

VARIACION ESTACIONAL DEL VENENO DE HADRUROIDES LUNATUS (KOCH) (SCORPIONIDA: VEJOVIDAE) Y SU ACTIVIDAD PARALIZANTE SOBRE PORCELLIO LAEVIS KOCH (CRUSTACEA: ISOPODA)¹Gonzalo Castro²Alfonso Zavaleta³Ramiro Castro de la Mata³**RESUMEN**

El veneno de *H. lunatus* (Koch, 1967) (Scorpionida, Vejovidae) fue obtenido mediante estimulación eléctrica, demostrándose variación estacional significativa en el volumen, peso desecado y contenido protéico. Se describen los efectos tóxicos paralizantes del veneno de *H. lunatus* sobre *Porcellio laevis* (Crustacea: Isopoda). La toxicidad del veneno varió estacionalmente siendo máxima en Primavera y mínima en Verano.

No se encontró correlación directa entre las variaciones estacionales encontradas en los parámetros estudiados y la toxicidad en crustáceos.

Se discuten las implicancias ecológicas de las variaciones estacionales de la toxicidad. Se comparan los efectos tóxicos del veneno de *H. lunatus* y *Androctonus sus-tralis*, en crustáceos y mamíferos.

SUMMARY

Hadruides lunatus venom, obtained through electrical stimulation, shows significant seasonal differences in volume, dry weight and protein content; also there was a significant difference in toxicity over crustacea, being higher

in spring and lower in summer; winter and fall were intermediate. There is no correlation between toxicity and the variations in volume, weight and protein content. Possible ecological significance is discussed.

INTRODUCCION

La alimentación de *Hadruides lunatus* está basada en pequeños coleópteros, en crustáceos del género *Porcellio* y en arácnidos que habitan en las Lomas (1). Para alimentarse, el escorpión coge a la presa fuertemente con los pedipalpos, inyectándole inmediatamente el veneno por medio del aguijón o acúleos. El veneno escorpiónico posee fracciones tóxicas con actividad paralizante sobre los artrópodos y crustáceos de pequeño tamaño (33, 35-38) permitiendo al arácnido alimentarse de la presa previamente inmovilizada. Esta actividad tóxica del veneno escorpiónico es producida por la acción de neurotoxinas polipeptídicas (33-38).

Estudios recientes realizados con veneno desecado de *H. lunatus* demostraron que este veneno actúa como agente liberador del neurotransmisor acetilcolina de sus reservorios a nivel de las terminaciones nerviosas post-ganglionares parasimpáticas en intestino aislado de cobayo y rata (28-32), siendo su actividad tóxica para mamíferos muy inferior a la reportada para veneno de especies de escorpiones letales para el hombre (29, 30, 31).

En este informe se presentan los resultados del estudio de las variaciones estacionales en la calidad y cantidad del veneno obtenido de escorpiones *H. lunatus* adultos y su actividad tóxica paralizante sobre *Porcellio laevis* (Crustacea: Isopoda).

MATERIALES Y METODOS

Escorpiones adultos *H. lunatus* de ambos sexos fueron capturados en la localidad de Atocongo (23 km. al sur de Lima), en número de 100 por estación climática: Invierno (19/8/79), Primavera (25/11/79), Verano (13/4/80) y Otoño (23/6/80). Inmediatamente fueron individualizados en frascos oscuros de boca ancha, y trasladados al laboratorio. Luego de 7 días de ayuno, se procedió a seleccionar 15 escorpiones adultos de ambos sexos, según las medidas reportadas por Maury (12), procediéndose inmediatamente a la extracción del veneno por el método de

estimulación eléctrica pulsante descrito previamente (28). El veneno obtenido de cada escorpión fue recogido en micropipetas graduadas de vidrio, el volumen anotado. El veneno fue inmediatamente extendido sobre láminas portaobjetos y se desecó en campana de vidrio sobre cloruro de calcio al vacío. El peso total del veneno desecado obtenido por estación fue determinado empleando una Balanza analítica Mettler. El contenido protéico de las diferentes muestras de veneno fue determinado según el método de Bradford (4), empleando albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), como estándar.

El veneno fue reconstituido (w/v) inmediatamente antes de cada ensayo de toxicidad, empleando NaCl 0.75% (3 mg de veneno seco/ml), y la actividad paralizante fue determinada en *Porcellio* según el método de Zlotkin (34). El veneno se inyectó en la cavidad celómica de *Porcellio* sp. empleando una jeringa Hamilton P-25. La aguja se insertó a través de la membrana intersegmental entre el tórax y el abdomen de la cara dorsal.

Para la determinación de la actividad paralizante del veneno de *H. lunatus* se emplearon grupos de 8 crustáceos/dosis, los que fueron inyectados con concentraciones crecientes de veneno escorpiónico diluido (0.375, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 y 24.0 ug de veneno/100 mg de peso de cochinilla). La actividad paralizante se define como la incapacidad completa del crustáceo inyectado, para movilizarse sobre una superficie plana durante un período de observación de 2 minutos, registrada 30 minutos después de la inyección del fármaco.

Se define la Unidad Paralizante (UP) como aquella concentración de veneno seco expresado en mg/100 mg de peso de *Porcellio*, capaz de paralizar al 50% de cochinillas inyectadas (DP50). La DP50 fue calculada según el método de Transformación en Probits (23), empleando el porcentaje de mortalidad obtenido y el logaritmo de la concentración de veneno empleado.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico, empleando la prueba de t de student, y análisis de varianza.

1 Trabajo financiado en parte por el Fondo de Promoción de Investigación Científica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2 Alumno del Programa Académico de Ciencias y Filosofía de la UPCH.

3 Laboratorio de Farmacología Departamento de Ciencia Fisiológicas, UPCH. Apartado 5045, Lima 100, Perú.

RESULTADOS

Los escorpiones adultos *H. lunatus* estimulados eléctricamente eyaculan veneno de aspecto blanco lechoso en volúmenes que varían entre 2 y 9 ul./escorpión con un promedio anual ($n=60$) de 5.67 ul./escorpión. Existe diferencia estacional significativa en el volumen del veneno obtenido a lo largo del año (análisis de varianza, $p < 0.05$) debiéndose fundamentalmente a diferencias existentes entre Primavera y Otoño (t de student, $n=30$, $p < 0.05$). Los resultados son presentados en la tabla 1. Mayores volúmenes de veneno fueron obtenidos en otoño (6.73 ul./escorpión). El peso del veneno desecado fluctuó entre 610 y 866 ug/escorpión.

El contenido proteico expresado en porcentaje del peso seco osciló entre 46% (verano) y 63% (otoño), siendo similar entre invierno y primavera (54%). La concentración proteica del veneno varió entre 55.2 y 81.1 ug./escorpión. (tabla 1).

TABLA 1.— VENENO DE *H. LUNATUS* (a), VARIACION ESTACIONAL DEL VOLUMEN, PESO SECO Y CONTENIDO PROTEICO

ESTACION	n	Volumen (b) (ul./escorpión)	Peso seco (ug./escorpión)	Contenido proteico (c) ug/ul veneno % peso seco
INVIERNO	15	5.97 ± 1.5	610	55.2 54%
PRIMAVERA	15	4.80 ± 0.6	670	75.4 54%
VERANO	15	5.17 ± 0.5	766	68.2 46%
OTOÑO	15	6.73 ± 0.4	866	81.1 63%

(a) Obtenido según el método de estimulación eléctrica de Zavaleta (23).

(b) Promedio ± Error Standard.

(c) Determinado según el método de Bradford y col. (17).

El veneno de *H. lunatus* inyectado en la cavidad celómica de *Porcellio* produce contractura corporal precoz (antes de los 30 segundos de inyectado) seguido de un incremento en la motilidad de los segmentos ambulacrales que duró más o menos 2 minutos y contractura del soma. Dependiendo de la concentración del veneno aplicado, se produce parálisis, definida como la incapacidad de apoyarse sobre la superficie ventral del soma y por tanto la incapacidad total para movilizarse sobre una superficie plana. No se observó recuperación de la motilidad en ningún crustáceo paralizado, después de 3 horas de observación.

La actividad tóxica definida en unidades paralizantes es mostrada en la tabla 2. El veneno de *H. lunatus* es más tóxico para *Porcellio* en primavera y menos tóxico en verano.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el presente estudio se demuestra la existencia de variaciones estacionales significativas en el volumen y peso desecado del veneno de *H. lunatus*. Se obtuvieron mayores volúmenes de ejemplares capturados en otoño e invierno y menores en primavera y verano con un promedio anual de 5.67 ul./escorpión; valor similar al obtenido previamente por Zavaleta (23). El peso desecado también varió estacionalmente, siendo mayor en otoño y me-

nor en invierno, fluctuando entre 610 y 866 ug/escorpión adulto, pesos mayores que aquéllos registrados en 1968 por Zavaleta. (28, 32). Estas variaciones pueden ser atribuidas a la falta de selección de los escorpiones utilizados en trabajos previos (28, 32).

El contenido proteico del veneno también muestra una variación estacional significativa como se puede apreciar en la Tabla 1. Los valores porcentuales del contenido proteico obtenidos para las muestras de invierno, primavera y verano son significativamente menores que los registrados previamente por Zavaleta (28) y Zavaleta y col (32). El valor de 63% de contenido proteico del veneno en otoño es similar al registrado previamente (28). No se halló correlación directa entre las variaciones estacionales de los 3 parámetros estudiados a lo largo del año.

El veneno de *H. lunatus* posee efectos tóxicos paralizantes sobre *Porcellio* ("cochinito de la humedad"), siendo similares a los observados por Zlotkin y col. para el veneno de *Androctonus australis* sobre *Astacus vulgare* (37, 38). En el veneno de *A. australis* se han descrito 4 toxinas activas sobre mamíferos (14, 15, 24) una activa sobre insectos (33-36) y una activa sobre crustáceos (37, 38). Todas ellas poseen propiedades comunes: carácter polipeptídico de cadena simple conformados por 64 a 78 aminoácidos, pI entre 8 y 9, bajo peso molecular (— 7000 Daltons), termoestables, resistentes a la desecación sobre cloruro de calcio, sensibles a la acción de enzimas proteolíticas (tripsina y quimiotripsina), solubles en agua y poco dializables en medio acuoso (9, 14, 15, 19, 22, 26, 27, 34-38) las investigaciones electrofisiológicas empleando preparaciones de insectos (18, 25) y crustáceos (18, 24) han demostrado claramente que el efecto paralítico del veneno escorpiónico crudo ó de las toxinas purificadas a partir del veneno crudo activas sobre crustáceos ó insectos, se debe a una acción de tipos neurotóxicos (5, 6, 7, 16, 17, 20, 21, 30), como ocurre con las fracciones activas sobre mamíferos.

Estudios posteriores empleando materiales tóxicos purificados han sustentado la idea de que cada una de las toxinas sobre crustáceos, insectos ó mamíferos tienen una acción más específica sobre los animales de su respectiva categoría sistemática (24).

Walther y col. han demostrado que la neurotoxina activa sobre crustáceos, presente en el veneno del escorpión Noraficano *A. australis* posee actividad neurotóxica a nivel presináptico en los nervios motores (25), y además provocan un pronunciado efecto despolarizante sobre la membrana muscular postsináptica de los crustáceos estudiados.

En el presente estudio se han observado diferencias estacionales marcadas en la actividad tóxica paralizante del veneno de *H. lunatus* sobre crustáceos *Porcellio laevis* una presa natural del "Escorpión de los pedregales" (1) (Tabla II).

La disminución de la toxicidad del veneno en verano, época en que nacen las crías sugerirían la existencia de un fenómeno adaptativo de protección a las crías frente a los hábitos de canibalismo existentes entre escorpiones. La disminución de la toxicidad del veneno en determinadas estaciones climáticas no sería mayormente gravitante

TABLA 2.-- VENENO DE *H. LUNATUS*: VARIACION ESTACIONAL DE LA TOXICIDAD EN CRUSTACEOS (*PORCELLIO LAEVIS*).

ESTACION	Peso de 1 UP(a) (ug/100 mg.)	Toxicidad Especifica (Nº UP/mg. peso seco)	Toxicidad Relativa (UP/escorp.)
INVIERNO	1.61 (2.2-2.6)	621.1	378.9
PRIMAVERA	1.25 (0.7-5.8)	800.0	536.0
VERANO	7.36 (4.1-17.6)	177.4	104.1
OTONO	6.05 (2.8-16.1)	165.2	143.1

(a) Una UP (UNIDAD PARALIZANTE) equivale a la dosis paralizante 50% expresada en ug de veneno desecado/100 mg. de peso de *Porcellio*. (Entre paréntesis los límites fiduciaros del 95%).

para la supervivencia de escorpiones adultos, por cuanto se ha demostrado en nuestro laboratorio, una supervivencia de aproximadamente el 80% de escorpiones, luego de un período de 2 meses en condiciones de ayuno total (3), circunstancia que en el ecosistema de Lomas difícilmente se presentaría. El incremento de la toxicidad durante los meses de invierno y primavera, época en que las Lomas reverdecen, y se incrementa la biomasa de artrópodos sugiere una adaptación ecológica frente a una mayor disponibilidad de alimento.

En la Tabla 3 se muestran los resultados comparativos de toxicidad en mamíferos y crustáceos, de 2 especies diferentes de escorpiones: *H. lunatus* (Perú), y *A. australis* (Argelia). El primero es un pequeño escorpión ampliamente distribuido en la costa central del Perú, de escasa peligrosidad para el hombre (28) mientras *A. australis* es considerado como una de las cinco especies que ocasionan mayor mortalidad en humanos en el mundo, conjuntamente con especies de los géneros *Tityus*, *Centruroides* y *Buthus* (12, 13). El veneno de *H. lunatus*, es sin embargo comparativamente mucho más tóxico sobre crustáceos que el veneno de *A. australis* mayor (hasta en un orden de magnitud), como se puede apreciar en la Tabla 3.

TABLA 3 — CUADRO COMPARATIVO DE LA TOXICIDAD DEL VENENO DE *H. lunatus* y *A. australis* EN MAMIFEROS Y CRUSTACEOS

Especie	Mamíferos(a) DL 50 (mg/ig)	Crustáceos(b) DP 50 (ug/100 mg)	Referencias
<i>A. australis</i>	0.42	11.56	(7,32)
<i>H. lunatus</i>	68.30	1.61 — 7.36*	(23)

(a) Dosis letal 50% (DL 50) intraperitoneal en ratones albinos.

(b) Dosis paralizante 50% (DP 50) de veneno inyectado en la cavidad celómica de *Porcellio*, definida según materiales y métodos.

Son necesarios estudios posteriores que permitan mantener una población de escorpiones adultos en el Laboratorio, a fin de poder realizar estudios comparativos de veneno extraído de los mismos especímenes a lo largo de las 4 estaciones del año, así como también obtener veneno en cantidades adecuadas para iniciar estudios tendientes a la purificación de las fracciones tóxicas activas sobre artrópodos, las que constituirían en el futuro, instrumentos de gran utilidad en investigaciones futuras en el área de la Neurobiología de Artrópodos.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, P. 1968. Nota sobre los escorpiones de Lima. AN. CIEN. UNIV. AGRARIA, Lima. VI: 165.
- BALAZET, S. 1971. Scorpionism in the Old World. En: Venomous animals and their venoms. III: 349-371. (BUCHERL, W.; BUCKLEY E. and DEVELOPER, V.; Eds.). Oxford, Pergamon Press.
- BEJARANO, A.; LINAN, E.; MEZA, A. y ZAVALA, A. Observaciones sobre la crianza del "Alacrán de los Pedregales" *H. lunatus* (Koch, 1867) en cautivero. (En preparación).
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the determination of micrograms of protein utilizing the principle of protein dye binding. ANALYTICAL BIOCHEM. 72: 248.
- CELESTE HENRIQUES, M.; GAZZINELLI, G. y col. 1968. Effects of the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* on adrenal gland catecholamines. TOXICON, 5 (3): 175.
- CORRADO, A.P.; ANTONIO, A. and DINIZ, C.R. 1968. Brazilian scorpion venom *Tityus serrulatus*, an unusual sympathetic post-ganglionic stimulant. THE J. PHARMAC. EXPER. THER. 164 (2): 253.
- CUNHA-MELO, J.R.; FREIRE-MAIA, F. y col. 1973. Mechanism of action of purified scorpion toxin on the isolated rat intestine TOXICON, 11 (1): 81.
- DE MELLO-LEITAO, C. 1945.— ARQUIVOS DO MUSEUM NACIONAL. XL. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional. :11.
- GOMEZ, M.V. and DINIZ, C.R. 1968. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. MEM INST BUTANTAN, 33: 99, 1966.
- MATHIESEN, F.A. 1962. Parthenogenesis in scorpions evolution 16: 255.
- MATHIESEN, F.A. 1971. The breeding of *Tityus serrulatus* Lutz e mello (scorpions, butlidae). Rev. Bras. Pesquisas Med. e Biol. 4 (45): 299.
- MAURY, E. 1974. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú. IV: Revisión del género *Hadruiroides* Pocock 1893. (Scorpiones. Vejovidae). REV. PER. ENTOMOL., 17: 9.
- MAZZOTTI, L. y BRAVO-BECHERELLE, M.A. 1963. Scorpionism in the Mexican Republic. En: Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region. (Keegan, H.L. y MacFarlane, M.V., Eds.). Oxford, Pergamon Press: 119-131.
- MIRANDA, F.; ROCHAT, H. and LISSITZKY, S. 1964. Sur les neurotoxines de two North African Species of scorpion: II. Properties of Neurotoxins (scorpiamines) of *Androctonus Australis* and *Buthus occitanus*. TOXICON, 2: 113.
- MIRANDA, F.; KOPEYAN, C.; et al: 1970. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus Australis*, *Buthus occitanus* and *Leiurus quinquestriatus*. EUR. J. BIOCHEM. 16: 514.
- MOSS, J.R.; COLBURN, R.W.; and KOPIN, I.J. 1974. Scorpion toxin induced catecholamins release from sympatosomes, J. NEUROCHEM. 22 (2): 217.
- MOSS, J. THOA, N.B. and KOPIN, I.J. 1974. On the mechanism of scorpion toxins-induced release of Norepinephrine from peripheral adrenergic neurons. The J. PHARMAC. EXP. THER. 190 (1): 39.
- PARNAS, I. AVGAR, D. and SHULOV, A. 1970. Physiological effects of venom of *Leiurus quinquestriatus* on neuromuscular systems of locust and crab. TOXICON, 8, :67.
- POSSANI, L.D.; RAMIREZ, G.A. y col. 1978. Isolation of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion *Centruroides elegans* (Thorell). FEBS LETTERS, 91 (2), :261.
- TAFURI, W.L.; MARIA, T.A. y col. 1971. Effect of purified scorpion venom on vesicular components in the muenteric plexus of the rat. TOXICON, 9: 427.
- TAZIEF DE-PIERRE, F. y col. 1978. Action of purified toxins isolated from the venoms of scorpion and the *Anemonia sulcata* on neuro-transmitters release. PERIOD BIOL, 80 (Suppl 1), :107.
- TOLEDO, D. and NEVES, A.G. 1976 Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus* venom. COMP BIOCHEM PHYSIOL 8 COMP BIOCHEM, 55(2): 249.
- TRANSFORMACION EN PROBITOS. 1958. En Documenta Geigy. Tablas Cientificas, 5ª Ed. Barcelona, SADAG: 40.
- RATHMAYER, W.; RUHLAND, M. y col. 1978. The effect of toxins derived from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector on neuromuscular transmission. En: TOXINS: PLANT, ANIMAL AND MICROBIALS (ROSEMBERG, P. Ed.) Oxford, Pergamon Press: 629.

- 25.— WALTHER, C.; ZLORKIN, E. and RATHMAYER, W. 1976. Action of different toxins from the scorpion *Androctonus australis* on a locust nerve-muscle preparation, J. INSECT PHYSIOL, 22: 1187.
- 26.— WATT D.; BABIN D. y col. 1974. The protein neurotoxins in scorpion and elapid snake venoms. J AGR FOOD CHEM, 22(1): 45, 1974.
- 27.— WRIGHT, R.P. y col. 1977. Enzymes and toxins of the scorpion venom *Palamneus gravimanus* TOXICON, 15: 197.
- 28.— ZAVALETA, A. 1980. El veneno del Escorpión de los Pedregales *H. lunatus* (Koch 1867): Método de extracción y acciones farmacológicas. Tesis Bachiller en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima-Perú.
- 29.— Zavaleta, A.; BUSTAMANTE, E. y CASTRO, R. 1979. Escorpiones y Escorpionismo en el Perú-VIII: Mecanismo de acción del veneno de *H. lunatus* (Koch 1867) en el intestino aislado de rata. REV. PER. ENTOMOL., 22(1) 75.
- 30.— ZAVALETA, A.; NAVARRO, J. and CASTRO DE LA MATA, R. 1981. Pharmacological effects of a peruvian scorpion (*H. lunatus*) venom. TOXICON, 19: 906.
- 31.— ZAVALETA, A. 1981. Bioquímica y Farmacología del veneno escorpiónico con especial mención sobre sus mecanismos de acción el hombre y animales experimentales. (Sometido a Publicación).
- 32.— ZAVALETA, A.; BUSTAMANTE, E. Y CASTRO DE LA MATA, R. 1979. Introducción al estudio farmacológico del veneno del escorpión de los Pedregales de la Costa Central del Perú *H. lunatus* (Koch 1867). Revista del Cuerpo Médico (RCM), 9 (5): 425.
- 33.— ZLOTKIN, E.; FRAENKEL, G. y col. 1971. The effect of scorpion venom on blowfly larvae: a new method for the evaluation of scorpion venom potency. TOXICON, 9: 1.
- 34.— ZLOTKIN, E.; MIRANDA, F. y col. 1971. A new toxic protein in the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. TOXICON, 9:9.
- 35.— ZLOTKIN, E.; ROCHAT, H. y col. 1971. Purification and properties of the "insect toxin" from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. BIOCHIMIE, Paris, 53: 1073.
- 36.— ZLOTKIN, E.; MIRANDA, F. and LISSITZKY, S. 1972. Proteins toxic to mammals and insect in six scorpion venoms. TOXICON, 10: 207.
- 37.— ZLOTKIN, E.; MIRANDA, F. and LISSITZKY, 1972. S. A toxic factor to crustaceans in the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. TOXICON, 10: 211.
- 38.— ZLOTKIN, E.; MARTINEZ, G. y col. 1975. A protein toxic to crustacea from the venom of the scorpion *Androctonus australis* INSECT BIOCHEM 5: 243.