

ESTUDIOS ELECTROFORETICOS DE LA HEMOLINFA DE UNA POBLACION DE ESCORPIONES *Tityus colombianus*

JAIME F. GEORGE C. *

IRMA COLMENARES DE ESCAMILLA

JEANNETTE OSPINA F.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS

INTRODUCCION

Los escorpiones constituyen un grupo relativamente pequeño de animales. Hasta el momento se han descrito aproximadamente 650 especies. Tienen un amplio habitat. Se encuentran en regiones cálidas y desérticas (*andronotus* sp), frecuentan lugares húmedos como el *Escorpius* spp. o bosques como el *Palamaus* spp. Los escorpiones *Tityus Colombianus* habitan climas fríos y pueden resistir heladas de varias semanas (Vachon, 1953).

La sangre o hemolinfa es un líquido claro, ligeramente amarillo mediante el cual se realizan los intercambios químicos entre los órganos, se transportan hormonas y alimentos desde el intestino y productos de desecho hasta el sistema excretor.

Varios investigadores han utilizado, como se describirá más tarde, las proteínas presentes en la hemolinfa, como un medio para descubrir variaciones intra e inter poblacionales difíciles de detectar morfológicamente. Por otra parte si las proteínas son el reflejo de la constitución genética de un individuo, al estudiar las variaciones que existen en las proteínas se estará detectando indirectamente la constitución genética de ese individuo. Por esta razón las proteínas y sus variaciones se han utilizado ampliamente en el reconocimiento de especies diferentes que morfológicamente parecen similares (Manwell y Baker 1970). Varias publicaciones afirman por ejemplo que las variaciones de los patrones electroforéticos de las proteínas, a través de las distintas especies pueden presentar una base molecular para la determinación de su relación filogenética (Bertini & Cej 1960). Ainfisen (1959) demostró que a pesar de que algunas

proteínas de diferentes especies tienen una función similar, pueden presentar diferencias estructurales que afectan su movilidad.

Estas variaciones se pueden detectar con métodos analíticos apropiados como son los métodos electroforéticos.

Durante algunos años los estudios de las proteínas de insectos se hicieron utilizando técnicas simples de electroforesis en papel y más recientemente en almidón o agar. Las técnicas de agar y almidón, en las cuales la separación aparentemente depende de la interacción con el medio además de la movilidad electroforética (Smithies 1955), dan bandas agudas y en mayor número. Por otra parte, con la caracterización química de las proteínas de la hemolinfa, la electroforesis de microzona ha contribuido a observar que ciertas bandas se colorean selectivamente dependiendo del reactivo, indicando glicoproteínas y lipoproteínas (Aizawa 1957).

Los trabajos más intensivos en fraccionamiento y caracterización física de las proteínas de la hemolinfa de los insectos se han realizado en *Bombyx mori* utilizando tanto métodos de ultracentrifugación como de electroforesis en el aparato de Tiselius. La hemolinfa de la larva presentó tres componentes importantes. El de mayor sedimentación estaba presente en el estado de pupa (Oda 1956).

El aspecto de desarrollo y diferenciación se ha estudiado ampliamente en algunas especies.

Las proteínas de "*Hyalophora cecropia*" y de "*Philotamia cynthia*" por ejemplo, fueron observadas a través del desarrollo (Läuffer 1959) con electroforesis de zona en gel de almidón, para detectar cambios cualitativos y cuantitativos. Los cambios de los constituyentes fueron correlacionados con las funciones de varios órganos y tejidos, particularmente de las glándulas endo-

(*) Esta investigación fue financiada por COLCIENCIAS y la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

crinas, las cuales controlan parcialmente el desarrollo y la síntesis de proteínas.

En análisis electroforético de la hemolinfa durante la diferenciación de las especies de la clase Arácnida del género *Hyalomma*: *H. excavatum* y *H. impeltatum* (Sande y Kardher 1960) se obtuvieron patrones electroforéticos con once fracciones pero con diferencias muy marcadas entre las dos especies. Lo mismo se observa en *Argasidae reflexus* y *A. persicus*. Las proteínas de la hemolinfa del primero se presentan en tres fracciones mientras que las del segundo se presentan en cinco fracciones.

Las proteínas de la hemolinfa de "*Hyalophora cecropia*" se han estudiado como antígenos (Telfer, 1960), utilizando antisueros producidos por conejos y la técnica de difusión en agar. Se observaron nueve bandas de las cuales, siete se presentaron a través de todo el desarrollo; también se observó un aumento cuantitativo de proteínas durante la transformación en adulto.

Investigaciones en algunos insectos han mostrado que cada una de las situaciones fisiológicas se acoplan con un cambio en el tipo de proteína de la hemolinfa. Así, durante la fase de maduración de algunos huevos, aparecen en la hembra proteínas específicas que son absorbidas por los oocitos. Se concluyó que las proteínas de la hemolinfa y las de los oocitos parecían idénticas debido a que la velocidad de migración electroforética era igual. Inmunológicamente son también iguales. (Engelman y Penny, 1966).

Estudios de las proteínas de la hemolinfa durante el ciclo de vida de las reinas adultas de las abejas de la especie "*Bolbys erretris*" separadas con electroforesis en disco en gel de policrilamida, demostraron la presencia de 23 fracciones proteínicas nombradas alfabéticamente (Roseler, 1973). Cada fase de la vida adulta de la abeja está caracterizada por patrones específicos de proteínas de la hemolinfa. Las reinas nuevas tienen una concentración baja de estas proteínas que se va aumentando en los primeros cinco días hasta llegar a un máximo. La alta concentración está probablemente relacionada con la síntesis de reservas para la etapa de hibernación. Durante la primavera los primeros oocitos empiezan a desarrollarse presentándose un aumento en la actividad de las glándulas hipofaríngeas y de las glándulas productoras de cera que alcanzan su máximo desarrollo cuando la reina establece su colmena. Un aumento en la concentración de las proteínas de la hemolinfa es paralela con la puesta de los huevos. La concentración disminuye al mínimo en reinas viejas con ovarios degenerados (Roseler 1973).

Muchos investigadores concluyen que el contenido de proteínas de la hemolinfa fluctúa más ampliamente que los aminoácidos libres y que otros compuestos nitrogenados no proteínicos. Los patrones durante el desarrollo de algunos lepidópteros son muy semejantes, hay un aumento en la concentración en el estado larval, gradual primero y luego rápido en el último instar. Se observaron cambios durante la hilada y en el período de pupa; luego un agudo descenso al desarrollarse la forma adulta. (Florkin 1936; Heller 1930; Drilhon 1946).

El descenso del volumen de la hemolinfa durante el desarrollo del adulto sugiere que las proteínas de ésta

sirven como reserva para la síntesis de proteínas del adulto (Heller 1932). La importancia de la hemolinfa como sustancia de reserva también se ha podido demostrar por cambios durante el período de inanición. Cuando *C. euphorbiae* y *B. morio* o *S. lutoria* se someten a inanición forzada, las proteínas de la hemolinfa descienden notablemente mientras que las sustancias no proteínicas permanecen constantes. Esto presumiblemente refleja la hidrólisis de las proteínas para pasar a aminoácidos y mantener la presión osmótica.

Estudios de la hemolinfa de escorpiones del género *Bothotus* (Buthidae) con electroforesis en disco y realizados por Goyffon (1973), muestran que cada una de las especies posee un electroferograma diferente, aunque con aspectos muy cercanos en *B. franzwerneri* y *B. hentota*, pero netamente diferentes en cada una de las subespecies de *B. franzwerneri* de Marruecos. Las diferencias taxonómicas se distinguen aisladamente por la técnica electroforética y el comportamiento de la banda de movilidad, mientras que en otras familias de la especie están ausentes.

El interés de este trabajo se basa en una población de adultos de escorpiones *Tityus colombianus* (Thorell) pertenecientes a la familia Buthidae, subfamilia Tityinae, descrita en el siglo pasado en base a ejemplares de Bogotá por lo que se pueden considerar como topotipos (Mello, 1945). Estos escorpiones fueron recolectados en la Loma el Patronato situada detrás de Usaquén a unos 12 kilómetros al norte de Bogotá, con el fin de detectar el número de bandas presentes en electroferogramas de la hemolinfa. Se averiguó además las concentraciones de las proteínas detectadas mediante gráficas de integración fotodensitométricas. Un punto interesante es la observación de polimorfismos en la población, el cual se puede aprovechar para estudiar las frecuencias genéticas de las poblaciones y observar los movimientos genéticos entre diferentes poblaciones, proporcionando además una herramienta para el análisis filogenético de la especie.

MATERIALES Y METODOS

Los escorpiones fueron recolectados a 12 kilómetros al norte de Bogotá en la "Loma de Patronato" detrás de Usaquén, a una altura de 2.725 metros sobre el nivel del mar, cuya temperatura varía entre 10°C y 14°C. La latitud corresponde a 110.464 metros y la longitud a 105.694 metros según la nomenclatura de Gauss y de acuerdo a la planta F-94 del Instituto Geográfico de Agustín Codazzi.

La hemolinfa se extrajo del animal vivo, mediante una punción interdital por la cara dorsal, entre el quinto y sexto tergo, utilizando una micropipeta de 0.04 a 0.40 mm., de diámetro. A cada espécimen se le colocó una tarjeta que identifica el lugar donde se colectó, el número del espécimen y la fecha de colección. Luego se conservaron en una solución de 280 cc. de agua destilada, 60 cc. de formol al 40%, 20 cc. de ácido acético glacial y 175 cc. de alcohol isopropílico.

Los compuestos de la hemolinfa del escorpión se separaron por el método de electroforesis de microzona que fue inicialmente utilizado por Kohn en 1957 en reemplazo de las electroforesis en papel. Las muestras

de hemolinfa de escorpión se colocaron con el aplicador de muestras (Beckman No. 324399) en la membrana a través de las perforaciones que presentan la cubierta de la celda. Se aplicaron siete muestras de hemolinfa y un patrón de suero humano normal en el que se pudo identificar seis fronteras móviles diferentes, que se designaron como: albúmina, globulinas, alfa 1, alfa 2 y Beta, Fibrinógeno y Gamaglobulina (Arsmstrong et. al 1947).

Para obtener los datos que se presentan se utilizó el sistema de electroforesis de microzona usando el modelo R-110 de Beckman desarrollado por Gebott, 1973, con una fuente Beckman modelo RD-2 duostat a 250 V y 5 MA por 18 minutos a temperatura ambiente. En la microcelda se utilizó buffer B-2 Beckman (Veronal dietilbarbitúrico de sodio).

Una vez corrida la muestra, se retiró la membrana para fijarla y tñirla por 10 minutos con Ponceau -S para observar las bandas y lavarla con ácido acético glacial al 5% en agua destilada. Se deshidrató con alcohol isopropílico al 5% en etanol. La membrana se leyó en un fotodensitómetro de microzona (Beckman Modelo R-110) con registro automático a 520 manómetros.

RESULTADOS

El análisis de los electroferogramas obtenidos por el método descrito demuestra que la hemolinfa del escorpión *Tityus colombianus*, está compuesta por un número variable de proteínas anódicas que oscila entre 3 y 5, según puede observarse en los electroferogramas y en los trazos densitométricos.

La Figura 1 presenta un electroferograma representativo de las proteínas hemolinfáticas, habiendo colocado en la extrema derecha un patrón humano.

El análisis densitométrico del patrón humano aparece semejante en todos los electroferogramas, caracterizado por cinco bandas bien definidas que corresponden a: Albúminas, Globulinas alfa 1, Globulina alfa 2, Beta globulinas y Gammaglobulinas. Estos patrones corresponden a los obtenidos en trabajos anteriores, lo cual garantiza el desarrollo normal de la electroforesis.

El análisis densitométrico de los electroferogramas muestra que pueden aparecer entre 3 y 5 bandas que representan grupos de proteínas. Por tanto hay bastante variación en las proteínas hemolinfáticas de los miembros de la población (Tabla No. 1).

La banda número 3, corresponde en el patrón humano a las globulinas alfa 1; la número 4, a las globulinas alfa 2; y la número 5 a las beta globulinas. En ninguna de las muestras de hemolinfa estudiadas aparece una sexta banda comparable a las gamma globulinas.

El análisis cuantitativo de los datos densitométricos permite calcular los miligramos de proteína presentes en cada banda, a partir del contenido total de proteínas de la hemolinfa.

La cuantificación de proteínas totales se realizó en la reacción de Biuret, en un fotocolorímetro Leitz, utilizando luz monocromática de 550 manómetros de longitud de onda, a partir de cuatro "pools" de hemolinfa. Los resultados se analizaron según la Ley Colorimétrica de Lambert-Beer.

Los valores promedio de miligramos en cada banda aparecen en la Tabla 2 en la cual se indica también la desviación standard para cada una.

NUMERO Y PORCENTAJES DE INDIVIDUOS CON LAS DIFERENTES BANDAS PRESENTES

	Número de individuos	% de la población
BANDA 1	45	70.3%
BANDA 2	64	100. %
BANDA 3	64	100. %
BANDA 4	64	100. %
BANDA 5	8	12.5%

TABLA 1

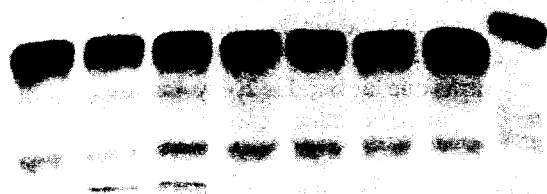


FIGURA 1

Electroferograma representativo de las proteínas hemolinfáticas correspondientes al escorpión *Tityus colombianus*. Colectadas en la Loma El Patronato. Control al extremo derecho.

MILIGRAMOS DE PROTEINA PRESENTES EN CADA BANDA EN LA HEMOLINFA DE *Tityus colombianus*.

	MILIGRAMOS DE PROTEINAS	
	Desviación Standard	Medida
BANDA 1	0.13	0.14
BANDA 2	0.436	0.55
BANDA 3	0.17	0.32
BANDA 4	0.22	0.55
BANDA 5	0.182	0.305

TABLA 2

DISCUSION

Tanto la hemolinfa de los invertebrados como la sangre de los animales más avanzados, son el fluido más representativo de cada especie, no sólo por su volumen, sino también por su composición química, sus propiedades osmóticas, por ser en última instancia el medio en el cual se desarrollan los tejidos. Este hecho justifica intentar un conocimiento más profundo y detallado de sus propiedades, y es también por esta razón la tendencia quimiotaxonómica moderna que pretende clasificar

las especies de acuerdo a la composición proteínica de sus fluidos internos. Varios autores, utilizando técnicas de electroforesis en papel, en geles de agar, y en almidón muestran variaciones en el número de bandas presentes en una misma especie, de acuerdo a su estado de desarrollo, a su condición fisiológica, a sus características sexuales, e incluso a su medio ambiente, lo cual dificulta notablemente este tipo de análisis.

Se han reportado diferencias en el número de bandas presentes en machos y hembras de los mosquitos *Culex pipiens* utilizando la técnica de inmunodifusión (Schuman 1973) y en *Drosophila melanogaster* por inmunoelectroforesis. (Robert, 1971). En anfibios, se han determinado variaciones interpoblacionales e intrapoblacionales de las proteínas plasmáticas (George et, al 1975) sin embargo, en la literatura revisada no se encuentra información semejante para el caso de los escorpiones.

Los resultados obtenidos muestran claramente una variación en el número de bandas y por tanto en el número de grupos proteínicos presentes en la hemolinfa de estos escorpiones. Según la Tabla 1, la banda 1, está presente, sólo en un 73.3% de los ejemplares estudiados, mientras que las bandas 2, 3 y 4 aparecen en todos. La banda 5, aparece únicamente en el 12.5% de los individuos.

Por su movilidad electroforética las proteínas que forman la banda 1, podrían denominarse pre-albúminas. Existen varias razones que pueden explicar el hecho de que estas prealbúminas no aparezcan en todos los ejemplares estudiados. En primera instancia, es posible que esta fracción proteínica exista en todos los escorpiones, pero que en algunos se encuentre en una concentración baja, que por este sistema no pueda detectarse. Existe además la posibilidad de que, como en otros casos informados (Fagerhol y Braend, 1965) esta fracción forme algún tipo de complejo con las albuminas de manera que ambas migren juntas, predominando las albúminas.

Se pensó que las bandas 1 y 5 podrían estar en algu-

na forma relacionadas con el sexo, como parece ser en otros casos (Schumann, 1973). Sin embargo, las bandas faltan indistintamente en machos y hembras.

Aparentemente tampoco se puede relacionar con el estado de desarrollo o madurez del animal, porque aunque sobre el ciclo de vida de esta especie se conoce muy poco. De acuerdo a su morfología externa, todos los ejemplares estudiados parecen ser adultos.

Finalmente vale la pena mencionar que varios investigadores (Heller et al 1932) han destacado la importancia de las proteínas hemolinfáticas en la regulación de la concentración de aminoácidos libres, lo que puede ocasionar la conversión de las proteínas en aminoácidos, pudiendo las bandas 1 y 5 en determinados casos ser convertidas a aminoácidos sin que ellos se detecten con el método utilizado.

Atribuir estas variaciones a fenómenos ecológicos parece difícil, ya que toda la población estudiada procede de un área relativamente pequeña y homogénea, en la que aparentemente no hay zonas de transición ecológica.

Es claro sin embargo que, por el método utilizado, aparece un polimorfismo en la población pero para obtener una imagen clara del mismo, es necesario estudiar otras poblaciones y posiblemente utilizar métodos más sensibles como electroforesis en gel de almidón o acrilamida para lograr una mejor resolución de las bandas proteínicas que aparecen en la hemolinfa del escorpión *Tityus colombianus*.

RESUMEN

Se estudiaron 64 individuos de una población del escorpión *Tityus colombianus* por el método de electroforesis de microzona. Con este sistema se detectaron 3, 4 y 5 bandas anódicas en la hemolinfa de diferentes individuos. La banda No. 1 está presente en el 70.3% de la población, las bandas 2, 3 y 4 aparecen en todos los individuos estudiados y la banda No. 5 aparece en un 12.5% de la población. Se discuten posibles explicaciones a estas variaciones.

BIBLIOGRAFIA

- AIZAWA, K. 1955. In: Wyatt G.R. 1961. The Biochemistry of insect hemolymph ann. Review of Entomol V: 6p-75.
- ANFISEN, C.E. 1959 The molecular basis of evolution John Wiley Sons, Inc. New York.
- ARMSTRONG H.S. 1947. Electrophoretic patterns of the human plasma Am Chem. Soc. 69: 416.
- BERTINI, F. y J.M. CEI 1960. Observaciones electroforéticas en Seroproteínas de poblaciones argentinas de Bufo arenarum. Rev. Soc. Argentina Biol. 36: 355.
- DRILHON A. 1946. Amino acids in blood Attacus, Lep. Bull. Soc. Chim. Biol. 28: 160-167.
- ENGELMANN F. y PENNY D. 1966. Studies on the endocrine control of metabolism in Leucophaea maderae Science, Wash 165, 407-409.
- FAGERHOL, M.K. y M. BRAEND 1965. Molecular Biology and origin of the species. University of Washington Press. Seattle.
- FLORKIN M. 1936. Chemistry of haemolymph Men Cour Acad Roy Belg 16:69.
- GEBOTT M. 1973. Microzone electrophoresis manual (Beckman). Calif. U.S.
- GEORGE, J. e I. ESCAMILLA. 1975. Estudio de Proteínas sanguíneas en una población de Eleutherodactylus bogotensis. Rev. Acad. Col. Ciencias. XXVI; 37.
- HELLER, J. 1930. Blood metamorphosis Deilephila, Lep Biochem Z. 219: 73-89.
- HELLER, J. 1932. Blood in metamorphosis Biochem Z. 255:205-221.
- LAUFER H. 1959. Studies of change in enzymatic activities of blood proteins in the developing silk moth XI Internacionales Kongress Fur etmologie Wien 1960 Verhan Lugan Band III Symposium 3: Chimie der insekten.
- MANWELL, C. y C. BAKER, 1970. Molecular Biology and the origin of species Univ. of species Univ. of Washington Press Seattle.
- MELLO LEITAO, 1945. Escorpiones Sud Americanos Arq. Mus. Nac. Brasil 40, 1-468.
- ODA 1956 in Wyatt G.R. 1961 the Biochemistry of insect hemolymph Ann Review of Entomol V: 75-102.
- ROBERTS D.B. 1971. Antigens of developing *Drosophila melanogaster*. Nature Lond. 233: 394-397.
- ROSELER P.F. 1973. "Anderungen im Muster Der Haemolymphproteine van Adulten Koniginnen der Hummelart *Bombus Terrestris* J. Insect Physiol Vol. 19 pp. 1.741-1.752.
- SANDE M.V. y D. KARDHER. 1960. Species differentiation of insects by Hemolymph electrophoresis. Science. V. 131 pp. 1.103-1.104.
- SCHUMANN W. 1973. Immunogenetic and electrophoretic studies with extract of different adult culex pipiens strains. Biol. Bull. VII: 206-223.
- SMITHIES O. 1955. In: Wyatt G.R. 1961. The Biochemistry of Insect of Insect hemolymph Ann review of Entomol. V: 6 p. 75-102.
- TELFER W.H. 1960. Biol Bull V: 118 pp. 338-351.
- VACHON M. 1953. The biology of scorpions Endeavour 12: 80-89.