

Perfil proteico y de carbohidratos del veneno de la *Scolopendra gigantea*

Protein and carbohydrate profile of *Scolopendra gigantea* venom

Eucandis Fuentes¹  Claudio Granado¹  Carlos Moreno¹  Rafael Fernández¹  Jesús Hernández¹ 

Mario Palacios² 

RESUMEN

Introducción: El ciempiés *S. gigantea* es el responsable de muchos casos de emponzoñamiento en distintas regiones centro-norte de Venezuela, debido a las moléculas constituyentes del veneno, cuyas características no se conocen en esta especie, obstaculizando el desarrollo de tratamientos efectivos, el objetivo de esta investigación fue determinar las proteínas y los carbohidratos del veneno de este centípedo gigante. **Métodos:** Se extrajeron y caracterizaron las proteínas por electroforesis (PAGE) en condiciones nativas (12%) y desnaturalizantes (gradiente discontinuo: 8-12-14%), así como por zimografía para detección de proteasas. Adicionalmente, se caracterizó cualitativamente la presencia de carbohidratos (monosacáridos y disacáridos reductores; aldosas y cetosas; pentosas y hexosas; polisacáridos). **Resultados:** El patrón de bandas proteicas en los geles de 8-14% presentó la mejor resolución, con 28 en condición nativa y 22 en condición reductora de entre 22-250 KDa, observando 4 bandas con actividad serinproteasa (100, 116 y dos ≥ 250 KDa) y 3 bandas con actividad metaloproteasa (51, 26 y 22 KDa). Asimismo, se detectaron cetosas, pero los monosacáridos, disacáridos reductores y el almidón estaban ausentes. **Conclusión:** El veneno de esta especie presenta un patrón proteico y de carbohidratos complejo, con cetosas y actividad de serin y metalproteasas.

Palabras clave: Chilopoda, Ciempiés, veneno, artrópodo, ponzoñoso.

ABSTRACT

Introduction: The *S. gigantea* is responsible for many cases of poisoning, in different north-central regions of Venezuela, due to the constituent molecules of the poison, whose characteristics is not known in this species, which hinders the development of effective treatments, the objective of this research was to determine the proteins and carbohydrates in the venom of this giant centipede. **Methods:** proteins were extracted and characterized by electrophoresis (PAGE) under native (12%) and denaturing conditions (discontinuous gradient: 8-12-14%), as well as by zymography for protease detection. Additionally, the presence of carbohydrates (reducing monosaccharides and disaccharides; aldoses and ketoses; pentoses and hexoses; polysaccharides) was qualitatively characterized. **Results:** The pattern of protein bands in the 8-14% gels presented the best resolution, with 28 in the native condition and 22 in the reducing condition between 22-250 Kda, observing four bands with serine protease activity (100, 116 and two ≥ 250 KDa) and 3 bands with metalloprotease activity (51, 26 and 22 KDa). Likewise, ketoses were detected, but reducing monosaccharides, disaccharides and starch were absent. **Conclusion:** The venom of this species presents a complex protein and carbohydrate pattern, with ketoses and serine and metalloproteases activity.

Keywords: Chilopoda, centipede, venom, arthropod, poisonous.

INTRODUCCIÓN

Los ciempiés pertenecientes al género *Scolopendra* (Clase Chilopoda), son invertebrados ampliamente distribuidos en las zonas subtropicales y tropicales del mundo (1, 2, 3). Su característica principal es la presencia de un par de apéndices modificados, denominados forcípulas (4). A través de dichas estructuras se inocula el veneno, el cual presenta una variedad de agentes tóxicos no bien conocidos, que provocan reacciones adversas a nivel sistémico en los animales que sufren la picadura del ciempiés. (5)

El emponzoñamiento o envenenamiento por cualquiera de las especies del género *Scolopendra*, causa síntomas leves en adultos, tales como debilidad, edema, eritema, parestesia, mareos, dolor de cabeza, fiebre, erupción cutánea general, linfagitis local, celulitis eosinofílica, anafilaxia, necrosis en el lugar de la picadura, así como dolor local de intensidad leve a grave, pudiendo irradiarse a otras partes del cuerpo de la víctima (1, 3, 6, 7, 8, 9), lo cual hace necesario el uso de antihistamínicos por vía oral y endovenosa (5, 10, 11, 12). No obstante, varias especies de ese género son capaces de producir síntomas graves en los seres humanos, como

¹Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), FACyT-UC, Valencia-Venezuela.

²Laboratorio de Biología Marino Costera (BioMaC), FACyT-UC, Valencia-Venezuela.).

Autor de correspondencia: Rafael Fernández 

E-mail: rfernandez2@uc.edu.ve

Recibido: 18-07-2021

Aprobado: 07-01-2022

isquemia e infarto de miocardio, hemoglobinuria, hematuria, hemorragia y rhabdomiolisis (13), y aunque poco frecuente, puede darse una diseminación hematológica de una super infección bacteriana, que puede ameritar cirugía y antibióticos por vía intravenosa. (14)

En Venezuela, la especie *Scolopendra gigantea* es la más conocida debido a su gran tamaño (longitud máxima reportada de 30 cm) (15), así como por su comportamiento agresivo, reportándose envenenamiento por parte de ésta, en asentamientos rurales y urbanos (3, 15). Dichos accidentes, caracterizados por ser de carácter doloroso agudo, con varias horas de duración, son llamados escolopendrismo, y constituyen un problema epidémico debido al incremento del número accidentes al año en extensas regiones del país (16). Así, la mayoría de los reportes mortales por envenenamiento por escolopendra se han dado en individuos de 15 a 34 años (17,18), fundamentalmente, en los Estados Falcón y Miranda (19, 20, 21). Desde el primer accidente reseñado en 1999, en un neonato de 28 días de nacido (6), un aumento progresivo de tales casos ha sido reportado, aparentemente debido al creciente asentamiento de población humana en zonas cercanas a los nichos ecológicos de *Scolopendra gigantea*, indicándose 5 casos en Capaya (Estado Miranda) en el año 2000 (19), 12 casos en todo el país entre 2002 y 2003 (19, 20), 17 casos en la población de Río Seco (Estado Miranda) para 2004 (21), 39 casos entre 2008 y 2009 en todo el país (18, 19), y 8 casos en el 2012 en la población de Adícora (Península de Paraguaná, Estado Falcón) (22). A la fecha, no existen reportes recientes en el país, probablemente debido a la falta de gestión epidemiológica pública en programas de vigilancia y control. Sin embargo, dado el alarmante incremento de casos en América Latina, incluyendo probablemente a Venezuela, se hace necesaria la caracterización bioquímica del veneno de *Scolopendra gigantea*, aunado a los escasos trabajos clínicos, ecoepidemiológicos y toxicológicos en especie de ciempiés. (19, 22)

A nivel global, algunas especies de este género de ciempiés han sido estudiadas para determinar la composición bioquímica del coctel tóxico constituyente de su veneno, y su posible implicación en contactos traumáticos en humanos (1). Así, en la actualidad se conoce que el veneno de estos organismos varía en la concentración de proteínas dependiendo de la masa corporal y tamaño de las forcípulas, así como la frecuencia e intensidad del pulso eléctrico para su extracción (23). En general, el veneno es un líquido homogéneo, transparente y de pH ácido, de composición química variable entre individuos de la misma especie, sin embargo, predomina en el mismo una alta concentración de proteínas (24), pero es poca la información sobre las moléculas biológicamente activas (enzimas y/o toxinas con actividad neurotóxica y/o hemolítica) presentes, que son responsables de la parálisis corporal, digestión de tejidos u otras reacciones sistémicas en la presa (25), siendo las proteasas las principales enzimas involucradas, seguido de las de naturaleza lipopolipeptídicas y glicoproteicas, que actúan como agentes dispersores y maximizadores de las reacciones alérgicas (26). Igualmente, las toxinas que se conocen actúan a nivel sináptico, presináptico o

postsináptico, modulando los canales iónicos de las células excitables (27), trayendo como consecuencia que los tratamientos sean poco específicos y de efectividad limitada en el control y minimización de la patología en personas que han sufrido emponzoñamientos. (28)

Estudios bioquímicos del veneno se han realizado en *S. morsitans* (29, 30, 31), *S. angulata* (31), *S. viridicornis* (32, 33), *S. viridis* (31, 34) y *S. subspinipes* (35), pero en *S. gigantea*, son escasos tales trabajos, y los reportes disponibles se enfocan en aspectos taxonómicos, ecológicos, como los hábitos alimenticios (36), reacciones histopatológicas (lesiones de rhabdomiólisis y necrosis a nivel muscular) al veneno (37), desarrollo de un suero antiescolopéndrico (11) y efecto hemolítico, hemaglutinante y de coagulación. (38)

Dentro de lo que se ha reportado para otras especies, una fracción proteica del veneno de *S. viridis*, afectó el funcionamiento del ganglio del crustáceo *Cambarellus cambarellus*, al modificar la permeabilidad de la membrana de este (a través de los canales de sodio), produciendo la liberación masiva de los neurotransmisores GABA y glutamato, y estuvo constituida por 7 proteínas al realizar SDS-PAGE (39), determinándose que el componente toxico era de 50 KDa con actividad hialuronidasa (40). En el veneno de *S. subspinipes mutilans* denominan al péptido de 4 KDa como Scolopendrina I, con una amplia actividad antimicrobial contra bacterias Gram negativas y positivas, así como para los hongos (35). Posteriormente, se aisló del veneno de *S. subspinipes* a la 3,8-dihidroxiquinolina y a la 2,8-dihidroxi-3,4-dimetoxiquinolina, que actúan como compuestos quelantes (41). Con los venenos de *S. viridicornis nigra* y *S. angulata*, se detectaron proteínas de entre 3 y 20,99 KDa para la primera y de 1 y 22,63 KDa para la segunda (32). Con el veneno de *S. viridicornis*, mediante electroforesis en gradiente de concentración (4-20%), hallaron bandas de proteínas con un peso entre 7 y 190 KDa, con actividad de hialuronidasa, caseinólítica, fibrinógena y proteolítica (1). Adicionalmente, mediante HPLC, se purificó una proteína de 13,72 KDa denominada Scol/Pla, con actividad fosfolipasa en una de las 54 fracciones obtenidas. (34)

Similarmente, con *S. subspinipes mutilans* se caracterizó al Scolopin 1 y 2, como proteínas antimicrobianas para bacterias y hongos, y actividad hemolítica (42). Con esta misma especie, luego se identificaron y analizaron por proteómica y transcriptómica, unas 26 neurotoxinas, con 2 a 4 puentes disulfuros intramoleculares, presentando a su vez capacidad insecticida en *Periplaneta americana* y *Musca doméstica*, al cambiar la modulación de canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje (43). Finalmente, en otro estudio, se identificó y caracterizó un nuevo péptido antitrombótico de 0,34 KDa del veneno de *S. subspinipes mutilans* (44), así como un inhibidor selectivo para el canal de sodio dependiente de voltaje, presentando acción analgésica superior a la morfina en modelos de dolor en roedores. (45)

A la luz de todo lo antes descrito, el objetivo de este estudio fue determinar el perfil proteico y de carbohidratos del veneno de la *S. gigantea*, así como algunas actividades enzimáticas

de tipo proteasas. Esto, con la finalidad de generar las bases bioquímicas necesarias que contribuyan a futuro en la búsqueda de tratamientos farmacológicos específicos, que permitan contrarrestar de manera efectiva la acción dañina de este veneno, ya sea generando moléculas bloqueadoras de las actividades proteolíticas o la inhibición de las posibles neurotoxinas presentes en coctel tóxico. (11)

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismo y muestra del estudio: A partir del veneno extraído de ejemplares de *S. gigantea* de acuerdo a las condiciones experimentales y de bioética establecidas en el Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de FACyT-UC, se obtuvo la dilución de veneno 1:100 en una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) pH 7,4 que se utilizó en este estudio. (38)

Determinación de proteínas totales. Se empleó el método descrito por Bradford (46), mezclando 998 μL de reactivo de Bradford con 2 μL de la dilución del veneno, midiendo luego la absorbancia de la mezcla en un espectrofotómetro (GENESYS 10 UV de THERMO) a una longitud de onda de 595 nm. Se utilizó una curva de calibración de Suero de Albúmina Bovino (BSA) marca SIGMA, en un intervalo de concentraciones de 0,05-2,00 mg/mL.

Perfil electroforético del veneno: Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y con poliacrilamida/dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE), de acuerdo al método de Laemmli (1970) con modificaciones, para generar perfiles proteicos en condiciones nativas y en condiciones desnaturalizantes respectivamente, tanto en gradiente continuo al 12%, como en gradiente discontinuos (8-12-14%), basándose la separación de bandas en este último, en diferencias de densidades del polímero de acrilamida, usando glicerol para este fin. (47)

Así, volúmenes de 20 μL de soluciones de veneno de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fueron depositadas en los pozos de gel. El marcador de peso molecular de referencia, fue el estandarizado y preteñido de BioRad, de intervalo de peso molecular entre 10-250 kDa. La corrida electroforética fue realizada en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAM 3 Electrophoresis Cell de Bio-Rad, a un voltaje constante de 100 V y a 4°C, durante aproximadamente 2 horas, luego de las cuales se tñó el gel con la solución de Coomassie Blue R-250 al 0.1 %p/v (1), revelándose y registrándose los perfiles proteicos mediante el transiluminador Chemidoc XRS system170-8170 de Bio-Rad, para finalmente con el programa Piximetre versión 5.7, medir la migración de las bandas de proteínas a fin de asignar los correspondientes pesos moleculares.

Determinación de la actividad proteasa mediante zimografía: Geles de poliacrilamida 12% p/v, en condiciones nativas (sin agentes reductores) se copolimerizaron con gelatina comercial al 0.1% p/v. La concentración de proteínas colocada en los pozos de los geles de acrilamida fue de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los controles fueron: 20 μL de solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%v/v como negativo, y 20 μL de solución de la enzima tripsina a 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ como control positivo. Las condiciones de la corrida electroforética

fueron idénticas a las ya descritas. Posteriormente, los geles obtenidos fueron sumergidos en una solución de lavado (Tritón X-100 2.5%v/v en agua destilada) para eliminar el SDS. Después se incubó por 18 h en un Tampón de replegamiento (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl₂ 50 mM y NaCl 0.2 M) (48). La aparición de zonas blancas, después de la tinción con coomassie, indica la degradación de la gelatina y por ende actividad proteolítica. La determinación de las bandas proteicas con actividad enzimática, se realizó comparando el zimograma con el perfil proteico de los geles al 12%. La identificación de la naturaleza enzimática de las proteasas, se determinó en nuevos zimogramas, agregando al tampón de replegamiento inhibidores enzimáticos específicos: etileno diamino tetra acético (EDTA) 0.1 M, como inhibidor de metaloproteasas y fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) 10 mM como inhibidor de serin-proteasas. (48)

Determinación cualitativa de carbohidratos presentes en el veneno: Mediante la reacción Molish se determinó la presencia de carbohidratos, mezclando 20 μL de veneno con el reactivo de Molish en relación 2:1, adicionándose luego una parte de HCl concentrado. La reacción positiva se evidenció por la aparición de una interfase de coloración púrpura producto de la formación de un compuesto complejo de furfural o 5 hidroximetilfurfural (49, 50). Como control positivo se usó sacarosa 1% p/v, y como controles negativos se utilizaron urea 1% p/v y TFA 0.1% v/v.

Los monosacáridos y disacáridos reductores, se detectaron usando la reacción de Barfoed, mezclando en relación 1:1, el reactivo y la de 20 μL de muestra de veneno, incubándose en baño de maría a 100°C por 30 min. El hallazgo de un precipitado rojo de óxido cuproso (Cu₂O) a los 2 a 5 min, se debe a la presencia de monosacáridos reductores, y de 7 a 12 min, a la presencia de disacáridos reductores (49, 50). Como controles positivos para monosacáridos reductores se utilizó xilosa 1% p/v, mientras que para disacáridos reductores se utilizó maltosa 1% p/v. Los controles negativos fueron urea 1% p/v y TFA 0.1% v/v.

Las aldosas y cetosas se determinaron mediante la reacción de Seliwanoff, mezclando 20 μL del veneno con el reactivo de Seliwanoff en relación 1:2, incubándose en baño de agua hirviendo (100 °C), el tiempo de aparición de una coloración rojiza a los 2 min evidencia la presencia de cetosas; coloración verde-azulado en más de 2 min indica la presencia de aldosas (49,51). El control positivo utilizado para cetosas fue sacarosa 1% p/v, y para aldosas fue xilosa 1% p/v. Como controles negativos, se emplearon urea 1% p/v y TFA 0.1% v/v. Para pentosas y hexosas, se empleó la reacción de Bial, mezclando el reactivo de Bial con 20 μL del veneno en relación 2:1, sumergiendo luego el tubo en un baño de agua hirviendo, una coloración azul o amarillamarrón demuestra la presencia de pentosas y hexosas respectivamente (49, 50). El control positivo utilizado para pentosas fue xilosa 1% p/v, mientras que para hexosas fue sacarosa 1% p/v. Urea 1% p/v y TFA 0.1% v/v se emplearon como controles negativos. Los polisacáridos se determinaron mediante la reacción de Lugol, mezclando el veneno con el reactivo de Lugol en relación 2:1, la aparición de una coloración violeta o rojiza indica presencia de almidón y

glucógeno respectivamente. Como control positivo se utilizó almidón 1% p/v y como controles negativos urea 1% p/v y TFA 0.1% v/v. (50)

RESULTADOS

Una vez realizadas las corridas electroforéticas, se determinaron los pesos moleculares de las bandas proteicas obtenidas, mediante la curva de calibración de los marcadores de peso molecular, con el correspondiente ajuste de los datos al modelo lineal, obteniéndose excelentes valores del coeficiente de correlación lineal (R) para cada caso (12%: 0,98; 8-14%: 0,97), que validan los pesos moleculares indicados para cada banda proteica del perfil respectivo.

En el perfil proteico en geles al 12% se observaron un total de 22 bandas de proteínas en forma nativa y 17 bandas proteicas bajo condiciones desnaturalizantes, con pesos moleculares entre 250 y 19 KDa. Las bandas ubicadas en la región de 75-20 KDa, fueron las únicas a las que se les determinó el peso molecular mediante el patrón de peso molecular (PPM), ya que las bandas que se presentaban por encima 75 KDa, podrían estar sujetas a subestimación o sobreestimación. Las bandas de 51, 40, 38, 30, 26, 22 y 19 KDa fueron coincidentes en condición nativa y desnaturalizada, es decir, no fueron afectadas por el efecto desnaturalizante del β -mercaptoetanol ni la temperatura. Ciertas bandas presentes en condición nativa desaparecieron en la condición desnaturalizante, posiblemente por rompimiento de puentes disulfuros, que originaron otras bandas proteicas presentes en dicha condición o que incrementaron la cantidad de algunas preexistentes, detectándose 7 bandas las cuales se ubicaron en la región de 74 y 19 KDa (74, 58, 54, 46, 35, 33, 24). (Figura 1).

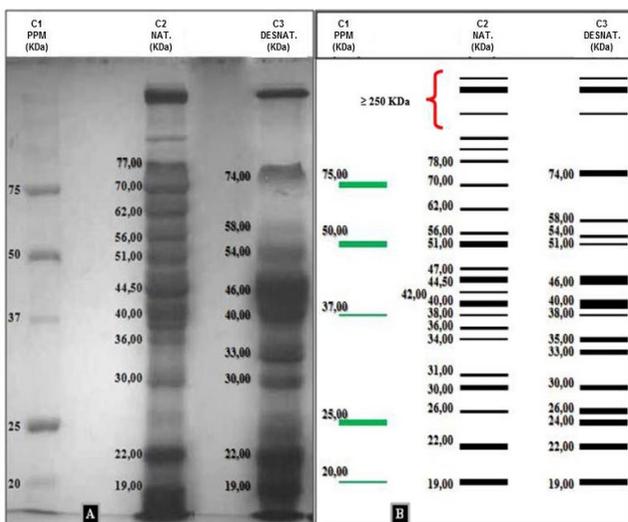


Figura 1. Perfil proteico del veneno de *S. gigantea* en geles de acrilamida-bisacrilamida 12%, en condiciones nativas (NAT.) y desnaturalizantes (DESNAT.). A) Fotografía del perfil proteico del gel teñido con coomassie. B) Esquematación de las bandas del perfil proteico. C1: patrón de peso molecular, PPM; C2: perfil proteico en condición NAT.; C3: perfil proteico en condición DESNAT.

La electroforesis en geles en gradiente 8-14% mejoró la resolución del patrón proteico del veneno, obteniéndose un total de 28 bandas proteicas en condiciones nativas y 22 bandas en condiciones desnaturalizantes, bajo estas condiciones los pesos moleculares de las bandas se ubicaron en la región de los marcadores de pesos molecular. Nuevamente hubo coincidencia de bandas (66, 61, 57, 54, 49, 45, 28, 19 KDa) en las dos condiciones electroforéticas, apareciendo algunas bandas (84, 80, 69, 41, 39, 34, 32, 23, 21, 20, 18 KDa) en la condición desnaturalizante (Figura 2), incrementando estas a 11 las bandas en el intervalo de 75 a 30 KDa, 4 más que en el perfil de 12%.

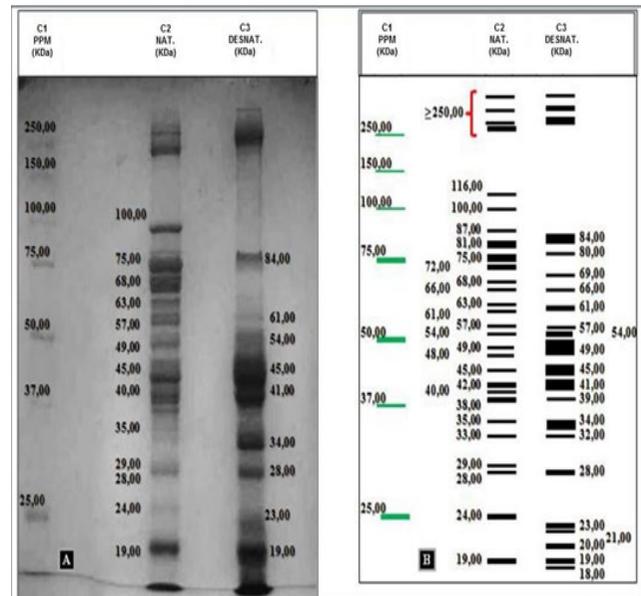


Figura 2. Perfil proteico del veneno de *S. gigantea* en geles de acrilamida-bisacrilamida al 8-14%, en condiciones nativas (NAT.) y desnaturalizantes (DESNAT.). A) Fotografía del perfil proteico del gel teñido con coomassie. B) Esquematación de las bandas del perfil proteico. C1: patrón de peso molecular, PPM; C2: perfil proteico en condición NAT.; C3: perfil proteico en condición DESNAT.

En la evaluación de la actividad de proteasa del veneno de *S. gigantea*, se detectaron 8 actividades proteolíticas evidenciadas por las zonas oscuras (Figura 3A) o claras (Figura 3C) presentes en los geles. Las zonas donde se presentó actividad enzimática fueron: 4 bandas por encima de 75 KDa (2 >250, 116, 100 KDa), 1 banda de 51 KDa, 1 de 34 KDa, y 2 bandas (22 y 26 KDa) cercanas a 25 KDa (Figura 3). La comparación de los geles de la zimografía con el perfil electroforético de acrilamida-bisacrilamida al 12%, indica que las actividades proteolíticas se deben a las bandas de 22, 26, 34, 51, 100 y 116 KDa y 2 bandas ubicadas en la región de proteínas de alto peso molecular, mayores a 250 KDa.

Asimismo, la actividad proteolítica de las bandas fue variable, siendo la banda de 34 KDa la que presentó una mayor actividad. Esta proteasa esta seguida, con respecto a actividad, por las bandas de 26, 22 y 51 KDa, y el resto de las bandas por encima de 100 KDa. (Figura 3).

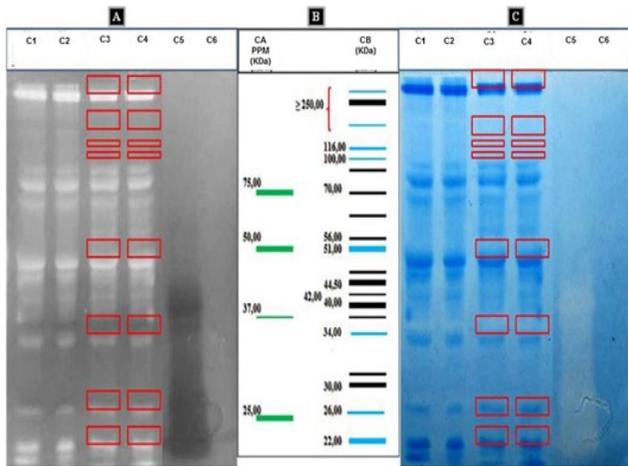


Figura 3. Actividad proteolítica del veneno de *S. gigantea* en gels de acrilamida-bisacrilamida al 12% co-polimerizado con gelatina al 0.1% p/v, en corrida electroforética en condiciones nativas (NAT.) y desnaturalizantes (DESNAT.). **A)** Zimografía registrada fotográficamente a la inversa, con zonas de actividad enzimática denotadas como áreas oscuras; los rectángulos de color rojo representan los sectores donde se dio actividad enzimática. **B)** Esquematación de las bandas del perfil proteico; bandas de color azul, presentaron actividad enzimática. **C)** Zimografía registrada fotográficamente sin variaciones de luz, con zonas de actividad proteolítica, visualizadas como áreas claras; los rectángulos de color rojo representan los sectores donde se evidenció actividad enzimática. **CA:** patrón de peso molecular, PPM; **CB:** esquema de perfil proteico; **C1-C2:** perfil en condición NAT.; **C3-C4:** perfil en condición DESNAT.; **C5:** control positivo (tripsina 0.05 µg/µL); **C6:** control negativo (TFA0.1% v/v).

Al investigar la naturaleza enzimática de las bandas con actividad proteolítica, empleando inhibidores enzimáticos específicos (PMSF: serinproteasas; y EDTA: metaloproteasas), se observó que en el caso del inhibidor PMSF, las bandas con pesos moleculares de 51, 100 y 116 KDa, y las dos bandas mayores a 250 KDa, fueron inhibidas, debido a que no se observaron zonas de degradación en el gel electroforético, indicando que las mismas son serinproteasas (Figura 4). Con respecto al inhibidor EDTA, se apreció que las bandas de 116 KDa, 100 KDa y las dos mayores de 250 KDa, fueron de nuevo inhibidas. Adicionalmente, también las bandas de 51, 26 y 22 KDa, dejaron de presentar actividad enzimática, indicando su posible actividad de metaloproteasas. Mientras que la banda de 34 KDa, presentó una actividad proteolítica leve, pero no disminuyó del todo su actividad enzimática. (Figura 5).

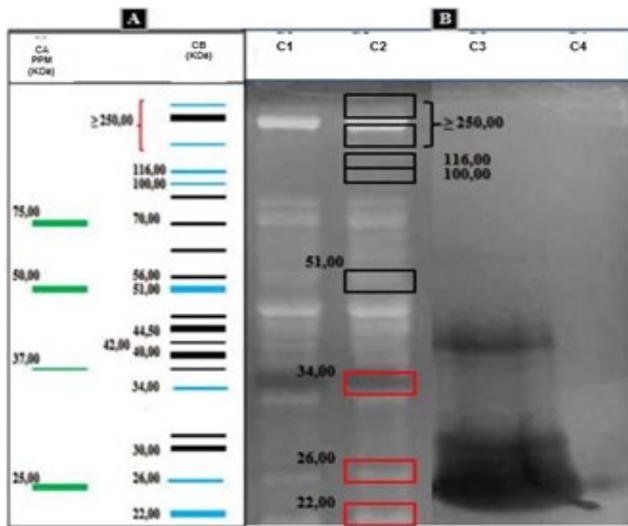


Figura 4. Actividad proteolítica del veneno de *S. gigantea* en gels de acrilamida-bisacrilamida al 12% co-polimerizado con gelatina al 0.1% p/v y 10 mM del inhibidor PMSF, en corrida electroforética en condiciones nativas (NAT.). **A)** Esquematación de las bandas del perfil proteico; bandas de color azul, presentaron actividad enzimática. **B)** Zimografía registrada fotográficamente a la inversa, con sectores sin (rectángulo negro) y con actividad enzimática (rectángulo rojo). **CA:** patrón de peso molecular, PPM; **CB:** esquema de perfil proteico; **C1-C2:** perfil en condición NAT.; **C3:** control positivo (tripsina 0.05 µg/µL); **C4:** control negativo (TFA0.1% v/v).

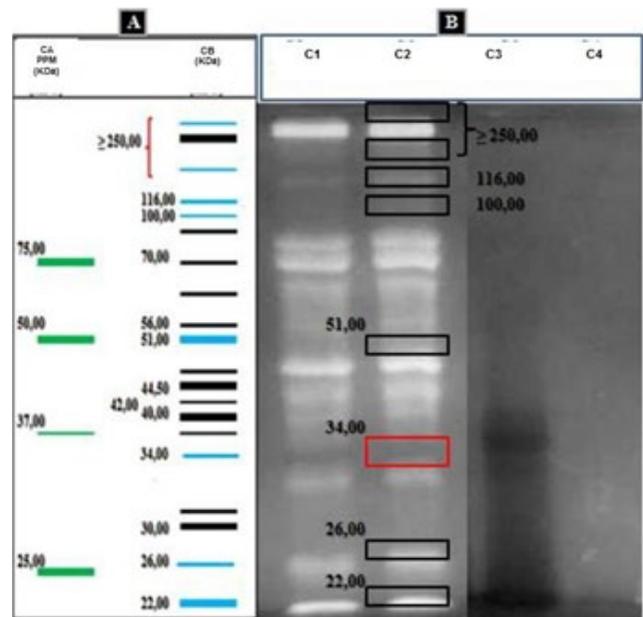


Figura 5. Actividad proteolítica del veneno de *S. gigantea* en gels de acrilamida-bisacrilamida al 12% co-polimerizado con gelatina al 0.1% p/v y 0.1 M del inhibidor EDTA, en corrida electroforética en condiciones nativas (NAT.). **A)** Esquematación de las bandas del perfil proteico; bandas de color azul, presentaron actividad enzimática. **B)** Zimografía registrada fotográficamente a la inversa, con sectores sin (rectángulo negro) y con actividad enzimática (rectángulo rojo). **CA:** patrón de peso molecular, PPM; **CB:** esquema de perfil proteico; **C1-C2:** perfil en condición NAT.; **C3:** control positivo (tripsina 0.05 µg/µL); **C4:** control negativo (TFA0.1% v/v).

Finalmente, al realizar las pruebas bioquímicas cualitativas de carbohidratos en el veneno de *S. gigantea*, se determinaron trazas de los mismos, al dar positiva su presencia mediante la prueba de Molish. Los carbohidratos detectados parecieran no ser polisacáridos, ni monosacáridos o disacáridos, al menos en cantidades detectables, debido a las pruebas negativas de Lugol, de Barfoed y de Bial. No obstante, a través de la reacción positiva a los 8 minutos con el método de Seliwanoff se evidencia la presencia de moléculas de cetosa. (Tabla I).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas cualitativas para carbohidratos en veneno de *S. gigantea*.

Muestra	Reacción				
	Molish	Lugol	Barfoed	Bial	Seliwanoff
Veneno de <i>S. gigantea</i>	+	-	-	-	+

DISCUSIÓN

La elevada concentración de proteínas totales en el veneno de *S. gigantea*, 6.5 veces mayor a lo reportado en la bibliografía para esta especie (38), se corresponde con la cantidad de bandas que se muestran en los perfiles proteicos obtenidos en este trabajo, donde se totalizan 28 bandas en condiciones nativas y 22 bandas en condiciones reductoras, con pesos moleculares que van desde 22 KDa, hasta bandas por encima de 250 KDa. Este perfil proteico resulto más complejo en comparación al reportado en el primer y único trabajo para esta especie (11), donde se detectaron únicamente 10 bandas de proteínas en el intervalo 190 a 6 KDa. Asimismo, se observaron 4 bandas mayores a 250 KDa, lo cual indicó una mejor resolución del veneno en el gel de acrilamida-bisacrilamida 8-14% particularmente en la región de 8%.

Asimismo, por primera vez en esta especie se reportan ocho bandas con actividades enzimáticas del tipo proteasas, con pesos moleculares aproximados de ≥ 250 , 116, 100, 51, 34, 26 y 22 KDa, identificándose mediante inhibición ejercida por PMSF, cuatro bandas con actividad serinproteasa (116, 100 KDa, 2 ≥ 250 KDa) y por inhibición con EDTA, tres bandas (51, 26 y 22 KDa) como metaloproteasas, así como una banda de 34 KDa con una actividad enzimática no determinada.

El veneno de los ciempiés presenta un amplio conjunto de moléculas con diferentes funciones importantes para el desarrollo y supervivencia de los mismos; a través de análisis proteómicos y genómicos se sugiere que este conjunto de moléculas es producto, en gran medida, de la transferencia horizontal de familias de genes de bacterias y hongos (52). Así, las proteínas y péptidos del veneno de ciempiés pudieron asignarse a 61 familias filogenéticamente distintas, incluyendo actividades enzimáticas tales como metaloproteasas, serinproteasas, esterases y fosfolipasas (53). Adicionalmente, los péptidos de bajos pesos moleculares se han caracterizado como agentes antimicrobianos (54, 55, 56, 57, 58, 59), antifúngicos (60), citotóxicos en células cancerígenas (61), anticoagulantes (54, 56), alergénicas (62), hemolíticas e insecticidas (63) y bloqueadores de canales iónicos (64). Uno de los primeros trabajos caracterizando el perfil proteico y de actividad enzimática del veneno de ciempiés, fue con *Scolopendra morsitans*, encontrando 13 bandas proteicas del tipo lipoproteínas, con actividades de esterasa y fosfatasa (65). Con *Scolopendra viridis* se encontraron 40 proteínas de bajo peso molecular, de 17 a 58 KDa, de las cuales dos (37 y 42 KDa) con actividad de hialuronidasa (66). Otros estudios,

reportan en veneno de *Scolopendra subspinipes* 7 bandas proteicas de 22 a 45 KDa, con actividades de proteasas, hialuronidasa y fosfolipasa. (67)

Las proteínas con actividad metaloproteasa están implicadas en la degradación de la matriz extracelular, alterando el fibrinógeno, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos de la membrana basal endotelial, logrando que el veneno se difunda a través de estas membranas (68), igualmente previenen la formación de coágulos de sangre, traduciéndose en una alta actividad hemorrágica (13). La mayoría de los estudios con metaloproteasas se han realizado con otros grupos de animales ponzoñosos como arañas y en particular ofidios, observándose que en la zona de la mordedura se producen edema, ampollas, mionecrosis e inflamación (69), sin embargo, en *S. gigantea*, se reporta rhabdmiolisis (15), un alto efecto hemorrágico, hiperalgésico y miotóxico, que puede estar relacionado con la actividad metaloproteasa (1). En el veneno de la serpiente *Porthidium lansbergii hutmanni*, se detectó la metaloproteasa Porthidin-1 de bajo peso molecular (23 KDa) (68), una molécula de similar peso molecular al encontrado en este trabajo. En escorpiones del género *Androctonus*, se han reportado serinproteasas de pesos moleculares entre 20 y 24 KDa (70), mientras que para *Loxosceles intermedia* (araña marrón del sur de Brasil), se determinaron dos bandas de 85 y 95 KDa con actividad de serinproteasas (71), las cuales al combinarse con metaloproteasas aceleran la proteólisis de las proteínas de las membranas plasmáticas de las células, afectando negativamente la agregación plaquetaria, coagulación y presión sanguínea. Tales efectos han sido también reportados en venenos de varias especies de serpientes, funcionando como activadores de la cascada de coagulación, específicamente en precursores del factor VII, factor X y protrombina. (72)

Aun cuando la mayoría de las enzimas proteolíticas en los extractos de veneno de animales ponzoñosos tienden a ser metaloproteasas, también se pueden presentar otras proteasas con actividad serinproteasa (13), tal como se encontró en este trabajo con *S. gigantea*, aspecto no detectado en la especie *S. viridicornis* (1), y considerándose un nuevo hallazgo para el género *Scolopendra*. Con respecto a las bandas proteicas con actividades enzimáticas distintas, como la de 51 KDa, ha sido reportado que en el veneno de los ciempiés *O. pradoi* y *S. viridicornis*, estas actividades están presentes, identificándolas como una banda de 40-66 KDa (1), o de 50 KDa en *S. viridis*. (40)

La presencia de carbohidratos en el veneno del ciempiés, pero la ausencia de monosacáridos, disacáridos reductores y almidón, podría indicar que los presentes se encuentran asociados a proteínas, constituyendo glicoproteínas conteniendo preferencialmente cetosas, lo cual podría asignarse a una hialuronidasa tal como se reportó para *S. viridicornis* (1). La posible contribución de esta actividad en la amplificación del daño inducido por otras proteasas, facilitaría la dispersión del veneno dentro del organismo

afectado, causando alteraciones en la matriz extracelular (principalmente sobre el ácido hialurónico y condroitin sulfatos), favoreciendo la formación de una lesión local en el sitio de la picadura (1, 73). Es importante resaltar, que aunque se han evidenciado actividades hialuronidasas en venenos de otras especies de *Scolopendra*, ningún trabajo ha dilucidado qué residuos de carbohidratos podrían estar conformando un complejo glicoproteico asociado a estas enzimas. Otra posibilidad sería que las cetosas forman parte de oligosacáridos libres no incorporados a proteínas. No obstante, este trabajo proporciona indicios de que dichos residuos de carbohidratos son cetosas, por lo que se debe diseñar experimentos más específicos para aclarar tal incógnita.

Es deseable que estudios de mayor envergadura se realicen con esta especie de ciempiés, empleando técnicas de avanzada en proteómica, transcriptómica y genómica, porque al igual que con los venenos de serpientes, escorpiones y arañas, el veneno de ciempiés es una fuente excelente de más de 500 secuencias peptídicas para el posible desarrollo de medicamentos que pudiesen ser utilizadas en diferentes tratamientos, así como para bio insecticidas y en la agricultura (74). Las proteínas y péptidos presentes en estos venenos oscilan entre 10 a 250 KDa, mostrando la mayoría de ellos efectos neurotóxicos, actividades enzimáticas del tipo fosfatasa y proteasas, así como también inhibición de canales de K⁺ y Ca²⁺, tal como se ha demostrado en *S. mutilans* (75). Pudiendo también actuar como anticoagulantes en *S. subspinipes* (76).

Los hallazgos de este trabajo respecto las proteínas que presentaron actividad de proteasas en el veneno de *S. gigantea*, podrían constituir el centro de los estudios que evalúen fundamentalmente los efectos sistémicos de estas proteínas, con el fin de elaborar potenciales tratamientos farmacológicos específicos, eficaces y seguros, a fin de establecer de manera eficaz y específica los protocolos de tratamiento farmacológico destinados a contrarrestar las afecciones clínicas producidas por estas.

CONCLUSIONES

El veneno de *Scolopendra gigantea* presentó el perfil proteico de mejor resolución en geles de 8-14%, obteniéndose 28 bandas en condición nativa y 22 en condición reductora de entre 22-250 KDa, observando 4 bandas con actividad serinproteasa (dos ≥ 250 KDa) y 3 bandas con actividad metaloproteasa (51, 26 y 22 KDa). Adicionalmente, se detectaron cetosas, como únicos carbohidratos, que probablemente formen parte de un complejo glicoproteico asociado a enzimas del tipo hialuronidasas. Estos resultados serán la base fundamental para futuros estudios proteómicos, transcriptómicos y genómicos, para la secuenciación de péptidos que permitirán el desarrollo de medicamentos que puedan ser empleados en tratamientos farmacológicos definidos, eficaces y seguros para el emponzoñamiento de este ciempiés.

AGRADECIMIENTOS

Zoológico de Paraguaná y su personal: Marisabel Santana (Directora), Rodrigo y Gregorio (Personal Obrero (Sandra, Emil, Emil de Jesús y Emely). Personal del Departamento de Biología (FACyT-UC), no existiendo conflicto de intereses. El financiamiento de este trabajo fue cubierto con recursos propios de los investigadores, al no existir financiamiento institucional alguno en el país.

REFERENCIAS

1. Malta MB, Lira MS, Soares SL, Rocha GC, Knysak I, Martins R, Guizze SPG, Santoro ML, Barbaro KC. Toxic activities of Brazilian centipede venoms. *Toxicon*. 2008; 52:255-263.
2. Fernández F. Artrópodos y salud humana. *Bol. S.E.A.* 1997; 20:167-191.
3. Lovcheva M, Zlateva S, Marinov P, Sabeva Y. Toxoallergic reactions after a bite from myriapoda, genus *Scolopendra* in Varna región during the periodo 2003-2007. *J IMAB*. 2008; 14:79-82.
4. Edgecombe G, Giribet G. Evolutionary biology of centipedes (Myriapoda: Chilopoda). *Ann.Rev. Entomol.* 2007; 52:151-170
5. Yildiz A, Biçeroglu S, Yakut N, Blir C, Akdemir R, Akili A. Acute myocardial infarction in a young man caused by centipede sting. *Emerg. Med. J.* 2006; 23: e30.
6. Rodríguez A, Gassette J, González A, Ghisoli M. Centipede (*Scolopendra gigantea* Linnaeus 1758) envenomation in a newborn. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2000; 42:341-342.
7. Fung HT, Lam SK, Wong OF. Centipede bite victims: a review of patients presenting to two emergency departments in Hong Kong. *Hong Kong Med J*. 2011; 17:381-385.
8. Veraldi S, Cuka E, Gaiani F. Tropical medicine rounds *Scolopendra* bites: a report of two cases and review of the literature. *I J Dermatology*. 2014; 53:869-872.
9. Haddad V, Haddad P, Teixeira W, Costa J. Venomous and poisonous arthropods: identification, clinical manifestations of envenomation, and treatments used in human injuries. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48(6):650-657.
10. Rodríguez A, Gassette J, González A, Ghisoli M. Envenomation in a new born. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2000;42: 341-342.
11. Parrilla P, Navarrete L, Girón M, Aguilar I, Rodríguez A. Use of henn egg derivaded immunoglobulin against scolopendra (*Scolopendra gigantea*) venom. *Rev. Cien. FCV-LUZ*. 2008; 18: 385-392.
12. Bashir M. Histology and histochemistry of the venom apparatus of the centipede *Scolopendra valida* Lucas 1840 (Chilopoda Scolopendromorpha Scolopendridae). *Trop. Zool.* 2010; 23: 107-115.
13. Undheim EA, King GF. On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon*. 2011; 57:512-524.
14. Agnese P, Carlotta P, Giulia B, Filippo R, Stefania P, Alberto B. An unusual two-stage infection following a scolopendra bite. *Acta Biomed* 2020; 91(14): 1-6.
15. González A, Rodríguez A, Gassette J, Ghisoli M, Sanabria E, Reyes-Lugo M. Aspectos bioecológicos de la escolopendra (*Scolopendra gigantea* Linnaeus 1758) y la actividad histopatológica de su veneno. *Rev Cien FCV-LUZ*. 2000; 10:303-309.

16. Rodríguez A, Ghisoli M, Gassette J, González A, Reyes M. Venezuelan outbreak of venomous accidents produced by centipedes (*Scolopendra gigantea* Linnaeus 1758) (Scolopendromorpha: Scolopendrinae). *Acta Biol Venez.* 2000;20:67-70.
17. Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la República Bolivariana de Venezuela, 2010. Anuario de Mortalidad 2008. Disponible en: <https://www.ovsalud.org/publicaciones/documentos-oficiales/anuario-mortalidad-2008/>. (Acceso 08 de agosto 2017).
18. Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la República Bolivariana de Venezuela, 2011. Anuario de Mortalidad 2008. Disponible en: <https://www.ovsalud.org/publicaciones/documentos-oficiales/anuario-mortalidad-2009/>. (Acceso 08 de agosto 2017).
19. Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la República Bolivariana de Venezuela, 2003. Anuario de Mortalidad 2002. Disponible en: <https://www.ovsalud.org/publicaciones/documentos-oficiales/anuario-mortalidad-2002/>. (Acceso 08 de agosto 2017).
20. Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la República Bolivariana de Venezuela, 2004. Anuario de Mortalidad 2003. Disponible en: <https://www.ovsalud.org/publicaciones/documentos-oficiales/anuario-mortalidad-2003/>. (Acceso 08 de agosto 2017).
21. Acosta ME, Carzola DJ. Envenenamiento por ciempiés (*Scolopendra* sp.) en una población rural de la zona semiárida del estado Falcón, Venezuela. *Rev Invest Clin.* 2004; 56:712-717.
22. Cazorla DJ, Loyo JE, Lugo LN, Acosta ME, Morales P. Aspectos clínicos, epidemiológicos y de tratamiento de 11 casos de envenenamiento por ciempiés en Adícora, Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela. *Acta Toxicol Argent.* 2012; 20:25-33.
23. Cooper A, Fox G, Nelsen D, Hayes W. Variation in venom yield and protein concentration of the centipedes *Scolopendra polymorpha* and *Scolopendra subspinipes*. *Toxicon.* 2014; 82: 30-51.
24. Monzón FJ, Blasco RM. Patología causada por artrópodos de interés toxinológico y alergológico. *Bol S.E.A.* 1997; 20:193-215.
25. Calvete J, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutierrez J. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters.* 2009; 583: 1736-1743.
26. Borges A, De Souza L. Escopionimos en Venezuela: una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. *Rev. Fac. Farm.* 2006; 69: 15-27.
27. Gawade S. Therapeutic alternatives from venoms and toxins. *Indian J. Pharmacol.* 2007; 39: 260-264
28. Cazorla D, Loyo J, Lugo L, Acosta M, Morales P. Aspectos clínicos, epidemiológicos y de tratamiento de 11 casos por envenenamiento por ciempiés en Adícora, Península de Paraguaná, Estado Falcón, Venezuela. *Acta Toxicol. Argent.* 2012; 20: 25-33.
29. Balit C, Harvey M, Waldock J, Isbister G. Prospective study of centipede bites in Australia. *J.Toxicol.Clinic. Toxicol.* 2004; 42: 41-48.
30. Rowland M, Edwards G, Chagas A. Introduction of the centipede *Scolopendra morsitans* L., 1758, into northeastern Florida, the first authentic north American record, and a review of its global occurrences (Scolopendromorpha: Scolopendridae: Scolopendrinae). *Entomol News.* 2005; 116: 39-58.
31. Cupul F. *Scolopendra viridis* Say, 1821. Chilopoda: scolopendromorpha: scolopendridae. *Dugesiana.* 2007; 14: 53-57.
32. Rates B, Bemquerer M, Richardson M, Borges M, Morales R, De Lima M, Pimenta A. Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis* nigra and *Scolopendra angulate* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on venoms from a neglected group. *Toxicon.* 2007; 49: 810-826.
33. Bhagirath B, Chingtham B, Mohen Y. Venom of a hill centipede *Scolopendra viridicornis* inhibits growth of human breast tumor in mice. *Indian J. Pharmacol.* 2006; 38: 291-292.
34. González L, García E, Segovia L, Gutierrez M, Possani L. Venom from the centipede *Scolopendra viridis* say: purification, gene cloning and analysis phylogenetic of a phospholipase A2. *Toxicon.* 2009; 54: 8-15.
35. Wenhua R, Shuangquan Z, Daxiang S, Kaiya Z, Guang Y. Induction, purification and characterization of an antibacterial peptide scolopendrin I from the venom of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 2006; 43: 88-93.
36. Molinari J, Gutierrez E, De Ascençap A, Nasar J, Arends A, Márquez R. Predation by giant centipedes *Scolopendra gigantea*, on three species of bats in Venezuelan caves. *Carib. J. Scie.* 2005; 41: 340-346.
37. González A, Rodríguez A, Gassette J, Ghisoli M, Sanabria E, Reyes M. Aspectos bioecológicos de la escolopendra (*Scolopendra gigantea* Linnaeus 1758) y la actividad histopatológica de su veneno. *Rev. Cien. FCV-LUZ.* 2000; 10: 303-309.
38. Fuentes E, Granado C, Moreno C, Fernandez R, Palacios M. Efecto hemolítico, hemaglutinante y de coagulación del veneno de *Scolopendra gigantea*. *Rev. SALUS. UC* 2020; 24(3):19-25.
39. Gutiérrez M, Abarca C, Possani L. A toxic fraction from *Scolopendra* venom increases the basal release of neurotransmitters in the ventral ganglia of crustaceans. *Comp. Biochem. Phys. Part C.* 2003; 135: 205-214.
40. Muñoz B, Valladares M, Gutiérrez M. Aislamiento y caracterización del péptido responsable de la actividad hialuronidasa presente en el veneno del ciempiés (*Scolopendra viridis* Say, 1821). XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, México. 2005
41. Yoon M, Jeong T, Park D, Xu M, Oh H, Song K, Lee W, Park H. Antioxidant effects of quinolinealkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 735-739.
42. Peng K, Kong Y, Zhai L, Wu X, Peng J, Liu J, Yu H. Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. *Toxicon.* 2010; 55: 274-279.
43. Yang S, Liu Z, Xiao Y, Li Y, Rong M, Liang S, Zhang Z, Yu H, King G, Lai R. Chemical punch packed in venoms makes centipedes excellent predators. *Mol. Cell. Prot.* 2012; 11: 640-650.
44. Kong Y, Huang S, Shao Y, Li S, Wei J. Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J. Ethnopharm.* 2013; 145: 182-186.
45. Yang S, Xiao Y, Khang D, Liu J, Li Y, Undheim E, Klint J, Rong M, Lai M, King G. Discovery a selective Nav1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models. *PNAS.* 2013; 10: 1073-1079.
46. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem.* 1976; 72:248-254.

47. Moreno C, Fernández R, Valbuena O. Caracterización electroforética de las proteínas del endospermo de variedades venezolanas de arroz venezolanas. *Bioagro*. 2017; 29(1): 37-44.
48. Hernández R, Guzmán X, García R, Ascencio F, Sierra A, Vallejo B, Gonzalez A, Torres M, Guerrero I. Extracción y caracterización de proteasas de pepino de mar *Isostichopus fuscus*, recolectado en el Golfo de California, México. *Rev Mex Ingeniería Química*. 2015; 14(1):: 35-47.
49. Sanz B. *Bioquímica experimental: un manual de laboratorio*. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. 1967
50. Ode J, Nwaehujor M, Onakpa M. Evaluation of antihemorrhagic and antioxidant potenciales of *Crinum jagus* Bulb. I. *J. App. B. Pharmacol. Technol*. 2010; 3: 1330-1336.
51. Dutra R, Lourenço R, Cardozo G. A novel method for measuring fructose ingestion by mosquitoes. *J. Vect. Ecol*. 2008; 33: 225-231.
52. Undheim E, Jenner R. Phylogenetic analyses suggest centipede venom arsenals were repeatedly stocked by horizontal gene transfer. *Nature Communications* 2021;12(1):818-831.
53. Undheim E, Fry B, King G. Centipede Venom: Recent Discoveries and Current State of Knowledge. *Toxins*. 2015; 7: 679-704.
54. Kong Y, Hui J, Shao Y, Huang S, Chen H, Wei J. Cytotoxic and anticoagulant peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans* venom. *African J Pharm & Pharmacol*. 2013; 7(31):2238-2245.
55. Yoo W, Lee J, Shin Y, Shim J, Jung M, Kang B, Oh J, Seong J, Lee H, Kong H, Song K, Yun E, Kim I, Kwon Y, Lee D, Hwang U, Park J, Hwang J. Antimicrobial peptides in the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Funct Integr Genomics*. 2014; 14:275–283
56. Lee W, Hwang J, Lee D. A novel antimicrobial peptide, scolopendin, from *Scolopendra subspinipes mutilans* and its microbicidal mechanism. *Biochimie*. 2015; 118:176-184.
57. Chaparro E, Da Silva P. Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. *International J Antimicro Agents*. 2016; 48: 277–285.
58. Lamiyan A, Dala R, Kumar N. Venom peptides in association with standard drugs: a novel strategy for combating antibiotic resistance – an overview. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2020; 26(4):1-15.
59. Rodríguez C, Gutiérrez M. Antimicrobial Activity of SPC13, New Antimicrobial Peptide Purified from *Scolopendra polymorpha* Venom. *Anti-Infective Agents*. 2020; 18: 233-238.
60. Choi H, Hwang J, Lee D. Antifungal effect and pore-forming action of lactoferricin B like peptide derived from centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Biochimica & Biophysica Acta*. 2013; 1828: 2745–2750
61. Lee J, Kim I, Kim S, Kim M, Yun E, Nam S, Ahn M, Kang D, Hwang J. Anticancer Activity of the Antimicrobial Peptide Scolopendrasin VII Derived from the Centipede, *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2015; 25(8):1275–1280.
62. Lan, X, Zhao, F, Wang Q, Lie J, Zeng L, Zhang Y, Lee W. Isolation and characterization of the major centipede allergen Sco m 5 from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Allergology International*. 2021; 70: 121-128.
63. Liu Z, Liang J, Lan X, Li T, Zhang J, Zhao F, Li G, Chen P, Zhang Y, Lee W, Zhao F. Comparative analysis of diverse toxins from a new pharmaceutical centipede, *Scolopendra mojiangica*. *Zoological Res*. 2020; 41(2):138–147.
64. Chu Y, Qiu P, Yu R. Centipede Venom Peptides Acting on Ion Channels. *Toxins*. 2020; 12(4): 230-247.
65. Mohamed Z, Abu-Sinna G, EL-Shabaka, H, Abdel-Aal A. Proteins, lipids, lipoproteins and some enzyme characterization the venom extract from the centipedes *Scolopendra morsitans*. *Toxicon*. 1983; 21(3):371-377.
66. González L, Pedraza M, Diego E, Restano R, Batista C, del Carmen M, D. Possani L. Proteomic characterization of the venom and transcriptomic analysis of the venomous gland from the Mexican centipede *Scolopendra viridis*. *J Proteomic*. 2014; 111:224-237.
67. Meunchan M, Uawonggul N, Incamnoi P, Sukprasert S, Rungsa P, Somdee T, Roytrakul S, Thammasirak S, Daduang S. Identification of Bioactive Molecules from Thai Centipede, *Scolopendra subspinipes dehaani*, Venom. *Chiang Mai J. Sci*. 2016; 43(1): 1-10.
68. Girón M, Estrella A, Sánchez E, Galán J, Tao A, Guerrero B, Salazar A, Rodríguez A. Purification and characterization of a metalloproteinase, Porthidim-1, from the venom of Lansberg's hog-nosed pitvipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*). *Toxicon*. 2011; 57: 608-618.
69. Gutiérrez J, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochem*. 2000; 82:841–850.
70. Caliscan F, Sivas H, Sahim Y. A preliminary study for the detection of gelatinolytic proteases from the scorpion *Androctonus crassicauda* (Turkish black scorpion) venom. *Turk. J. Biochem*. 2009; 34: 148-153.
71. Veiga S, Zanetti V, Brazza A, Mangili C, Gramski W. Extracellular matrix molecules as targets for Brown spider venom toxins. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2001; 7: 853-850.
72. Manjunatha R. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb*. 2005; 34: 200-204.
73. Delgado J, M. Palomino F, Lazo E, Rodríguez E, Ramírez R, González E, Severino R, Yarlequé A. Purificación y algunas propiedades de una hialuronidasa del veneno de *Bothrops brazili* "jergón shushupe". *Rev. Soc. Quím. Perú*. 2013; 79(4): 348-358.
74. Hakim A, Yang S, Lai R. Centipede Venoms and Their Components: Resources for Potential Therapeutic Applications. *Toxins* 2015; 7: 4832-4851.
75. Zhao F, Lan X, Li T, Xiang Y, Zhao F, Zhang Y, Lee W. Proteo transcriptomic Analysis and Discovery of the Profile and Diversity of Toxin-like Proteins in Centipede. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018; 17(4):709-720.
76. Liu Z, Zhang R, Zhao F, Chen Z, Liu H, Wang Y, Jiang P, Zhang Y, Wu Y, Ding J, Lee W, Zhang Y. Venomic and Transcriptomic Analysis of Centipede *Scolopendra subspinipes dehaani*. *J. Proteome Res*. 2012; 11: 6197–6212.