente oscuro, simulando el período de actividad de esta especie.

Los comportamientos observados fueron cuantificados en frecuencias cada 30 s durante 20min. Las variables respuesta analizadas fueron: tiempo de reacción (tiempo que trascurre hasta observar una reacción visible del escorpión), tiempo de encuentro de presa (tiempo que trascurre hasta observar que el escorpión detecte la presa por primera vez). La descripción de los comportamientos descritos se detalla en el Cuadro 1.

Fig. 2. Arena experimental donde se realizan las pruebas comportamiento. La letra Z corresponde a las zonas de división del terrario, cada zona mide 5cm de ancho.

Cuadro 1. Descripción de los comportamientos observados en hembras *C. margaritatus*

Comportamientos	Descripción
Exploratorio A	Caminar de un lado al otro del terrario con los pedipalpos paralelos uno al lado del otro hacia adelante en forma recta en el mismo plano del cuerpo o haciendo movimientos hacia arriba y hacia abajo con las tenazas cerradas o abiertas.
Exploratorio B	Intentar subir las paredes del terrario con apoyo de metasoma, empujando hacia arriba intentando salirse del terrario
Forrajeo	Asir la caja que contiene la presa y sujetarla con las tenazas, intentando capturar el grillo dentro de jaula plástica
Aseo	Limpieza de tenazas y pedipalpo con quelíceros o con el segundo par de pata. El escorpión introduce sus tenazas dentro del aparato bucal repetidas veces
Descanso	El escorpión permanece inmóvil ,cuerpo en contacto con el sustrato, metasoma y apéndices cercanos al cuerpo
Postura de Alerta	Postura en la cual el cuerpo del escorpión esta levantado encima del sustrato por sus patas, los pedipalpos están extendidos anteriormente en ángulo de 90°, los pectenes en contacto con el sustrato y metasoma levantado

Análisis estadístico

Las proporciones de frecuencias entre tratamientos y grupo control se analizaron con pruebas de chi-cuadrado. Pruebas de Kruskal Wallis se utilizaron para examinar las diferencias en tiempos de reacción y tiempos para hallar presa entre tratamientos y controles. Los análisis estadísticos fueron implementados en el programa JMP® 7.0 (SAS Institute 2007).

3. Resultados

Los escorpiones incluidos en el tratamiento con parafina, corte de 1 pecten, corte de 2 pectenes y grupo control no difieren en tamaño del cuerpo (*KW* χ^2=3.15, gl=3, P=0.369). Así mismo los tamaños de sus presas (grillos) no difieren (*KW* χ^2=2.19, gl=3, P=0,553). Durante el experimento se observaron cinco categorías de comportamiento (Cuadro 2). El comportamiento más frecuente en el grupo control fue "descanso y limpieza" (28.09%), "exploratorio A" Caminar de un lado al otro del terrario con los pedipalpos paralelos uno al lado del otro. En los tratamientos 1 y 2 respectivamente (46.39% y 37.29%), "alerta" (34.45%) en el tratamiento 3. La frecuencia relativa de todas las categorías de comportamiento se muestra en el (Cuadro 2.)

La proporción de individuos que respondieron durante los ensayos difiere entre grupos: 93% en el control, 80% en los tratamientos 2 y 3, y 60% en tratamiento 1. Estas diferencias son significativas (χ^2=3.92, gl=1, P<0.05). El tiempo de reacción, excluyendo a individuos que no reaccionaron no difiere entre tratamientos (*KW* χ^2=0.82 gl=3, P=0.84). Así mismo, la proporción de individuos que no lograron encontrar presa durante los ensayos no difiere entre tratamientos y control (χ2=2.42, gl=1 P>0.05). El tiempo de encuentro (excluyendo aquellos individuos incapaces de encontrar presa) no difiere entre tratamientos (Cuadro 2.) y el control (*KW* χ^2=3.92, gl=3 P=0.269).

Las frecuencias totales de las categorías de comportamiento en los grupos tratamiento difieren con respecto al control, Parafina-control (χ^2 =48.02, P <0.0001), corte de 1 pecten-control (χ^2 =28.01, P<0.001) y corte de 2 pectenes-control (χ^2=28.01, P =0.001). Con respecto a la orientación de los individuos al inicio del experimento comparado con el éxito o fracaso de encuentro con la presa para cada tratamiento, no se observan diferencias. La probabilidad de encontrar la presa no depende de estar orientado en dirección a esta inicialmente.

Cuadro 2. Cuantificación de etograma de *C. margaritatus* en los grupos tratamiento y grupo control

Categoría de comportamiento	Frecuencia de comportamientos %			
	Tratamientos			
	Parafina	Corte de 1 pecten	Corte de 2 pectenes	Control
Exploratorio A	46,39	37,29	26,72	27,01
Exploratorio B	9,72	11,67	10,65	17,71
Forrajeo	3,89	6,67	1,67	2,50
Postura de Alerta	14,17	20,83	34,45	24,69
Descanso y limpieza	25,83	23,54	26,51	28,09

4. Discusión

La modificación de los pectenes del butido *C. margaritatus* tiene un efecto no cuantitativo sobre la capacidad de detección y localización de presas. La probabilidad de no encontrar la presa aumenta dependiendo del grado de modificación de la estructura, debido a que la alteración en el apéndice limita la percepción de estímulos mecánicos emitidos por la presa. Por tanto aquellos escorpiones con los pectenes amputados tienen mayor probabilidad de fracaso para hallar sus presas (Krapf 1986).

La variación observada en la proporción de individuos que reaccionaron durante los ensayos posiblemente se deba a que el estímulo (movimientos de grillo) no fue óptimo para generar una respuesta positiva. Por otra parte el bloqueo mecánico con parafina propicia un efecto inherente sobre el comportamiento de respuesta en los escorpiones tratados. Lo cual posiblemente explica la menor proporción de individuos con los pectenes parafinados que reaccionaron en los ensayos. Los resultados presentados en este estudio difieren de los datos presentados por Cloudsley-Thompson (1955). El bloqueo mecánico con parafina inhabilito la capacidad sensorial del escorpión, en comparación a la amputación de uno o ambos pectenes.

Mis datos no indican efecto de tratamiento en cuanto a la frecuencia de individuos que no encontraron sus presas. Diferencias en el éxito de captura por efecto de obstrucción mecánica con parafina, fueron reportados en el escorpión amarillo *Tytius serrulatus*. Escorpiones con pectenes bloqueados fueron ineficientes en percibir, encontrar y capturar presas (Mineo & Del Claro 2006). En mi estudio los individuos del grupo control no siguen el patrón esperado de mejor capacidad de detección de presas.

Por otra parte Gaffin & Walvoord (2004) estudiaron las estructuras que componen los pectenes. Cada pecten esta compuesto por espinas flexibles y una serie de dientes movibles. En la superficie de

cada diente en contacto con el sustrato, se localizan densos parches de clavijas sensoriales. Foelix & Müller-Vorholt (1983), Carthy (1966), señalan la presencia de células receptoras capaces de detectar estímulos químicos y mecánicos. Otros como Kladt et *al.* (2007) dilucidaron la función de las setas presentes en los pectenes del escorpión africano Garra roja (*Pandinus cavimanus*). Kladt y colaboradores determinaron que estos son mecanoreceptores con múltiple inervación, capaces de detectar obstáculos a corta distancia. Además controlan la altura a la cual deben estar los pectenes con el resto de cuerpo para detectar cambios en la superficie del medio.

Los escorpiones tratados detectan la presa de forma similar a los individuos del grupo control. Carthy (1968) reporta que los escorpiones con los pectenes amputados mantienen una respuesta leve a las vibraciones producidas por la presa, debido a la presencia de receptores tarsales y basitarsales ubicadas en las patas, que incrementan la sensibilidad vibratoria. Los receptores basitarsales son activados por ondas en la superficie, mientras que los pelos tarsales responden a ondas de compresión de larga amplitud. Por otra parte investigadores como Brownell & Hemmen (2001) señalan que los estímulos vibratorios en los escorpiones pueden ser censados por rendijas sensitivas embebidas en la cutícula, donde monitorean los cambios en la tensión durante la locomoción. Estos receptores son sensibles a cambios en la frecuencia de ondas mecánicas, por lo cual detectan señales de origen vibratorio debido a la inervación de varias motoneuronas que censan esos cambios. De igual forma, los escorpiones pueden localizar la cercanía de presas vivas con precisión por medio de vibraciones propagadas en el aire (Brownell 1977). Bub & Bowerman (1979) señalan que los tricobotrios funcionan como detectores sensibles a movimiento aéreo que registran las vibraciones aéreas y orientan las acciones de captura. Así mismo estos mecanoreceptores poseen un plano preferencial de oscilación, setas con el mismo plano de deflexión se agregan en grupos y forman un campo receptivo que censa los estímulos provenientes de señales transmitidas a través del aire (Krapf 1986)

Los comportamientos observados en los grupos tratamiento difieren del grupo control en la distribución de frecuencias para cada comportamiento. Las discrepancias posiblemente se deban a diferencias interespecíficas en la capacidad de cada individuo para realizar un determinado comportamiento. Individuos de la misma especie pueden mostrar diferentes reacciones a estímulos similares y los comportamientos ante estos estímulos pueden variar (Hölldobler & Wilson 1990).

Los resultados del estudio muestran un menor porcentaje de “postura de alerta” en aquellos individuos con los pectenes parafinados. Lo anterior podría explicarse en términos de efecto de tratamiento. La aplicación de la parafina provoca alteración en las células sensoriales o cual afecta el

comportamiento de postura de alerta, esto se traduce en la disminución en el éxito de captura. Las neuronas sensoriales que inervan las clavijas sensitivas requieren ser estimuladas con pulsos eléctricos mínimos. Estímulos repetitivos con una frecuencia aproximada de 200Hz producen un pico mínimo de actividad eléctrica (Root 1990) que permite una sinapsis axónica periferal (Foelix & Muller-Vorhorlt1983) cuyas aferencias se proyectan topográficamente desde el diente pectinal hasta el sistema nervioso central (Melville 2000).

En conclusión los pectenes son estructuras importantes en la detección de potenciales presas en *Centruroides margaritatus*, debido a la presencia de múltiples receptores (pelos pectinales y células mecanorectoras) que intervienen en la detección de señales mecánicas que indican la presencia de presas. Además estos receptores parecen potenciar la señal del estímulo vibratorio emitido por una presa y propagado a través del sustrato. Finalmente los pectenes en conjunto con tricobotrios en pedipalpos, los componentes basitarsales (rendijas sensitivas) y los pelos tarsales en las patas median la sensibilidad vibratoria en *C. margaritatus*.

5. Agradecimientos

Quiero agradecer al Instituto Clodomiro Picado, en especial a los miembros de la sección del serpentario: Fabián Bonilla, Aarón Gómez, Carmen Vázques R., Erick Ballestero, Jazmín Arias O., Danilo Chacón y Santos Rodríguez por la colaboración durante la realización de los experimentos y préstamo de equipo. Daniel Briceño por su aporte y consejos.
A Mahmood Sasa M. por la ayuda en el análisis estadístico y revisión del manuscrito original.
Este estudio fue financiado en parte gracias al proyecto 741-A5-048 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

6. Referencias

Abushama, F.T. 1964. On the behaviouor and sensory physiology of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. Anim Behav 12: 140–153.

Armas, L.F. R. Teruel, & F Kovarik. On *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) and closely related species (Scorpiones: buthidae). Euscorpius — Occasional Publications in Scorpiology.132:1-16

Barnett, K.E. & R.B. Cocroft., L.J. Fleishman. 1999. Possible communication by substrate vibration in a chameleon. Copeia 1999: 225–228.

Blass, G.R. & D. Gaffin. 2008. Light wavelength biases of scorpions. Animal Behaviuor 76: 365-373.

Brownell, P. H. 1977. Compressional and surface waves in sand: Used by desert scorpions to locate prey. Science 197: 497–482.

Brownell, P.H.1984. Prey detection by the sand scorpion. Sci Am 251: 86–97.

Brownell, P.H. & R. D. Farley. 1979 a. Detection of vibrations in sand by tarsal sense organs of the nocturnal scorpion, *Paruroctonus mesaensis*. J Comp Physiol A 131: 23–30.

Brownell, P.H. & R. D. Farley. 1979b. Orientation to vibrations in sand by the nocturnal scorpion *Paruroctonus mesaensis*: Mechanism of target localization. J. Comp. Physiol. A 131: 31–38.

Brownell, P.H. 1988. Properties and functions of the pectine chemosensory system of scorpions. Chem Senses 10:557.

Brownell, P.H. 1998. Glomerular Cytoarchitectures in Chemosensory Systems of Arachnids. Annals of the New York Academy of Sciences. Olfaction and taste XII: An international symposium 855: 502-557.

Brownell, P.H. 2001. Sensory ecology and orientational behaviors. 159–183 *In* P. H. Brownell & G. A. Polis (Eds.). Scorpion Biology and Research. New York, NY: Oxford University Press.

Brownell, P.H. & J.L. Hemmen. 2001. Vibration sensitivity and computational theory for prey-localizing behavior in sand scorpions. Am Zool 41: 1229–1240.

Bub, K. & R. F. Bowerman.1979. Prey capture by the scorpion *Hadrurus arizonensis* Ewing (Scorpiones: Vaejovidae). J Archnol 7: 243–253.

Carthy, J. D. 1966. Fine structure and function of the sensory pegs on the scorpion pecten. Experientia 22: 89–91.

Carthy, J. D .1968. The pectines of scorpions. Symposium of the Zoological Society, London, 23: 251–261.

Castellanos, I. & P. Barbosa .2006. Evaluation of predation risk by a caterpillar using substrate-borne vibrations. Anim Behav 72: 461–469.

Cloudsley-Thompson. J, L. 1955.On the function of the pectines of scorpions. Ann Mag Nat Hist 8: 556–560.

Devetak, D., B. Mencinger-Vračko., M. Devetak., M, Marhl. & A. Špernjak. 2007. Sand as a medium for transmission of vibratory signals of prey in antlions *Euroleon nostras* (Neuroptera: Myrmeleontidae). Physiological Entomology 32: 268-274.

Elias, D.O., A.C. Mason., W.P. Maddison. y R.R. Hoy. 2003. Seismic signals in a courting male jumping spider (Araneae: Salticidae). J Exp Biol 206: 4029–4039.

Escobar, E., L. Velásquez. & C. Rivera. 2003. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae). Rev. Peru. biol. 10: 217-220.

Feet, V., G. A. Polis. & W. D. Sissom. 1998. Life in sandy: the scorpion model. J Arid Environ 39:609-622.

Fertin, A. & J. Casas.2007. Orientation towards prey in antlions: efficient use of wave propagation in sand. J Exp Biol 210:3337–3343.

Foelix, R.F. & G. Muller-Vorhorlt.1983. The fine structure of scorpion sensory organs. II. Pecten sensilla. Bulletin of the British Arachnological Society 6: 68–74.

Gaffin, D.D. & P.H. Brownell. 1992. Evidence of chemical signaling in the sand scorpion, *Paruroctonus mesaensis* (Scorpionida: Vaejovidae). Ethology 91:59–69.

Gaffin, D.D., L.W. Kira & P.H. Brownell.1992. Water detection in the desert sand scorpion, *Paruroctonus mesaensis* (Scorpionida, Vaejovidae) J Comp Physiol A. 170: 623-629.

Gaffin, D.D. & P.H. Brownell.1997. Electrophysiological evidence of synaptic interactions within chemosensory sensilla of scorpion pectines. J Comp Physiol A. 181: 301-307

Gaffin, D.D. & P. H. Brownell.1997. Response properties of chemosensory peg sensilla on the pectines of scorpions. J Comp Physiol A. 181: 291–300.

Gaffin, D. D & M.E. Walvoord. 2004. Scorpion peg sensilla: are they the same or are they Different?. Euscorpius — Occasional Publications in Scorpiology. 17:7-15.

Hill, P. S.2001. Vibration and animal communication: A Review. Amer. Zool.41: 1135-1142.

Hill, P. S. 2009. How do animals use substrate-borne vibrations as an information source? Naturwissenschaften.96: 1355–1371

Kladt, N., H. Wolf, & G. H. Harald. 2007. Mechanoreception by cuticular sensilla on the pectines of the

scorpion *Pandinus cavimanus*. J Comp Physiol A. 193: 1033–1043.

Knowlton, E. D. & D. D. Gaffin.2010. A new tip-recording method to test scorpion pecten chemoresponses towater-soluble stimulants. J Neurosci Methods 193: 264–27.

Knowlton, E. & D. Gaffin. 2011 Functionally redundant peg sensilla on the scorpion pecten. J Comp Physiol 197: 895–902.

Krapf, D. 1986. Contact chemoreception of prey in hunting scorpions (Arachnida:Scorpiones). Zoo Anz. 217: 119–129.

Lewis, E.R. & P.M. Narins.1985.Do frogs communicate with seismic signals? Science 227: 187–189.

Melville, J.2000. The pectine of Scorpion: Analysis of Structure and Function, Oregon State University. Doctoral thesis. Oregon EE.UU.

Mencinger-Vracko, B. & D. Devetak. 2008. Orientation of the pit-building antlion larva Euroleon (Neuroptera, myrmeleontidae) to the direction of substrate vibrations caused by prey. Zoology 111.1: 2-8.

Mineo, F. M & K. Del Claro.2006. Mechanoreceptive function of the pectines in the Brazilian Yellow scorpion *Tityus serrulatus*: perception of substrate-borne vibration and prey detection. Acta Ethol 9: 79-85.

O'Connell, C.E., B.T. Arnason. & L.A. Hart. 1997. Seismic transmission of elephant vocalizations and movement. J Acoust Soc Am 102: 3124.

O'Connell-Rodwell, C.E., L.A. Hart. & B.T. Arnason.2001. Exploring the potential use of seismic waves as a communication channel by elephants and other large mammals. Am Zool 41: 1157–1170.

Polis, G. & W. Sissom 1990.Life history. The Biology of scorpions. Stanford University California.California.EE.UU.

Root, T.M. 1990. Neurobiology. p 341–413 *In*: Polis GA (Ed). The biology of scorpions. Stanford University Press, Stanford.

Swoveland, M.C. 1978. External morphology of scorpion pectines. California State University, Master's thesis. San Francisco. EE.UU..

Víquez, C. 1999. Escorpiones de Costa Rica. Scorpions. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Santo Domingo, Heredia.Costa Rica 84 p.

Wolf, H. 2008.The pectine organs of the scorpion, Vaejovis spinigerus: Structure and (glomerular) central projections. Arthropod Struct Dev 37: 67-80.

Young, B.A. 2003. Snake bioacoustics: toward a richer understanding of the behavioral ecology of snakes. Quart Rev Biol 78: 303–32.