

ESCORPIONES DE IMPORTANCIA MÉDICA EN EL ESTADO DE GUANAJUATO, IDENTIFICACIÓN, PERFIL PROTEICO DEL VENENO Y BIOENSAYOS EN *MUS MUSCULUS* CEPA BALB/c

Bueno González, Juan Antonio (1), Chávez Haro, Alfredo Luis (2), Ramírez Gómez, Xóchitl Sofía (3), Rodríguez Miranda, Esmeralda (4), Colli Mull, Juan Gualberto (5).

1 [Lic. Biología, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [buenohomieswestern@hotmail.com]

2 [Centro anti-alacrán, Guanajuato, Unidad León, Cruz Roja Mexicana] | Dirección de correo electrónico: [aracnidopeligroso@hotmail.com]

3 [Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [xosofira2002@yahoo.com.mx]

4 [Departamento de Medicina Y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [esmermmx@yahoo.com.mx]

5 [Lic. Biología, Campus Irapuato, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [jcolli@itesi.edu.mx]

Resumen

En nuestro país se tienen registradas 17 especies de escorpiones de importancia médica, estas pertenecen a la familia Buthidae, al género *Centruroides* y su veneno está compuesto principalmente por proteínas y péptidos de bajo peso molecular que son los causantes de las complicaciones médicas, por lo anterior los objetivos del presente trabajo fueron, Identificar taxonómica y molecularmente a los escorpiones mediante el uso de claves dicotómicas y con el gen citocromo oxidasa subunidad1, realizar un análisis de la composición proteica del veneno por SDS-PAGE, y realizar bioensayos con el veneno de escorpiones en ratones cepa Balb/c. La identificación taxonómica y molecular confirmo las especies *C. ornatus* y *C. infamatus*. En el perfil proteico se observó una gran cantidad de péptidos de bajo peso molecular, de menos de 10 kDa, estos se encuentran en el rango de peso algunas toxinas descritas del veneno de otros escorpiones, por lo cual se refiere que los péptidos observados en el perfil proteico pueden ser los causantes de la intoxicación. Finalmente en los ratones se observó un cuadro clínico caracterizado por: Inquietud, prurito, sialorrea, taquicardia, bradicardia, disnea, convulsiones y muerte, este cuadro clínico es similar al reportado en humanos.

Abstract

In our country there are registered 17 species of scorpions of medical importance, these belong to the Buthidae family, genus *Centruroides* and their venom is composed mainly of proteins and peptides of low molecular weight, are causing medical complications, for the things previously said, the objectives of this study is to identify taxonomic and molecularly of the scorpions using dichotomous keys, and gene Cytochrome c oxidase subunit 1, an analysis of the protein composition of venom by SDS-PAGE and bioassays with the venom of scorpions in mice strain Balb/c. Taxonomic and molecular identification confirmed *C. ornatus* and *C. infamatus* species. In the protein profile a large number of peptides of low molecular weight, less than 10 kDa were observed, these are in the weight range of some toxins described in poison in some scorpions, so we suspect that, the peptides in the protein profile are the cause of the poisoning. Finally in mice we observed a clinical picture characterized by: Restlessness, pruritus, increased salivation, tachycardia, bradycardia, dyspnea, convulsions and death, this clinical picture is similar had been reported in humans.

INTRODUCCIÓN

Los escorpiones habitan en la mayoría de la superficie terrestre exceptuando zonas frías como los casquetes polares o cumbres nevadas, no todos son de importancia médica en cuanto a su picadura [1]. Todos los escorpiones poseen veneno pero solo el de algunas especies es de importancia médica para el hombre [2]. Actualmente para México se registran 262 especies de escorpiones las cuales pertenecen a 8 familias, Vaejovidae cuenta con la mayor diversidad seguida de Diplocentridae y en tercer lugar Buthidae, esta última cuenta con 2 géneros y 41 especies de las cuales 40 pertenecen al género *Centruroides*, este es de suma importancia ya que 17 de las especies pertenecientes a este género son las responsables del problema conocido como alacranismo [3]. El alacranismo se refiere al estudio de la biología del escorpión (alacrán), las implicaciones médicas, epidemiológicas, ecológicas, culturales y sociales que surgen por el envenenamiento que provoca la picadura del mismo [4]. La gravedad del envenenamiento por picadura de escorpión depende de la especie y de las condiciones fisiológicas, el estado de salud y si se inyecta o no veneno en el paciente [5]. El envenenamiento provoca la estimulación del sistema nervioso y/o la incapacidad de los órganos de utilizar los sustratos metabólicos lo que produce falla en estos y por consiguiente la muerte [2]. El veneno de los escorpiones es neurotóxico, la picadura presenta síntomas en un periodo de 30 minutos a 1 hora, y generalmente se debe atender al afectado en un periodo no mayor a dos horas para evitar problemas graves [6]. El veneno de escorpión está compuesto por diversos componentes de los cuales las proteínas y péptidos de bajo peso molecular son los más importantes. En cuanto a los péptidos existen tres tipos, los de cadena corta que van de 31 a 39 aminoácidos son específicos para el bloqueo de canales de potasio, los segundos están compuestos por gran cantidad de polipéptidos de cadena mediana de 61 a 70 aminoácidos que interfieren el flujo de los iones de sodio a través de

la membrana celular y el último tipo está compuesto por polipéptidos de cadena larga contienen más de 130 aminoácidos que actúan sobre los canales de calcio [5]. En México se reportan más de 250,000 casos al año [7]. En un estudio realizado entre 2006 y 2012 en centro y occidente de México el estado de Guanajuato ocupó el 7º lugar en cuanto a incidencia con 3,541.90 casos por cada 100,000 habitantes y el 6º lugar en mortalidad con 9 casos por cada 100,000 habitantes [3]. En un estudio realizado en el estado de Guanajuato entre 2000 y 2005 se reportaron más de 24,000 casos por año en promedio y una mortalidad de 3 (3 muertes por envenenamiento en promedio por año), también se observó que los municipios más poblados como León o Irapuato presentan una mayor incidencia [4].

En la actualidad la picadura de escorpión es un problema de salud pública notable de importancia en México por las diversas complicaciones que presentan los pacientes y las muertes que sigue ocasionando. Es importante identificar correctamente a las especies involucradas en la picadura, analizar el veneno, y conocer los efectos que este puede causar, con el fin de generar nuevo conocimiento para abordar el problema de alacranismo de una manera más eficiente. El conocimiento que se genere a partir de este y otros estudios similares apoyará la planeación de acciones específicas en localidades y regiones de mayor riesgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y mantenimiento

Los escorpiones utilizados fueron proporcionados por la Cruz Roja Mexicana Unidad León Gto. Los especímenes se preservaron en recipientes de plástico con arena en óptimas condiciones de acuerdo con de Roodt A. R. [2].

Identificación

- *Identificación taxonómica*

Se llevó a cabo utilizando las claves dicotómicas según Ponce Saavedra y Oscar F. Francke [8].

- *Identificación molecular*

Se diseñaron oligos específicos para el gen Citocromo c oxidasa subunidad I (Directo: COICVF, Reverso: COICVR), se realizó la extracción de ADN, reacción en cadena de polimerasa (programa PCR: 94°C-50 segundos, 51°C-1 minuto, 72°C-1 minuto, por un periodo de 35 ciclos), purificación de la PCR, y la identificación del gen Citocromo oxidasa subunidad 1 por secuenciación.

Análisis del veneno

- *Obtención del veneno*

El veneno se obtuvo estimulando al escorpión con una descarga eléctrica de 127 volts, usando la corriente directa de la toma. El veneno se resuspendió en PBS y se conservó a 4°C.

- *Cuantificación de proteínas por método de Bradford*

La cantidad proteína del veneno total se cuantificó por el método de Bradford en espectrofotómetro UV/Vis Genesys 10, a 595nm por método de Bradford [9]

- *SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)*

Las proteínas del veneno se separaron en geles de poliacrilamida al 12% y se tiñeron con nitrato plata, se cargaron 5 µg de las muestras en el gel.

Evaluación de los efectos del veneno del escorpión *Centuroides infamatus* en ratones cepa Balb/c.

- *Animales de experimentación*

Se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c de aproximadamente 12 semanas de edad, con peso promedio de 35 g + 5 g y se dividieron en 2 grupos de n=5. Los roedores fueron proporcionados por el bioterio del Departamento de Medicina y Nutrición, Campus León de la

Universidad de Guanajuato. Se mantuvieron y manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 [10].

- *Evaluación del efecto del veneno en el animal integro*

Se realizó un pool de veneno de escorpiones de la especie *C. infamatus* y se resuspendió en PBS, una vez cuantificada la cantidad total de proteínas se administró vía intramuscular (i.m. una dosis, de 10 µg de proteína de veneno/ratón. El grupo control (n=5) recibió vía i.m. PBS. Se registraron el tiempo de latencia, signos y síntomas, así como la duración del cuadro clínico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificó a las especies *C. ornatus* y *C. infamatus*, (IMÁGENES: 1 y 2) usando tanto técnicas moleculares así como la taxonomía morfológica que en conjunto nos da una identificación más confiable. Esto coincide con los resultados de Ponce Saavedra y Oscar F. Francke [3], ellos reportaron su presencia en el estado de Guanajuato.

Se observó una diferencia notable en la concentración de los péptidos de bajo peso molecular, en comparación con especies de escorpiones que no se consideran de importancia médica (IMAGEN 3). De acuerdo con Chávez-Haro [5], los péptidos que provocan la intoxicación son de cadena corta y mediana, probablemente los que se observaron en el gel de poliacrilamida, (debajo de los 10 kDa) corresponden a estos péptidos.

En los bioensayos se observaron diferentes síntomas como: Inquietud, prurito, sialorrea, taquicardia, bradicardia, disnea, y muerte, muy similares a los que reportó. Chávez-Haro [5] en humanos.

CONCLUSIONES

Se identificó a las especies *C. ornatus* y *C. infamatus*, de acuerdo con la literatura estas son las especies reportadas para el estado de Guanajuato, la parte molecular sirvió para agrupar

a las especies en la familia Buthidae y género *Centruroides*.

En el perfil proteico del veneno se observó que hay diferencia en cuanto a la cantidad y concentración de péptidos de especies de importancia médica con las que no lo son, probablemente esta diferencia sea la principal causante de la intoxicación en mamíferos.

Los efectos tóxicos observados son semejantes a los reportados en humanos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato donde se llevó a cabo gran parte del proyecto, a mis profesores, la Dra. Varinia López Ramírez del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por su ayuda en la parte bioinformática del proyecto, al Dr. Sergio Martínez de la Universidad Juárez del Estado de Durango por su ayuda en la parte de la extracción del veneno, a la MVZ Ana Cristina Araiza Martínez (Responsable de Bioterio) y Miriam Guzmán Salas (personal operativo) por las facilidades otorgadas en el bioterio, al Departamento de Medicina y Nutrición, DCS, Universidad de Guanajuato, Campus León por la facilidad para realizar los bioensayos, y a todos mis compañeros y profesores que en parte aportaron algo para este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] de Roodt, A. R. (2009). Estudio del veneno de algunos escorpiones de importancia médica de la Argentina. Tesis de maestría. Buenos Aires: Universidad Nacional de San Martín.
- [2] de Roodt, A. R. Lanari, L. C., Laskowicz, R. D., Costa de Oliveira, V. (2014). Identificación de los escorpiones de importancia médica en la Argentina. *Acta Toxicológica*. 22(1), 5-14.
- [3] Ponce, J., Francke, O. F. (2013). Actualización taxonómica sobre alacranes del Centro Occidente de México. *Dugesiana*, 20(2), 73-79.
- [4] Castillo, J., Velasco, E., Ramírez, E. J., Vargas, E., Lara, E., Rivera, M. E. (2007). Distribución Geográfica del Alacranismo en el Estado de Guanajuato, 2000-2005. *Acta universitaria*, 17(2), 12-18.
- [5] Chávez-Haro, A. L. (2011). Alacranismo en León Guanajuato. En D'Suze G., Corzo B. G., Paniagua S. J. (Eds.), *Emergencias por Animales Ponzosos en las Américas* (pp. 15-30) México: Instituto Bioclon, SA de CV.

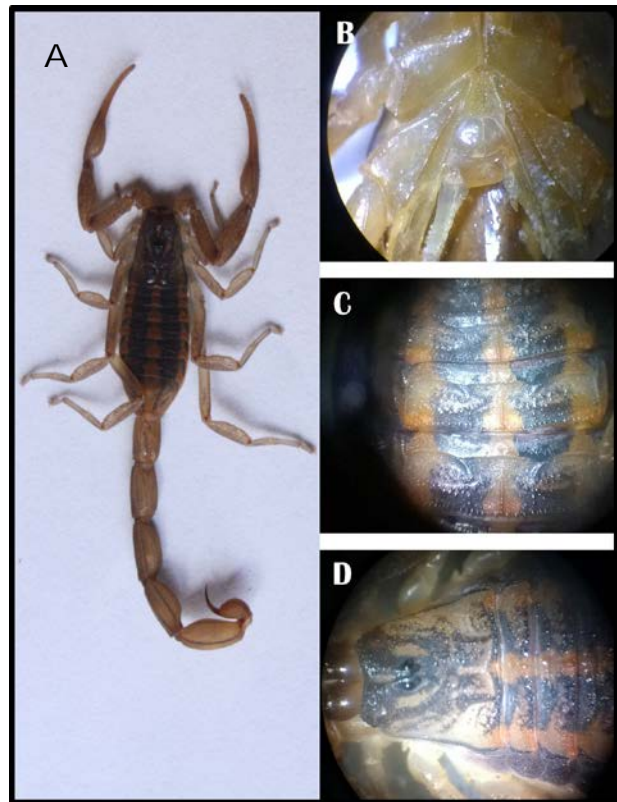
[6] Possani L. D. (2005) El alacrán y su piquete. Gobierno del Distrito Federal y Dirección General de Divulgación de la Ciencia. UNAM. 23 pp.

[7] Chávez-Haro, A. L. & Ortiz, E. (2015). Scorpionism and Dangerous Species of Mexico. En Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F. Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R.C (Eds). *Scorpions Venoms* (pp. 201-213). México: Springer Science+Business.

[8] Ponce, J., Francke, O. F. (2013). Clave para la identificación de especies de alacranes del género *Centruroides* Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el Centro Occidente de México. *Biológicas*, 15(1), 52-62.

[9] Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (72), 248-254.

[10] Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Consultada en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf> (fecha de consulta 02-05-2016)



laterales sin pigmento y pequeñas áreas claras en la zona de los ojos laterales, que son características de la especie.

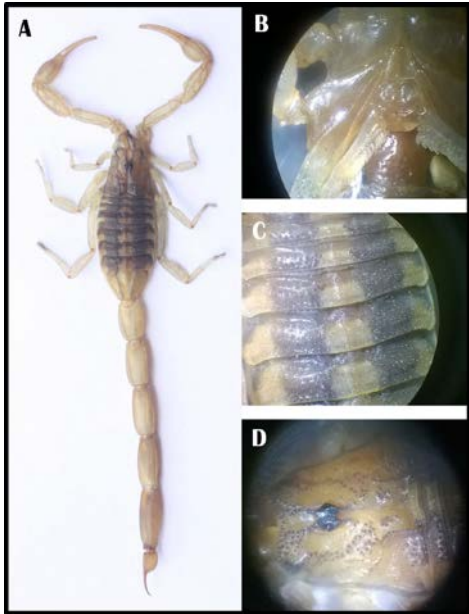


IMAGEN 2: *C. infamatus*, A; escorpión completo, B; área ventral donde se puede apreciar el esternón en forma triangular característico de la familia Buthidae y del género *Centruroides*, C; las franjas oscuras presentes en el área dorsal del mesosoma tienen más o menos la misma anchura que la faja clara mesal, D; carapacho pigmentado difusamente sin pigmento en las áreas laterales junto a los ojos laterales y parte anterior del surco medio, todas características de la especie.

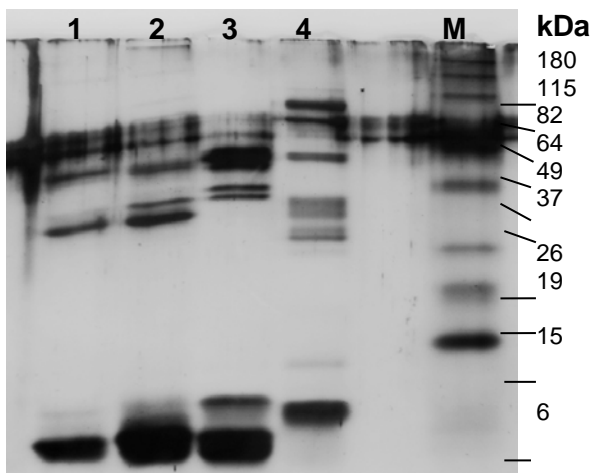


IMAGEN 3: Gel de acrilamida al 12% en el cual la muestra 1=*C. ornatus*, 2=*C. ornatus*, 3=*C. ornatus* los cuales son pertenecientes al género *Centruroides* y 4=*Megacormus* sp. Perteneciente a la familia Euscorpiidae.