



Cuernavaca, Morelos a 21 de febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Tesis: "Caracterización del efecto miotóxico causado por el veneno de *Scolopendra polymorpha* en ratones"

Alumno que la presenta a revisión: **JUDITH TABULLO DE ROBLES**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE



Cuernavaca, Morelos a 21 de febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Tesis: "Caracterización del efecto mitotóxico causado por el veneno de *Scolopendra polymorpha* en ratones"

Alumno que la presenta a revisión: **JUDITH TABULLO DE ROBLES**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. EDGAR DANTAN GONZALEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 24 feb 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Tesis: "Caracterización del efecto mitotóxico causado por el veneno de *Scolopendra polymorpha* en ratones"

Alumno que la presenta a revisión: **JUDITH TABULLO DE ROBLES**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Cuernavaca, Morelos a 21 de febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Tesis: "Caracterización del efecto mitotóxico causado por el veneno de *Scolopendra polymorpha* en ratones"

Alumno que la presenta a revisión: **JUDITH TABULLO DE ROBLES**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA



Cuernavaca, Morelos a 24 febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Tesis: "Caracterización del efecto mitotóxico causado por el veneno de *Scolopendra polymorpha* en ratones"

Alumno que la presenta a revisión: **JUDITH TABULLO DE ROBLES**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. CLAUDIA RODRIGUEZ ALMAZAN



Cuernavaca, Morelos a 25 de febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Tesis: "Caracterización del efecto mitotóxico causado por el veneno de *Scolopendra polymorpha* en ratones"

Alumno que la presenta a revisión: **JUDITH TABULLO DE ROBLES**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 26 febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Tesis: "Caracterización del efecto mitotóxico causado por el veneno de *Scolopendra polymorpha* en ratones"

Alumno que la presenta a revisión: **JUDITH TABULLO DE ROBLES**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA**

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO
MIOTÓXICO CAUSADO POR EL VENENO DE
Scolopendra polymorpha EN RATONES”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES
P R E S E N T A :
M. EN B. JUDITH TABULLO DE ROBLES**

**TUTORA:
DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ
VILLAFUERTE**

CUERNAVACA, MOR.

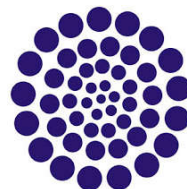
FEBRERO 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM



CONACYT

El presente trabajo se desarrolló con la tutoría de la Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte en el Laboratorio de Neurofarmacología del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), contando con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio de la beca No. 267392.

Dedicatoria

Para Ayixon, mi compañero en lo próspero y lo más adverso, por volver a inclinar la balanza a nuestro favor. Por cada desvelo a mi lado, por cada logro compartido, por ser mi norte y mi sur.

A mis padres, Emilia y Ricardo, y a mis hermanos Adriana y David, por su apoyo incondicional a través de la distancia, por respetar y apoyar mi decisión de seguir esta aventura, aunque implique el sacrificio de la vida con ustedes.

A mi tío Alejandro y a los demás *muertos de mi felicidad*, que espero me perdonen por tratar de ser feliz a pesar de su ausencia.

Agradecimientos



Dr. Fabio Cupul Magaña, del Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara, por compartir sus conocimientos, por su colaboración y asesoría para la identificación de los ejemplares de *S. polymorpha* y de otras especies.



Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía: Biól. Francis Fernández Valverde y Dra. Juanita Villeda Hernández[†], por todo el tiempo invertido en este proyecto, por su amistad invaluable, por la pericia compartida y por el entrenamiento para realizar todas las evaluaciones histoquímicas.



A la familia CEIB: Biól. Fernanda Barrera Garduño, Dra. Irene Perea, Dra. María del Refugio Trejo, M. Rocío Rodríguez, Dr. Víctor Hernández, C. Elena Hidalgo, Ing. Víctor Martínez, Dr. Arellano, Dr. Dantán: por su ayuda a lo largo de los años: gestión de viáticos para estancias, cursos y congresos, apoyo técnico, trámites burocráticos, respaldo para realizar proyectos paralelos, pero sobre todo por su generosidad, su optimismo y su confianza.

Del Laboratorio de Neurofarmacología: Dra. Gutiérrez, Mtra. Caro Abarca, Lucero Valladares (con Damaris y Alondra), Manuel Castro, Érika Ibarra, Carmen Itzamatul: por una década de amistad invaluable*, por su guía, por su paciencia, por su ayuda para montar experimentos, resolver problemas, enfrentar evaluaciones, por los días de colecta, por su calidez y por animarme a continuar.



A mi tribu, por sus visitas revitalizantes, por sus mensajes reconfortantes, por los relatos misteriosos y por estar: Ximena, María, Alí, David, Nana, Janet, Oscar, Karina, Mami, Papi, Susy, Martin, Susan, Martita, Emily, Anthony, Giovanni, Martha W., Eloy, Luna, Pepe, Herlinda, Kalisi y Ayixon.

Puesto que este proyecto –que al hacer balance de pérdidas y ganancias ha costado mucho más de lo que había imaginado–, no habría sido posible sin su cooperación, sin su asesoría y su compañía: ¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	iii
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	3
I. El tejido muscular.....	3
i. Tejido muscular esquelético.....	4
II. Daño muscular.....	5
III. Miotoxicidad por venenos animales.....	6
IV. Los ciempiés en México.....	7
V. Efectos de la mordedura de ciempiés en humanos.....	9
ANTECEDENTES.....	10
I. <i>Scolopendra polymorpha</i>	10
II. Estudios sobre venenos de <i>Scolopendra</i> spp.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
I. Objetivo General.....	15
II. Objetivos Particulares.....	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
A. Estrategia general.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
I. Material biológico.....	16
II. Obtención y fraccionamiento de veneno.....	16
ii. Obtención y cuantificación del veneno.....	16
iii. Cromatografía de intercambio aniónico.....	16
iv. HPLC de fase reversa (HPLC-FR).....	17
III. Pruebas de daño a músculo con fracciones de intercambio aniónico.....	17
IV. Pruebas de daño a músculo con fracciones de HPLC-FR.....	17
i. Determinación de actividad creatin-kinasa (CK).....	17
ii. Tinciones estructurales.....	18
iii. Pruebas de daño mitocondrial.....	19

V. Análisis estadístico	19
VI. Búsqueda del agente miotóxico	19
i. Separación electroforética de la fracción activa (SDS-PAGE)	19
ii. Electroelución	20
RESULTADOS	20
I. Material biológico: escolopendras.....	20
II. Cromatografía de intercambio aniónico	23
III. HPLC de fase reversa (HPLC-FR).....	23
IV. Pruebas de daño a músculo con fracciones de intercambio aniónico	24
V. Pruebas de daño a músculo con fracciones de HPLC-FR	29
i. Determinación de actividad CK	29
ii. Tinciones estructurales.....	30
iii. Pruebas de daño mitocondrial.....	34
i. Cuantificación de la actividad enzimática NADH.....	38
VI. Búsqueda del agente miotóxico	39
i. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por intercambio aniónico y por HPLC.....	39
ii. Obtención de componentes proteínicos por electroforesis-electroelución.....	41
iii. Actividad miotóxica <i>in vitro</i> de componentes individuales.....	42
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS	46
APÉNDICES.....	54
A1. Publicación en Acta Zoológica Mexicana (nueva serie).....	54
A2. Nuevo registro de <i>Otostigmus pradoiii</i> para México	57
A3. Preparación de la columna de intercambio aniónico.....	62
A4. Conservación en frío de músculo esquelético.....	62
A5. Tinción HyE para cortes crioconservados.....	62
A6. Tinción tricrómico modificado de Gomori (TG)	63
A7. Tinción de NADH (enzimática)	63
A8. Tinción de COX (enzimática)	64
A9. Tinción ATPasa miosínica (enzimática)	65
A10. Artículo sometido al Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (JVATiTD).....	66

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Tipos de tejido muscular.	3
Tabla 2. Actividades tóxicas y toxinas presentes en especies de ciempiés.	12
Figura 1. Organización del músculo esquelético (modificada de Waugh y Grant, 2013).	4
Figura 2. Chilopoda: morfología y clasificación.	8
Figura 3. Morfología de <i>S. polymorpha</i>	11
Figura 4. Distribución de <i>S. polymorpha</i> en México.	11
Figura 5. Histoquímica de zona de administración de veneno.	13
Figura 6. Morfología externa de la especie <i>Scolopendra polymorpha</i>	20
Figura 7. Suturas en la placa cefálica.	21
Figura 8. Publicación sobre la distribución de ciempiés en el estado de Morelos.	22
Figura 9. Perfil cromatográfico del veneno de <i>S. polymorpha</i>	23
Figura 10. Perfil de HPLC de veneno de <i>S. polymorpha</i>	24
Figura 11. Músculo esquelético en condiciones control.	24
Figura 12. Cortes de músculo esquelético de ratón.	26
Figura 13. Actividad CK <i>in vitro</i>	29
Figura 14. Cortes de músculo incubado con fracciones de HPLC-FR.	31
Figura 15. Reacciones enzimáticas en músculo expuesto a veneno.	35
Figura 16. Cuantificación de actividad NADH con software FIJI.	38
Figura 17. Porcentaje de área de actividad NADH.	39
Figura 18. Perfil electroforético de VT y fracciones.	40
Figura 19. Perfil electroforético de las fracciones obtenidas por HPLC de fase reversa.	40
Figura 20. Bandas sometidas a electroelución.	41
Figura 21. Actividad CK <i>in vitro</i> de bandas "individuales".	42

ABREVIATURAS UTILIZADAS

%	Porcentaje	mℓ	Militros
°C	Grados Celsius	mM	Concentración milimolar (minimol/litro)
μg	Microgramos	NADH	
μℓ	Microlitros	NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm	nm	Nanómetros
ADP	Adenosin difosfato	<i>O. pradoi</i>	<i>Otostigmus pradoi</i>
ATP	Adenosin trifosftato	OMS	Organización Mundial de la Salud
ANOVA	Análisis de varianza	pH	Potencial hidronio
AST	Aspartato transferasa	PLA2	Fosfolipasa A2
BLAST	Basic Local Alignment Tool	PM	Peso molecular
<i>C. iheringi</i>	<i>Cryptops iheringi</i>	PWL	Latencia de retirada de pata
CEIB	Centro de Investigación en Biotecnología	<i>S. angulata</i>	<i>Scolopendra angulate</i>
CH ₃ COONH ₄	Acetato de amonio	<i>S. heros</i>	<i>Scolopendra heros</i>
cm	Centímetros	<i>S. morsitans</i>	<i>Scolopendra morsitans</i>
CPK-3	Fosfocreatinquinasa 3	<i>S. polymorpha</i>	<i>Scolopendra polymorpha</i>
CK	Creatin kinasa	<i>S. sumichrasti</i>	<i>Scolopendra sumichrasti</i>
CUC	Centro Universitario de la Costa	<i>S. viridicornis</i>	<i>Scolopendra viridicornis</i>
DEAE-sefarosa	Dtieilaminoetanol-sefarosa	<i>S. viridis</i>	<i>Scolopendra viridis</i>
EDL	Músculo <i>extensor digitorum longus</i>	<i>S.subspinipes mutilans</i>	<i>Scolopendra subspinipes mutilans</i>
EEUU	Estados Unidos de América	SDS	Dodecil sulfato de sodio
<i>et al</i>	"y otros"	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
EtOH	Etanol	SNP	Sistema Nervioso Periférico
Funsalud	Fundación Mexicana para la Salud, A.C.	HPLC-RP	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia de fase reversa
HPLC-RP	Cromatografía de alta resolución de fase reversa	sp	Especie
hr	Horas	spp	Especies
HyE	Hematoxilina y Eosina	SSP	Solución salina de perfusión
H ₂ O	Agua	TFA	Ácido Trifluoroacético
i.m.	Intramuscular	TG	Tinción modificada de Gomori
IBT	Instituto de Biotecnología	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social	UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
INNyN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	VIH/SIDA	Virus de Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de InmunoDeficiencia Adquirida
LDH	Lactato deshidrogenasa	VT	Veneno total de <i>S. polymorpha</i>
M	Concentración molar		
MALDI-ToF/ToF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight /Time of Flight-Mass Spectrometry		
mAmp	Miliamperios		
mℓ min ⁻¹	Militros por minuto		

INTRODUCCIÓN

I. El tejido muscular

El tejido muscular se caracteriza por sus propiedades que permiten el movimiento. Los miocitos, o fibras musculares, que lo componen son excitables –responden a los estímulos- y contráctiles –se pueden acortar y generan fuerza-. Estas células son multinucleadas como resultado de la fusión de mioblastos (OpenStax, 2013; Waugh y Grant, 2013).

Los músculos pueden provocar movimientos voluntarios (como mover las manos para escribir una tesis) o involuntarios (como la contracción de las pupilas ante la luz brillante). El tejido muscular se clasifica en tres tipos de acuerdo con su estructura y función: esquelético, cardíaco y liso (ver **tabla 1**). El tejido muscular esquelético es de control voluntario mientras que el cardíaco y el liso no; a su vez, el tejido liso carece de la apariencia estriada que poseen los otros dos tipos (OpenStax, 2013; Waugh y Grant, 2013).

Tabla 1. Tipos de tejido muscular. Se resumen las principales características de los tres tipos.

Músculo (tipo)	Características histológicas	Función	Ubicación
Esquelético	Fibras largas, estriadas, cilíndricas, con núcleos periféricos	Movimientos voluntarios, generan calor, protegen órganos	Unidos a huesos (mediante tendones) y en esfínteres
Cardíaco	Fibras cortas, estriadas, ramificadas, con núcleo central	Se contrae para suplir de sangre al corazón	Corazón
Liso	Fibras cortas, con forma de huso, sin estrías evidentes, un núcleo por fibra	Movimientos involuntarios (movimientos intestinales)	Paredes de los órganos más grandes

Modificada de OpenStax, 2013.

i. Tejido muscular esquelético

Este tipo de tejido se encuentra unido a los huesos y su contracción es la que posibilita la locomoción, las expresiones faciales, la postura corporal, y otros movimientos voluntarios del cuerpo. El cuarenta por ciento de nuestra masa corporal corresponde a músculo esquelético.

Cada músculo esquelético puede contener cientos de miles de fibras musculares, además de vasos sanguíneos y nervios. Como se muestra

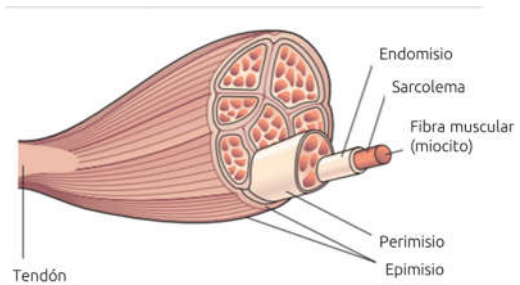


Figura 1. Organización del músculo esquelético (modificada de Waugh y Grant, 2013).

en la **figura 1**, el músculo entero está rodeada de una capa de tejido conectivo llamada “epimisio”; dentro del músculo, las fibras están separadas en haces o fascículos, y cada fascículo está cubierto por su propia capa de tejido conectivo llamada “perimisio”. Además, cada fibra al interior de los fascículos está rodeada también por una capa llamada “endomisio”. Esta red de tejido conectivo proporciona a los músculos una estructura altamente organizada, y en sus extremos se mezcla para formar el tendón, que lo une a los huesos (OpenStax, 2013; Waugh y Grant, 2013).

Bajo el microscopio, las fibras tienen apariencia cilíndrica, y se alinean paralelamente, con un aspecto bandeado –o estriado-, debido a la presencia de las proteínas contráctiles actina y miosina. Las fibras individuales pueden medir hasta 35 cm de largo en humanos. Cada fibra tiene varios núcleos localizados justo debajo de la membrana celular (sarcolema), el citoplasma (sarcoplasma) contiene filamentos muy pequeños llamados miofibrillas, además de una vasta cantidad de mitocondrias esenciales para la producción de adenosin trifosfato (ATP), a partir de glucosa y oxígeno, para proveer de energía al mecanismo de contracción. De igual manera contiene mioglobina y almacenes de calcio, el cual se libera al sarcoplasma mediante estimulación nerviosa y es esencial para lograr la contracción (Waugh y Grant, 2013).

II. Daño muscular

El tejido muscular puede sufrir daño por causas mecánicas y también debido a factores metabólicos, este daño se caracteriza por síntomas como dolor, espasmos, inflamación y contracción dolorosa del músculo. La rabdomiólisis es un síndrome que se presenta como resultado de daño directo o indirecto a la membrana muscular, lo cual ocasiona que el contenido celular sea liberado al torrente sanguíneo, lo que puede llevar a alteraciones cardíacas y daño renal (Unanúa, *et al.*, 2001; Brancaccio, *et al.*, 2010).

Algunas causas de este fenómeno se encuentran:

- a) Fármacos y drogas, como barbitúricos, antihistamínicos, fibratos, estatinas, alcohol, cocaína, anfetaminas, opiáceos.
- b) Trastornos metabólicos: cetoacidosis diabética, hipotiroidismo, hipofosfatemia, hiponatremia, hipokalemia.
- c) Infecciones bacterianas (estreptococo, legionella, salmonella) o virales (influenza, varicela zóster, VIH).
- d) Miopatías: polimiositis, dermatomiositis, entre otras.
- e) Ejercicio muscular excesivo: deporte, asma, distonías, epilepsia.
- f) Toxinas: succinilcolina, toxina tetánica, tolueno, monóxido de carbono, venenos (Unanúa, *et al.*, 2001).

Cuando se produce daño muscular, los niveles séricos de enzimas u otras proteínas presentes en el músculo esquelético se convierten en marcadores del estado funcional del tejido y pueden indicar el grado de necrosis o daño muscular por lesiones agudas y crónicas (Unanúa, *et al.*, 2001; Brancaccio, *et al.*, 2010).

Dentro de estas enzimas encontramos la creatin kinasa (CK), que cataliza el intercambio reversible de grupos fosfatos entre la fosfocreatina y el adenosin difosfato (ADP) que se producen durante la contracción muscular; su monitoreo se usa ampliamente para el diagnóstico de enfermedades como miopatías, cardiomiopatías y encefalopatías. La lactato deshidrogenasa (LDH) es otra enzima que funciona como marcador de daño muscular, al igual que la aldolasa, la aspartato transferasa (AST), las troponinas, entre otras proteínas; sin embargo CK es una de las más empleadas para identificar daño muscular a nivel sistémico (Unanúa, *et al.*, 2001; Brancaccio, *et al.*, 2010).

III. Miotoxicidad por venenos animales

Como se mencionó previamente el daño muscular puede deberse a la acción de toxinas, en particular, aquellas que producen necrosis muscular son llamadas miotoxinas. Éstas se han descrito principalmente en los venenos de serpientes, aunque también se han identificado en venenos de himenópteros (avispas, abejas), arañas, y del mismo modo se ha reportado actividad miotóxica en venenos de ciempiés del género *Scolopendra* (El-kik, *et al.*, 2013; Malta *et al.*, 2008, *et al.*, 2003; Fuly *et al.*, 2000; De Oliveira *et al.*, 2003). La actividad de estas toxinas se puede monitorear por análisis morfológico y por el aumento de la actividad de la enzima creatin kinasa (CK) en plasma, ya que ésta se libera del interior de la fibra al torrente sanguíneo, de manera conjunta con mioglobina y potasio (The Uniprot consortium, 2015; White, 2004).

IV. Los ciempiés en México

Los ciempiés (Myriapoda: Chilopoda) son un importante grupo de artrópodos predadores que se encuentran en la mayoría de los hábitats terrestres; utilizan su veneno para matar o inmovilizar a sus presas, predominantemente insectos. Comprenden aproximadamente 3300 especies, distribuidas en 5 órdenes: Scutigermorpha, Lithobiomorpha, Craterostigmomorpha, Geophilomorpha y Scolopendromorpha (ver **Figura 2**; Cupul-Magaña, 2011; Edgecombe y Giribert, 2007).

La mayor diversidad de especies se encuentra en los trópicos y zonas semitempladas. Son parte significativa de la fauna del suelo y pasan la mayoría de su tiempo debajo de éste o en pilas de piedras, hojas secas, cortezas y leños (Cupul-Magaña, 2011; Norris, 2008; Edgecombe y Giribert, 2007; Abarca *et al.*, 2001; Stankiewicz *et al.*, 1999).

La variedad de ciempiés conocidos para México es de 177 especies incluidas en cuatro órdenes y 16 familias. De este total de especies, 155 son endémicas –es decir, un 77% de endemismo. Cada uno de los órdenes se caracteriza porque sus representantes tienen un número de patas y desarrollo somático distintivo: Scutigermorpha y Lithobiomorpha, anamórficos (adicionan segmentos y patas durante el desarrollo) y ambos con 15 pares de patas; Scolopendromorpha y Geophilomorpha, epimórficos (no adicionan segmentos ni patas durante el desarrollo), el primero con 21 ó 23 pares de patas y el segundo con 31 a 181 pares de patas (Cupul-Magaña, 2013; Lewis, 1981).

Las especies más peligrosas pertenecen al género *Scolopendra*, con los miembros más grandes (*Scolopendra gigantea*), que alcanzan longitudes de 30 cm. La mayoría de las especies son más pequeñas y relativamente inocuas (Yildiz *et al.*, 2006).

El género *Scolopendra* está representado en el territorio mexicano por 13 especies, todas endémicas, con excepción de *S. heros* Girard, 1853 y *S. polymorpha* Wood, 1861 que también se distribuyen en Estados Unidos, de *S. sumichrasti* Saussure, 1860 cuya extensión abarca hasta Centroamérica, y de *S. viridis*, descrita a partir de ejemplares colectados en los estados norteamericanos de Georgia y la Florida (Cupul-Magaña, 2009).

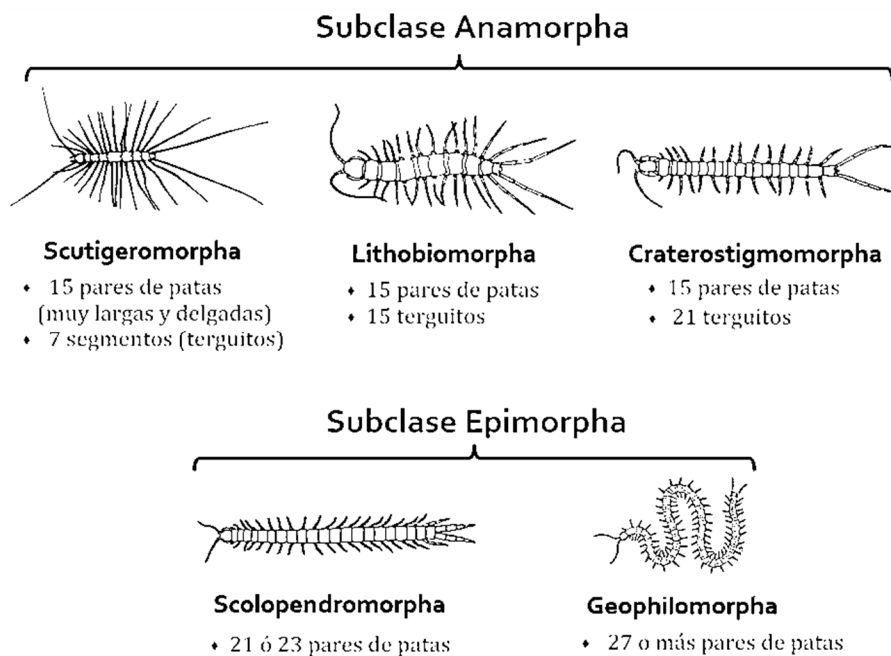


Figura 2. Chilopoda: morfología y clasificación. En la parte superior: órdenes de la subclase Anamorpha: Scutigermorpha, Lithobiomorpha y Craterostigmomorpha. En la parte inferior se señalan los órdenes Scolopendromorpha y Geophilomorpha, de la subclase Epimorpha (Dugon, *et al.*, 2012; Cupul-Magaña, 2011; Edgecombe y Giribert, 2007).

V. Efectos de la mordedura de ciempiés en humanos

Los ciempiés poseen un par de patas modificadas en su aparato bucal, llamadas forcípulas y las cuales contienen las glándulas venenosas. Cuando un humano es mordido por un ciempiés, se producen alteraciones locales como inflamación, dermatitis con vesículas pruriginosas y **dolor quemante, parestesia** y edema, que puede evolucionar hacia una necrosis superficial; en los casos graves puede haber aturdimiento, cefalea, ansiedad, problemas respiratorios, crisis convulsivas y muerte. También se ha reportado que produce proteinuria, y se menciona un caso de rabdomiólisis, fallo renal agudo y **neuropatía** multifocal tras la ingestión de una solución alcohólica (53%) del ciempiés chino *Scolopendra subspinipes mutilans* (Malta *et al.*, 2008; Cupul-Magaña, 2007; Muñoz, 2006; Hasan y Hassan, 2005; Wang *et al.*, 2004; Tay-Zavala *et al.*, 1998).

En el caso de las especies mexicanas, su mordida produce angustia, vómito, pulso irregular, mareos y cefaleas, que frecuentemente son de corta duración. Puesto que se trata de animales esencialmente nocturnos, las mordeduras son raras (Wang *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

I. Scolopendra polymorpha

Taxonómicamente, Cupul-Magaña (2013) clasifica a esta especie de la siguiente manera:

Orden: Scolopendromorpha Pocock, 1895

Familia: Scolopendridae Leach, 1815

Subfamilia: Scolopendrinae Leach, 1815

Género: *Scolopendra* Linnaeus, 1758

Especie: *Scolopendra polymorpha* Wood, 1861

Sinonimia: *Scolopendra copeiana* Wood, 1862

Scolopendra copeana Wood, 1865

Scolopendra mysteca Humbert y Saussure, 1869

Scolopendra californica Humbert y Saussure,

1870 *Scolopendra pachypus* Kohlrausch, 1878

Scolopendra leptodera Kohlrausch, 1881

Scolopendra viridilimbata Daday, 1891

Scolopendra copeiana gaumeri Pocock, 1895

Scolopendra mohavea Chamberlin, 1912

Scolopendra polymorpha pueblae Chamberlin,
1915

***Scolopendra viridis polymorpha* Attems, 1930**

Scolopendra michelbacheri Verhoeff, 1938

Scolopendra polymorpha (**Fig. 3A**) posee 21 segmentos corporales o terguitos (TE), cada uno con un par de patas articuladas. En el primer segmento del cuerpo (placa cefálica) tiene un par de antenas, además de un par de apéndices o ganchos conocidos como forcípulas (**Fig. 3B**), que en su interior tienen dos diminutos conductos unidos o glándulas productoras de veneno, y de las que se sirve para inyectar el veneno durante la mordida (Cupul-Magaña 2011; Cupul-Magaña, 2009; Tay-Zavala, 1998; Monzón-Muñoz, 1997).

Su presencia se ha reportado en los estados mexicanos de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas (Cupul-Magaña, 2013), como se muestra en la **Fig. 4**.

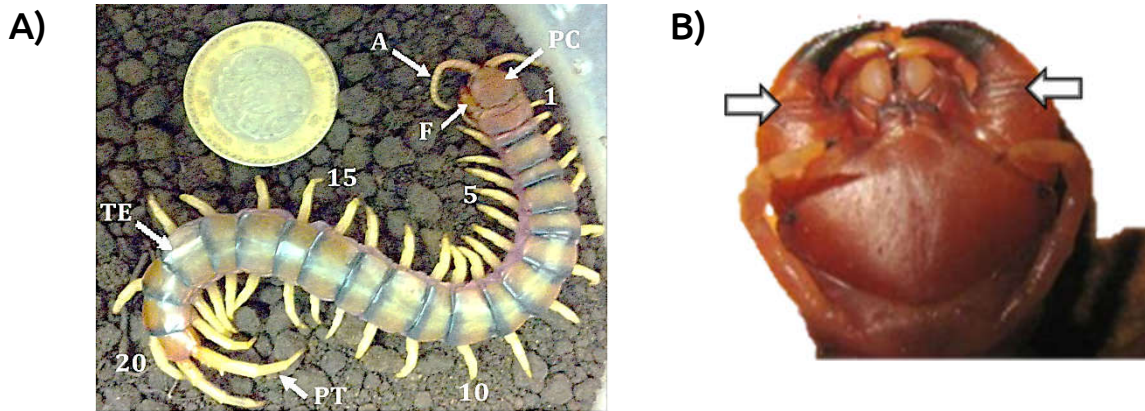


Figura 3. Morfología de *S. polymorpha*. A) Partes de su cuerpo. A: antena; F: forcípula; PC: placa cefálica; TE: terguito; PT: pata terminal. Se enumeran los pares de patas caminadoras 5, 10, 15 y 20. B) Forcípulas vistas ventralmente, señaladas con flechas.



Figura 4. Distribución de *S. polymorpha* en México. Se muestran en amarillo los estados con reportes de *S. polymorpha* y en naranja la zona de colección de especímenes, el estado de Morelos (datos de Cupul-Magaña, 2011).

II. Estudios sobre venenos de *Scolopendra* spp.

Los venenos de ciempiés son una mezcla compleja de componentes bioquímica y farmacológicamente activos; constan básicamente de dos partes: una proteica y otra no proteica. La parte no proteica está integrada por sustancias frecuentes en los venenos de animales, como aminas biogénicas: serotonina (5-hidroxitriptamina, de efecto vasoconstrictor), histamina (vasodilatadora), lípidos (fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos, ésteres de colesterol y escualeno) y polisacáridos. De la parte

proteica se han reportado diversas actividades enzimáticas y neurotóxicas, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividades tóxicas y toxinas presentes en especies de ciempiés.

Toxina/actividad	Especie	Referencia
• Enzimas		
Fosfatasa ácida	<i>Scolopendra morsitans</i>	Mohamed <i>et al.</i> , 1983
Fosfatasa alcalina	<i>S. morsitans</i>	Mohamed <i>et al.</i> , 1983
Fosfolipasa A₂	<i>S. viridicornis</i> , <i>Otostigmus pradoi</i> <i>S. viridis</i> *	Malta <i>et al.</i> , 2008 González-Morales <i>et al.</i> , 2009
Esterasa	<i>S. morsitans</i>	Mohamed <i>et al.</i> , 1983
Hialuronidasas	<i>O. pradoi</i> , <i>S. viridicornis</i> <i>S. viridis</i> , <i>S. polymorpha</i>	Malta <i>et al.</i> , 2008 Ibarra, 2011; González-Morales, 2010; Muñoz, 2006.
Metaloproteasas	<i>S. morsitans</i> <i>S. viridicornis</i> , <i>Cryptops iheringi</i> , <i>O. pradoi</i>	Mohamed <i>et al.</i> , 1983 Malta <i>et al.</i> , 2008
Serín proteasa ("Scolonasa") <i>S. subspinipes mutilans</i>		You, W.K. <i>et al.</i> , 2004
Proteínas no enzimáticas		
Cardiotoxinas	<i>S. subspinipes</i>	Gomes <i>et al.</i> , 1983
Proteína secretora rica en cisteína	<i>S. angulata</i> , <i>S. viridicornis</i>	Rates <i>et al.</i> , 2007
Desintegrinas	<i>S. viridicornis</i>	Bhagirath <i>et al.</i> , 2006
Hemolisinas	<i>O. pradoi</i> , <i>S. viridicornis</i> <i>S. subspinipes</i>	Malta <i>et al.</i> , 2008 Peng <i>et al.</i> , 2009
Miotoxinas	<i>C. iheringi</i> , <i>O. pradoi</i> , <i>S. viridicornis</i>	Malta <i>et al.</i> , 2008
Neurotoxinas	<i>Scolopendra</i> spp (Brasil) <i>Scolopendra</i> sp (México) <i>S. morsitans</i> <i>S. viridicornis</i>	Stankiewicz <i>et al.</i> , 1999 Gutiérrez <i>et al.</i> , 2003 Mohamed <i>et al.</i> , 1980 Rates <i>et al.</i> , 2007
Componentes no peptídicos		
Histamina	<i>S. subspinipes</i>	Gomes <i>et al.</i> , 1982
Serotonina	<i>S. morsitans</i> <i>S. viridicornis</i>	Mohamed <i>et al.</i> , 1980 Welsh y Batty, 1963

**S. polymorpha*, erróneamente identificada.

Modificada de Undheim y King, 2011.

Cooper y colaboradores (2014) realizaron un estudio comparativo sobre la variación en la concentración proteica y el volumen de veneno producido por *S. polymorpha* y *S. subspinipes*, con un enfoque ecológico, concluyendo que un mayor tamaño corporal es uno de los factores que determinan una mayor producción de veneno. Sin embargo, no aportan información acerca de los componentes del veneno.

De las investigaciones realizadas en el Laboratorio de Neurofarmacología del CEIB, se ha determinado que el veneno de *Scolopendra* spp puede ser letal para artrópodos como los acociles de agua dulce, larvas de insectos y chapulines (saltamontes). Además, contiene fracciones con actividad antimicrobiana, fosfolipasa, proteasa y hialuronidasa. Por otro lado, existe evidencia de que su porción tóxica modifica la permeabilidad de las membranas, aumentando la liberación basal de neurotransmisores, probablemente incrementando la permeabilidad a sodio (Ibarra, 2011; González-Morales, 2010; Muñoz, 2006; Caro, 2005; Clement, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2003).

Además, se encontró que la administración por vía intramuscular (i.m.) de veneno de *S. polymorpha* produce alteraciones en el umbral doloroso ante estímulos térmicos, daño a nervio y músculo por inflamación en ratones. En general, se observó que la administración del veneno produjo efectos especialmente notorios en los minutos 45 posteriores a su inyección en todas las pruebas realizadas. Cuando se administró por 3 y 5 días consecutivos, los ratones experimentaron una sensibilización importante, al ser comparados con un grupo control, y se observó que el tejido muscular y nervioso de la zona de inyección tenía signos de inflamación, como se observa en la Fig. 5 (Tabullo, 2012).

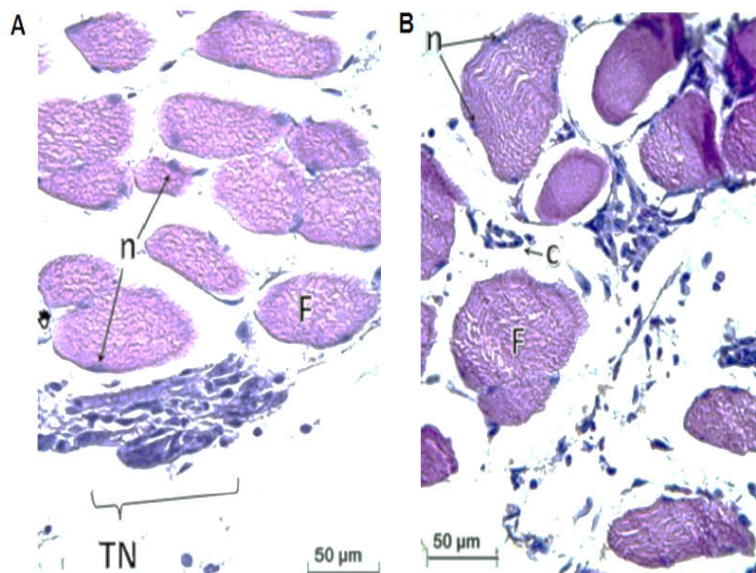


Figura 5. Histoquímica de zona de administración de veneno. A. Se muestran secciones transversales de fibras de músculo esquelético (F) y tejido nervioso (TN) de ratón, obtenidas luego de 3 días de administración i.m. de veneno total de *S. polymorpha* (25 µg/día). B. Se muestran secciones transversales de fibras de músculo esquelético (F) y tejido nervioso (TN), obtenidas luego de 5 días de administración i.m. de veneno total de *S. polymorpha* (25 µg/día). En ambos casos se observan huellas de inflamación y edema, con tejido nervioso comprimido. Cortes de 5 µm; tinción HyE. Aumento 40x (Tabullo, 2012).

JUSTIFICACIÓN

A pesar de la gran cantidad de especies de ciempiés registradas a nivel mundial, son un grupo que ha sido poco estudiado, y existe información relativamente escasa acerca de los efectos tóxicos a nivel histológico de los venenos que producen. En México se encuentran cerca de 190 especies, de las cuales 155 son endémicas (Cupul-Magaña, 2013; Undheim, *et al*, 2014).

El avance de las técnicas analíticas ha permitido que poco a poco se revelen a detalle algunos aspectos de la composición y la evolución de los venenos de estos artrópodos. Por ejemplo, se sabe que contienen una parte proteica y otra no proteica; en la proteica es posible encontrar miotoxinas (Undheim, *et al*, 2015).

Tomando en consideración la diversidad de ciempiés mexicanos, así como la convergencia con los venenos de otros animales venenosos y el hecho de que un gran número de las proteínas aisladas de ciempiés no muestran parecido con alguna otra familia proteica conocida, resulta de gran importancia continuar con el estudio de venenos de los quilópodos, a los que podemos considerar una fuente de compuestos novedosos. Por lo anterior, podemos sugerir que el estudio del veneno de *S. polymorpha* y sus efectos tóxicos en tejido muscular podrían contribuir al establecimiento de un modelo experimental de miopatía.

HIPÓTESIS

El veneno del ciempiés *Scolopendra polymorpha* contiene al menos una miotoxina, por lo es posible visualizar el daño a nivel de tejido muscular causado por exposición a alguna(s) de las fracciones de dicho veneno.

OBJETIVOS

I. Objetivo General

Caracterizar el daño estructural a tejido muscular esquelético de ratones CD1, así como las afectaciones mitocondriales causados por el veneno de *S. polymorpha*.

II. Objetivos Particulares

1. Verificar la identidad taxonómica de la especie *S. polymorpha*.
2. Separar diferencialmente distintos componentes del veneno completo de *S. polymorpha* mediante técnicas cromatográficas y electroforéticas.
3. Identificar la(s) fracción(es) en el veneno de *S. polymorpha* con actividad miotóxica sobre músculo esquelético (*extensor digitorum longus*, EDL) de ratones CD1, mediante ensayos *in vitro*.
4. Caracterizar bioquímica e histoquímicamente los efectos miotóxicos diferenciales de las fracciones del veneno, sobre músculo esquelético de ratones CD1.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A. Estrategia general



MATERIAL Y MÉTODOS

I. Material biológico

a. Escolopendras del estado de Morelos. Se colectaron especímenes que se mantuvieron recipientes individuales en el laboratorio de Neurofarmacología del CEIB. Con el objetivo de verificar la especie de los ciempiés colectados, se realizó una estancia corta en el Departamento de Ciencias Biológicas del Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara (CUC-UDG), durante el mes de noviembre de 2013, en el laboratorio del Dr. Fabio G. Cupul-Magaña.

b. Ratones hembra (CD1) de aproximadamente 30 g, adquiridos del Bioterio del Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT, UNAM).

II. Obtención y fraccionamiento de veneno

ii. Obtención y cuantificación del veneno

El veneno se colectó directamente de las forcípulas de los ciempiés por presión mecánica, tras inducirles adormecimiento por medio de temperaturas bajas. Una vez obtenido, se cuantificó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951); se liofilizó y se almacenó en congelación (-20°C) para uso posterior.

iii. Cromatografía de intercambio aniónico

Se utilizó una columna de intercambio aniónico DEAE-sefarosa (30 cm x 0.5 cm) a 4°C, previamente equilibrada y con acetato de amonio (CH₃COONH₄) como eluyente (20 mM;

pH 4.7). Se aplicó un gradiente de concentración de acetato desde 20 mM a 1 M con flujo constante de 5 ml min⁻¹. Se colectaron fracciones manualmente, para ser cuantificadas y liofilizadas para su uso posterior de acuerdo con González (2005).

iv. HPLC de fase reversa (HPLC-FR)

Se realizaron separaciones por HPLC en una columna C18 de fase reversa. La muestra se eluyó por 60 min empleando un gradiente lineal de 0% de solución A (ácido trifluoroacético, TFA, al 0.12% en agua) a 60% de solución B (TFA al 0.1% en acetonitrilo, CH₃CN), con un flujo de 1 ml/min (Ibarra, 2011).

Se realizó una colecta manual de fracciones, cada 5 min. Posteriormente las fracciones se cuantificaron por el método de Lowry, se liofilizaron a sequedad y se conservaron en congelación para uso posterior.

III. Pruebas de daño a músculo con fracciones de intercambio aniónico

Se sacrificaron 3 ratones CD1 de 30 g de peso por dislocamiento cervical. Se obtuvieron muestras de músculo esquelético que fueron conservadas con isopentano enfriado en nitrógeno líquido como fijador, para obtener cortes de 6 µm de grosor en un criostato (Leica Biosystems, Alemania). a -19.0° C.

Los cortes se incubaron por 15 y 30 min con VT o con las fracciones obtenidas para identificar aquella(s) capaz de producir alteraciones en la morfología del tejido; como control adicional, se tiñeron cortes sin incubar. Se utilizó tinción de HyE y se observaron los cortes en un microscopio óptico. Estas pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio de Patología Experimental, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNyN), en colaboración con la Dra. Juana Villeda Hernández y la Bióloga Francisca Fernández Valverde.

IV. Pruebas de daño a músculo con fracciones de HPLC-FR

i. Determinación de actividad creatin-kinasa (CK)

Se sacrificaron ratones y se obtuvo el músculo *extensor digitorum longus* (EDL) de cada una de las extremidades inferiores. El músculo se secó, pesó y se transfirió a viales de incubación con solución salina para perfusión (SSP, ver Tabla 3), con aireación constante. Se realizaron 3 lavados del músculo, a intervalos de 15 min cada uno.

Posteriormente se agregó VT o fracciones obtenidas por HPLC (previamente incubados 15 min con la solución salina a 37°C) a la solución de perfusión y se colectó el sobrenadante, almacenado a 4°C para su posterior uso en la determinación de actividad creatin kinasa (Fuly *et al*, 1999; de Oliveira *et al*, 2003).

Soluto	Concentración (mM)
NaCl	135
KCl	5
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
NaHCO ₃	15
NaH ₂ PO ₄	1
Glucosa	11

Tabla 3. Contenido de la solución salina para perfusión (SSP).

Se tomaron muestras de sobrenadante del experimento de miotoxicidad *in vitro*, antes de agregar el VT o las fracciones y el control negativo (tiempo 0 min) y a los minutos 15 y 45, mientras el tejido seguía en incubación y burbujeo constante.

La actividad CK se determinó utilizando un kit comercial de diagnóstico (*Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH*, Wiesbaden Alemania). Se tomaron 50 µl de sobrenadante de cada muestra, a tres tiempos diferentes (0, 15, 45 min) y se solubilizaron en 1 ml de solución de reacción (kit Human); se realizaron 4 lecturas de absorbancia a 340 nm (minutos 0,1,2 y 3) por cada muestra, para calcular la variación de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$) y obtener así las unidades por litro (U/l). Posteriormente, se transformaron los resultados a porcentaje de actividad CK.

ii. Tinciones estructurales

Después de realizar las incubaciones con SSP, VT y fracciones el músculo se fijó por métodos físicos utilizando con isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Se utilizó un criostato (a -17°C) y se obtuvieron rebanadas de 7 µm de grosor para luego ser teñidas con las técnicas de HyE y tricrómico modificado de Gomori (TG), que nos permitieron evaluar el daño a nivel estructural y de organización.

Estas pruebas se realizaron en colaboración con el laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNyN) con la Especialista en Microscopia, Bióloga Francisca Fernández Valverde.

iii. Pruebas de daño mitocondrial

Una vez obtenidos los cortes transversales de 7 μm de grosor, se evaluaron las reacciones enzimáticas de NADH y COX, a fin de evaluar la actividad mitocondrial de los complejos I y IV de la cadena respiratoria en los músculos expuestos a los venenos y fracciones, como se describe en los apéndices A6 y A7. Estas reacciones evalúan la formación de un producto insoluble, visible al microscopio óptico (Moreno León, 2016; Rosero-Salazar *et al*, 2014; Sargaiyan *et al*, 2014).

V. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en la aplicación de análisis de varianza (ANOVA), para determinar si existían diferencias significativas entre las medias observadas en las distintas condiciones experimentales. Las premisas del ANOVA (Normalidad de los datos y Homogeneidad de varianza) fueron contrastadas utilizando el software STATISTICA (StatSoft, Inc. (2004), y se consideró un nivel de significación igual a 0.05. Alternativamente, los datos categóricos fueron analizados mediante un test exacto de Fisher, con el objetivo de inferir asociaciones de dependencia entre variables.

VI. Búsqueda del agente miotóxico

i. Separación electroforética de la fracción activa (SDS-PAGE)

Una vez identificadas las fracciones miotóxicas, se llevó a cabo electroforesis en gel al 12% de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para comparar perfiles de una muestra de 7 μg VT y de 5-13 μg de las fracciones (F1, F2, F3, F8, F9, F11 y F12). Se utilizaron marcadores de peso molecular pre-teñidos. El corrimiento se realizó a una corriente constante de 15 mAmp. Se tiñó con azul de Coomassie (30%) en ácido acético (10%). Se calculó el peso molecular de cada banda identificable por cada fracción (, de acuerdo a la migración de los marcadores de) peso molecular (Ibarra, 2011).

ii. Electroelución

Se cortaron bandas del gel de poliacrilamida, se colocaron en tubos de electroelución y fueron sometidas a un flujo de 2.5 mA durante 2 hr para extraer la proteína del gel. La solución amortiguadora consistió en 150 mM Tris-150 mM glicina, con pH de 8.8 (Ibarra, 2011). Al término de la electroelución, se determinó el contenido proteico por densidad óptica a 280 nm, se liofilizaron las muestras y se almacenaron hasta su uso posterior.

RESULTADOS

I. Material biológico: escolopendras

En la **Fig. 6** se muestra la morfología externa de los ejemplares estudiados. Estos animales poseen un cuerpo aplanado con un par de patas por segmento, teniendo un total de 20 pares de patas caminadoras y un par de patas terminales (PT; fig. 6A), lo que nos indica que se trata de miembros del orden Scolopendromorpha. Además, se aprecia la presencia de ocelos en la placa cefálica (Fig. 6B), así como de espiráculos de forma triangular (Fig. 6C), característicos de la familia Scolopendridae (Cupul-Magaña, 2011).

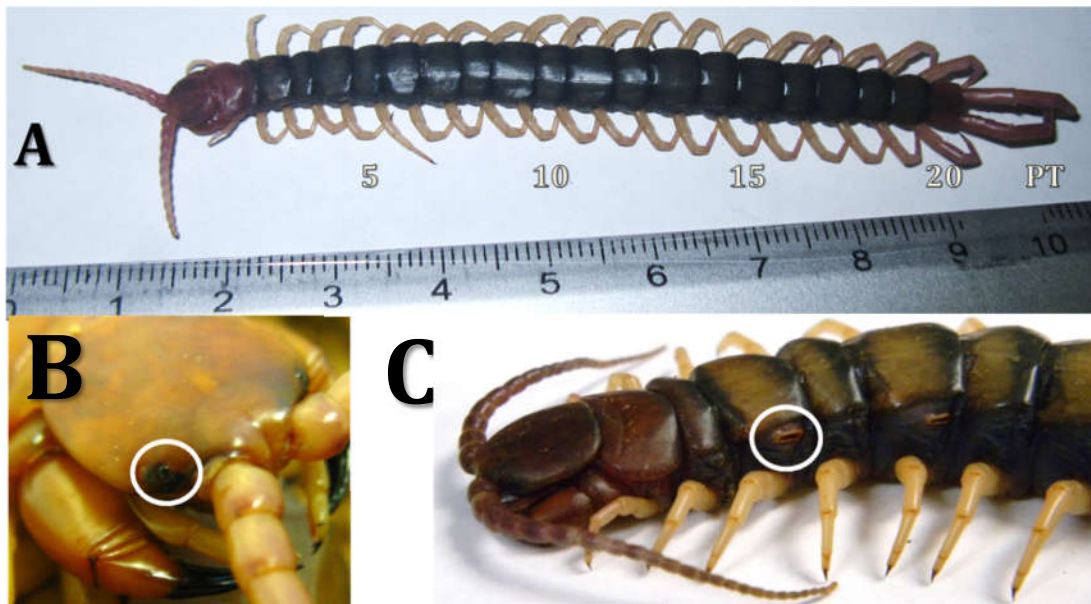


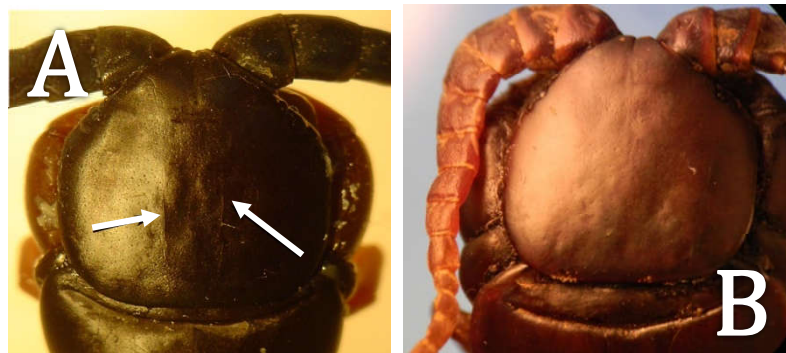
Figura 6. Morfología externa de la especie *Scolopendra polymorpha*. **A:** posee un cuerpo aplanado, con un par de patas por cada segmento; se indican los pares de patas caminadoras y el par de patas terminales (PT). **B:** se resalta la presencia de ocelos en la placa cefálica. **C:** espiráculos triangulares localizados lateralmente en algunos terguitos.

Tomando en cuenta la morfología de los especímenes, así como mediciones morfométricas y la revisión bibliográfica realizadas antes y durante la estancia mencionada, se llegó a la conclusión de que los ciempiés colectados pertenecen a la especie *Scolopendra polymorpha*, descrita por Wood (Wood, 1865).

Esta especie puede ser confundida con *Scolopendra viridis*, sin embargo es posible diferenciarlos debido a que en el último par de patas (patas terminales) *S. polymorpha* ostenta entre 4 a 12 procesos espinosos, generalmente 4, en el ápice de cada uno de los procesos prefemorales, a diferencia de *S. viridis* que comúnmente presenta 2 en cada uno. Otra peculiaridad que los diferencia, es que en *S. polymorpha* los segmentos séptimo a décimo segundo de las antenas están escasamente cubiertos de pelo áspero (hirsuto); mientras que en *S. viridis*, esto mismo se observa sólo que en los primeros cuatro a siete segmentos basales.

Por otro lado, la talla de los ciempiés también es un factor que permite discernir entre *S. viridis*, que alcanza medidas máximas de longitud y anchura de 83 mm y 5 mm, respectivamente, y *S. polymorpha*, que puede medir hasta 20 cm de longitud. Igualmente se descartó la presencia de *Scolopendra heros*, que también se encuentra en el país y alcanza un tamaño similar a *S. polymorpha* -si bien no se ha reportado en Morelos-, mediante la observación de la presencia (*S. heros*) de 2 suturas longitudinales en la placa cefálica, como se observa en la **Fig. 7** (Cupul-Magaña 2011; Cupul-Magaña, 2009; Cupul-Magaña, 2007; Shelley, 2002; Tay-Zavala, 1998; Monzón-Muñoz, 1997).

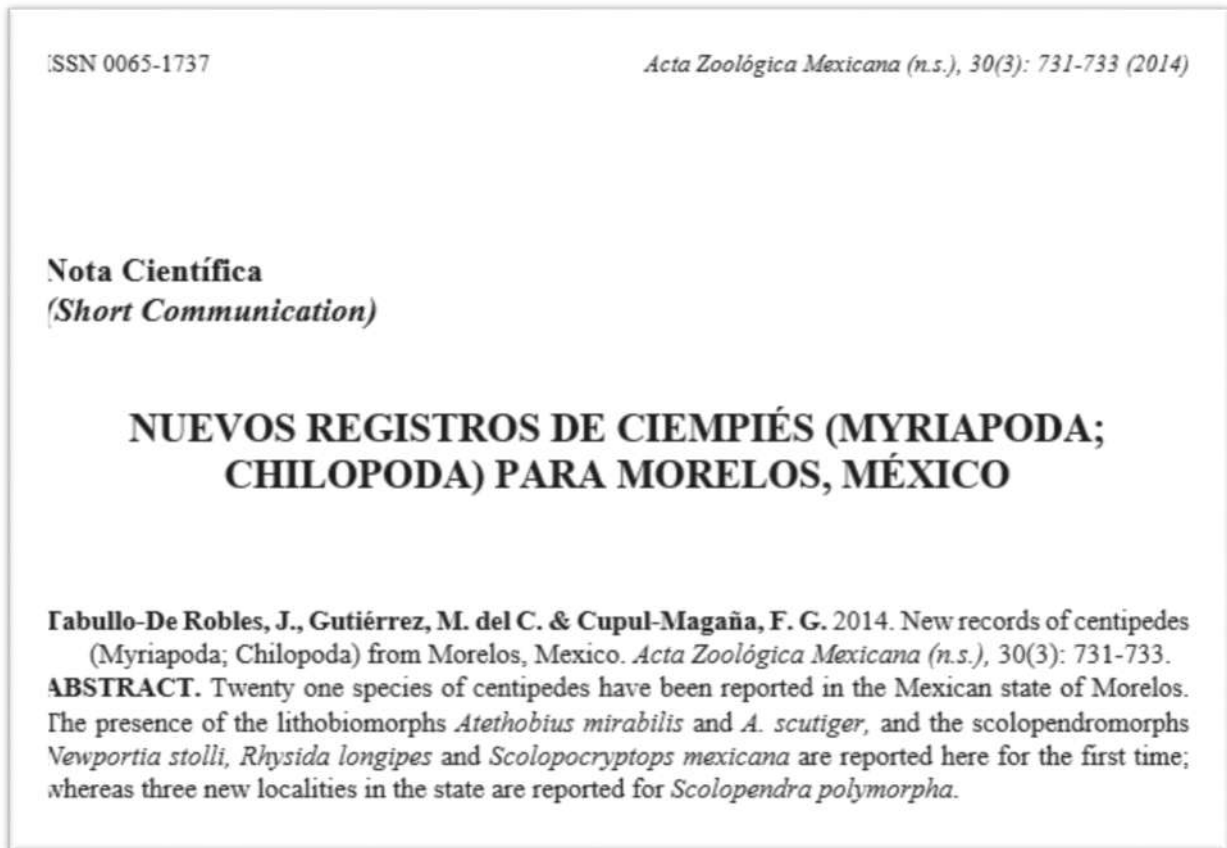
Figura 7. Suturas en la placa cefálica. **A.** Se señalan con flechas las suturas en *S. heros* (Cupul-Magaña, 2013). **B:** placa cefálica sin suturas, *S. polymorpha*.



Además de verificar la identidad de los ciempiés con que se trabaja, las colectas y la estancia realizada en el CUC, permitieron identificar 5 especies de ciempiés que no habían

sido reportadas para el estado de Morelos (*Atethobius mirabilis*, *A. scutiger*, *Newportia stolli*, *Rhysida longipes* y *Scolopocryptops mexicana*), así como tres nuevas localidades para *S. polymorpha* (Yautepec, Emiliano Zapata y Cuernavaca) en Morelos, por lo que se elaboró un manuscrito con el nombre de "Nuevos registros de ciempiés (Myriapoda: Chilopoda) para Morelos, México", el cual fue publicado en diciembre de 2014 por la revista indizada Acta Zoológica Mexicana (nueva serie), como se muestra en la **Fig. 8** (artículo completo en Apéndice A1).

Figura 8. Publicación sobre la distribución de ciempiés en el estado de Morelos. Se generó una nota científica publicada en la revista indizada Acta Zoológica Mexicana (nueva serie) en el mes de diciembre de 2014 (Apéndice A1).



II. Cromatografía de intercambio aniónico

Se obtuvieron 12 fracciones a partir de cromatografía de intercambio aniónico, como se muestra en la **Fig. 9**. Posteriormente se desalinizaron, se cuantificaron por el método Lowry, se liofilizaron y se almacenaron en congelación.

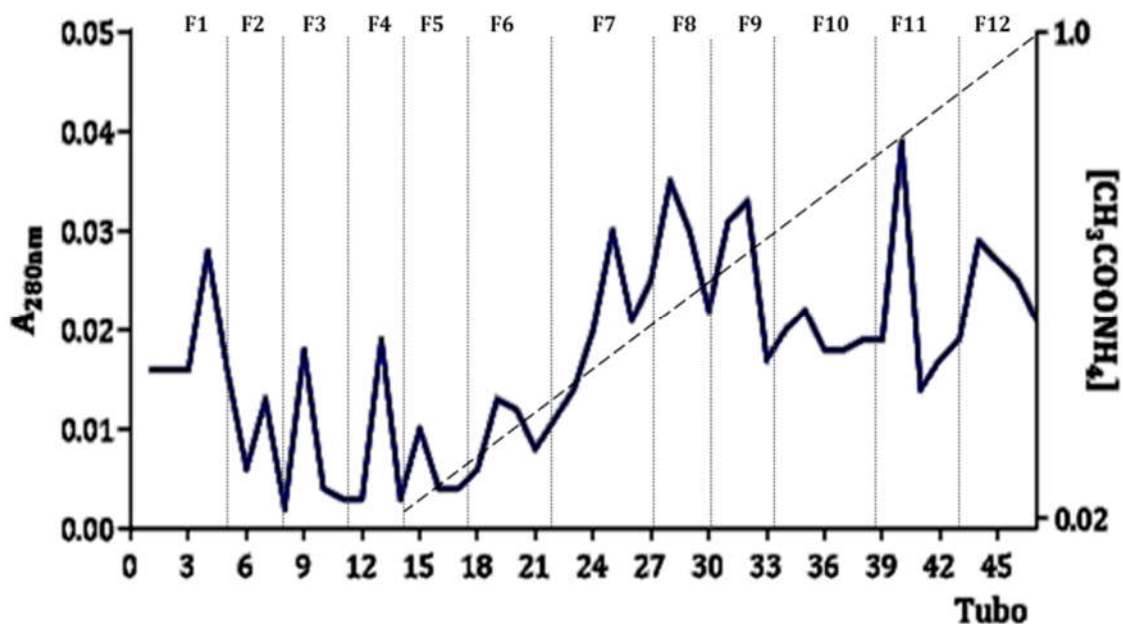
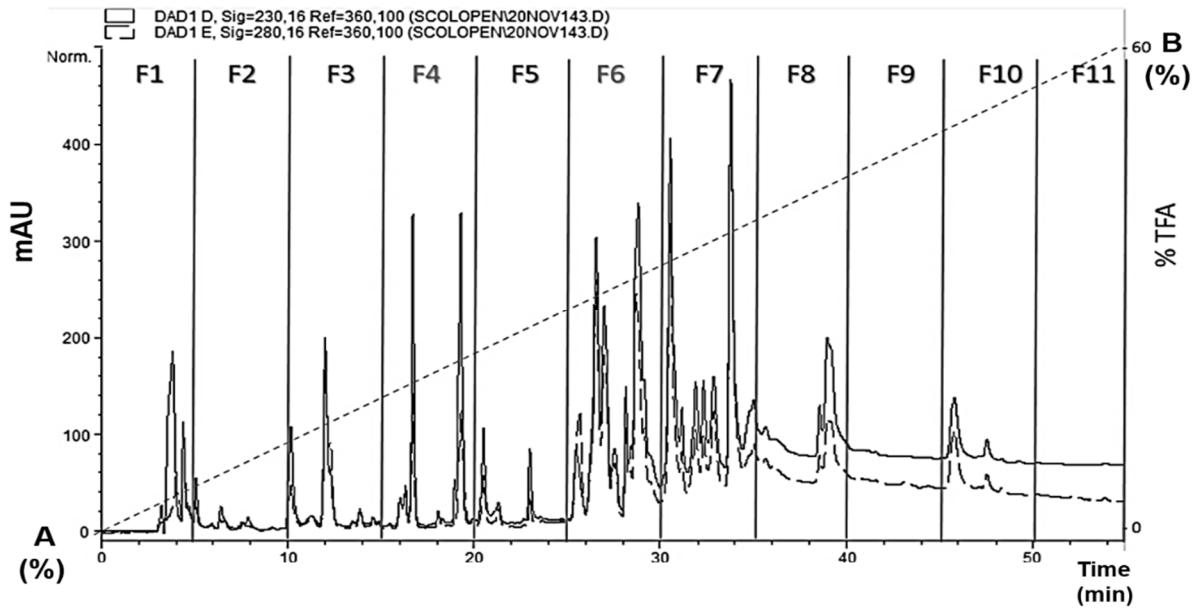


Figura 9. Perfil cromatográfico del veneno de *S. polymorpha*. Intercambio aniónico (columna DEAE-sefarosa; gradiente: 0.02-1 M CH₃COONH₄; pH=4.7; 20 gotas/tubo; 220 µg de veneno).

III. HPLC de fase reversa (HPLC-FR)

La proteína se colectó manualmente cada 5 min; en la **Fig. 10** se muestra el perfil cromatográfico obtenido con esta metodología. Se obtuvieron 12 fracciones, las cuales fueron cuantificadas (método Lowry), liofilizadas a sequedad y almacenadas en congelación hasta su uso posterior.

Figura 10. Perfil de HPLC de veneno de *S. polymorpha*. Se separaron 689 µg de VT en columna C18 de fase reversa. Gradiente de 0% de A (TFA 0.12% en H₂O) a 60% de B (TFA 0.1% en acetonitrilo). Tiempo de corrida de 60 min, con flujo de 1 ml/min. Densidad óptica monitoreada a 230 y 280 nm. Colecta manual de fracciones cada 5 min; las fracciones se indican de F1 a F11.



IV. Pruebas de daño a músculo con fracciones de intercambio aniónico

Como se observa en la **Fig. 11**, el músculo en fresco teñido sin incubar con VT o fracciones conserva la organización normal de los fascículos (F), constituidos por fibras musculares individuales (f), de forma poligonal y con núcleos en posición periférica. En los cortes mostrados, sin embargo, no se aprecian con facilidad los núcleos de las fibras musculares, que deberían mostrarse de un tono azul oscuro.

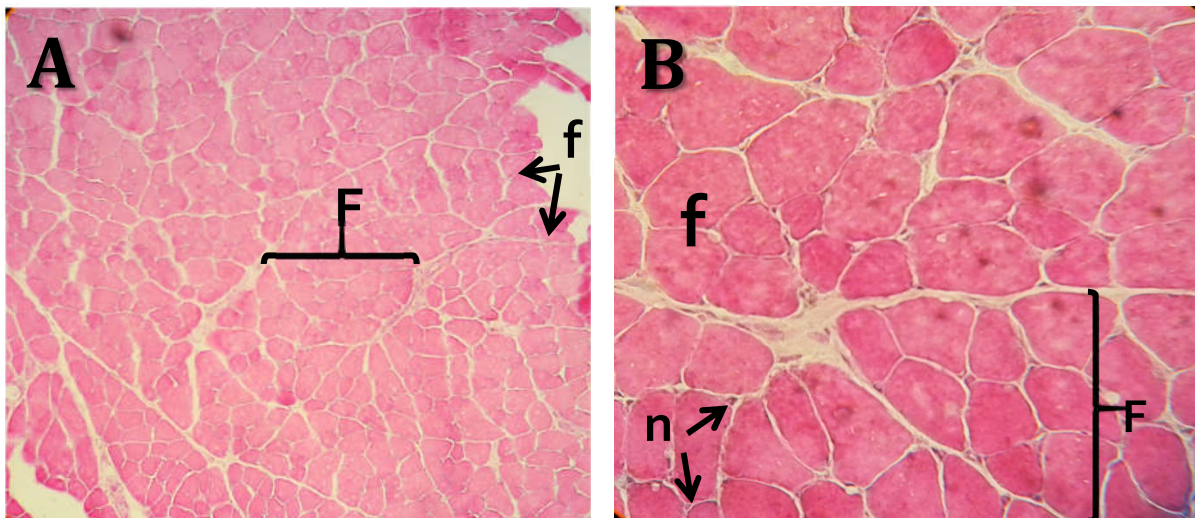


Figura 11. Músculo esquelético en condiciones control. Se observa un corte transversal de músculo esquelético de ratón en el que se aprecia la arquitectura normal de los fascículos (F) y se señalan las fibras musculares (f) y algunos núcleos (n) en la periferia de las fibras. A: aumento 100x, tinción HyE. B: aumento 400x. Tinción HyE.

Después de obtener los cortes histológicos control, se procedió a incubar por 15 min con 5 μ g de VT o fracciones y con agua destilada como control negativo.

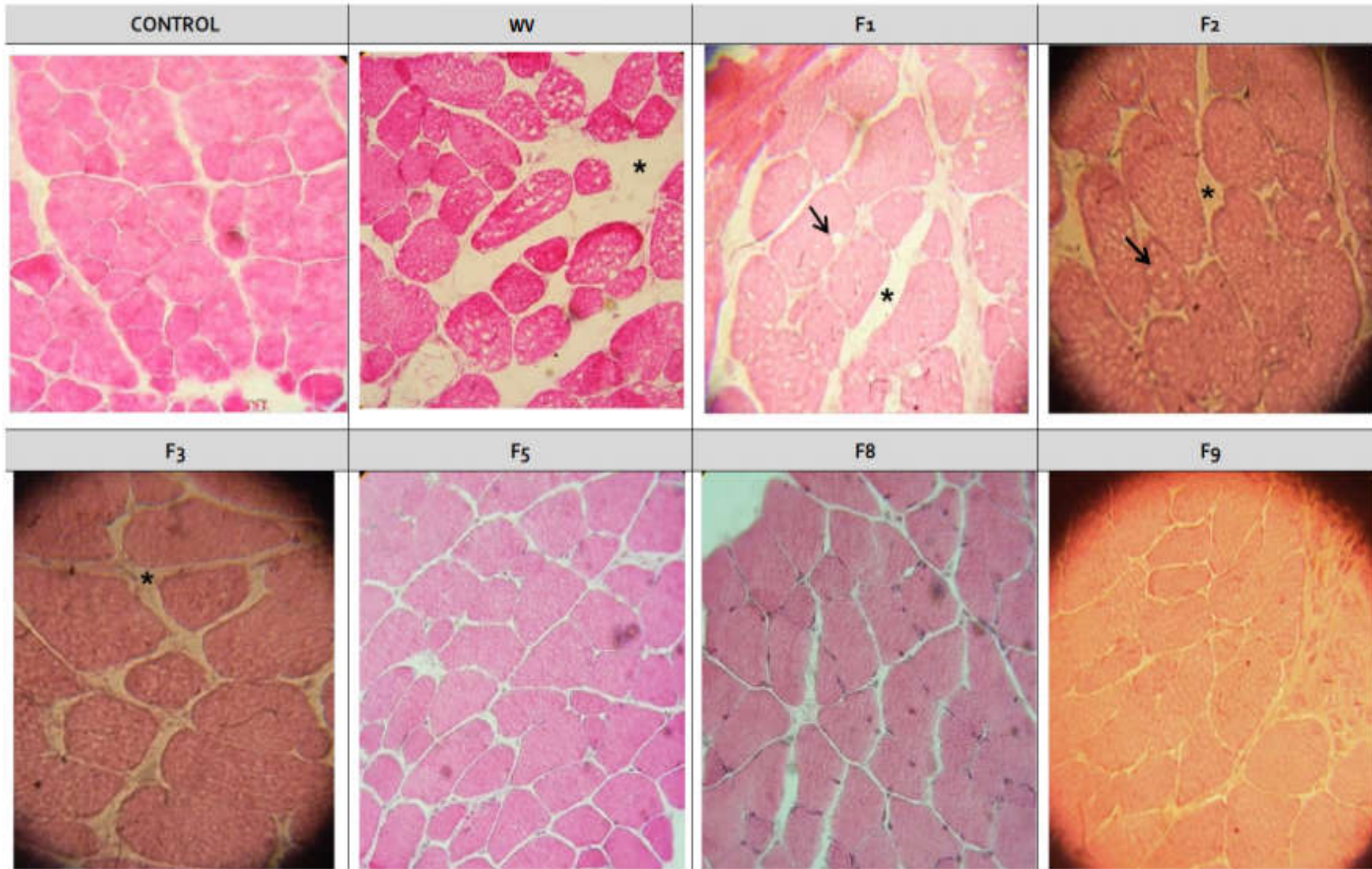
En la **Fig. 12** se presentan cortes representativos de esta condición experimental. Es notorio que, en los cortes incubados con el control (Fig. 12A), observamos una arquitectura muy bien conservada, de modo similar a lo observado en la Fig. 10, es decir, al músculo procesado sin veneno o fracciones. Sin embargo, en los cortes incubados con VT se distingue la presencia de vacuolas en el interior de las fibras musculares, indicio de daño. La formación de vacuolas se observó también al incubar con las fracciones F1, F2 y de modo más discreto con F3. Además, se aprecia que las fibras musculares están más separadas entre sí, llegando incluso a ser difícil distinguir la estructura de los fascículos (VT y F1).

La Figura 12B muestra cortes incubados por 30 min con VT y algunas fracciones. En condiciones control, se observa un alto grado de conservación de la estructura normal del músculo. Se vio la formación de vacuolas en el caso de la fracción F9 y en menor grado F11. Al incubar con VT, no se observó el mismo grado de alteraciones que en el caso de incubación con VT por 15 min. Es interesante que nuevamente se aprecia un mayor grado de separación entre las fibras musculares al incubar con VT y con las fracciones F9 y F12.

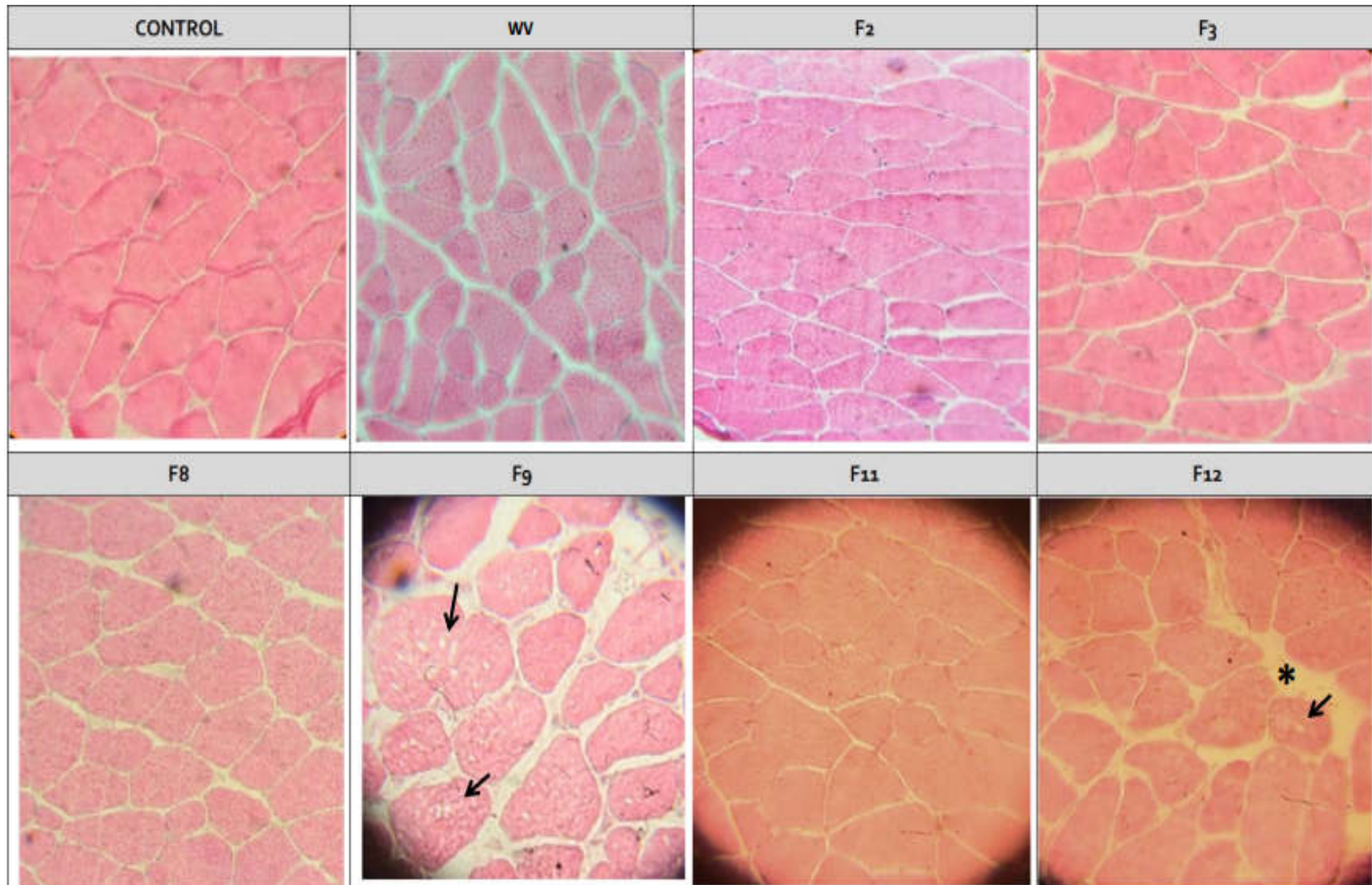
En la Figura 12C se presentan los resultados de la incubación de cortes de músculo esquelético incubados por 45 min con VT y con fracciones. Bajo las condiciones control, el tejido conserva una organización similar al control sin incubar (fig. 11). Al incubar con VT y con las fracciones F2, F3, F8, F9, F11 y F12 se presentó el fenómeno de vacuolización aparente en el interior de las fibras musculares, si bien puede ser causado por exposición a solución salina.

Figura 12. Cortes de músculo esquelético de ratón.

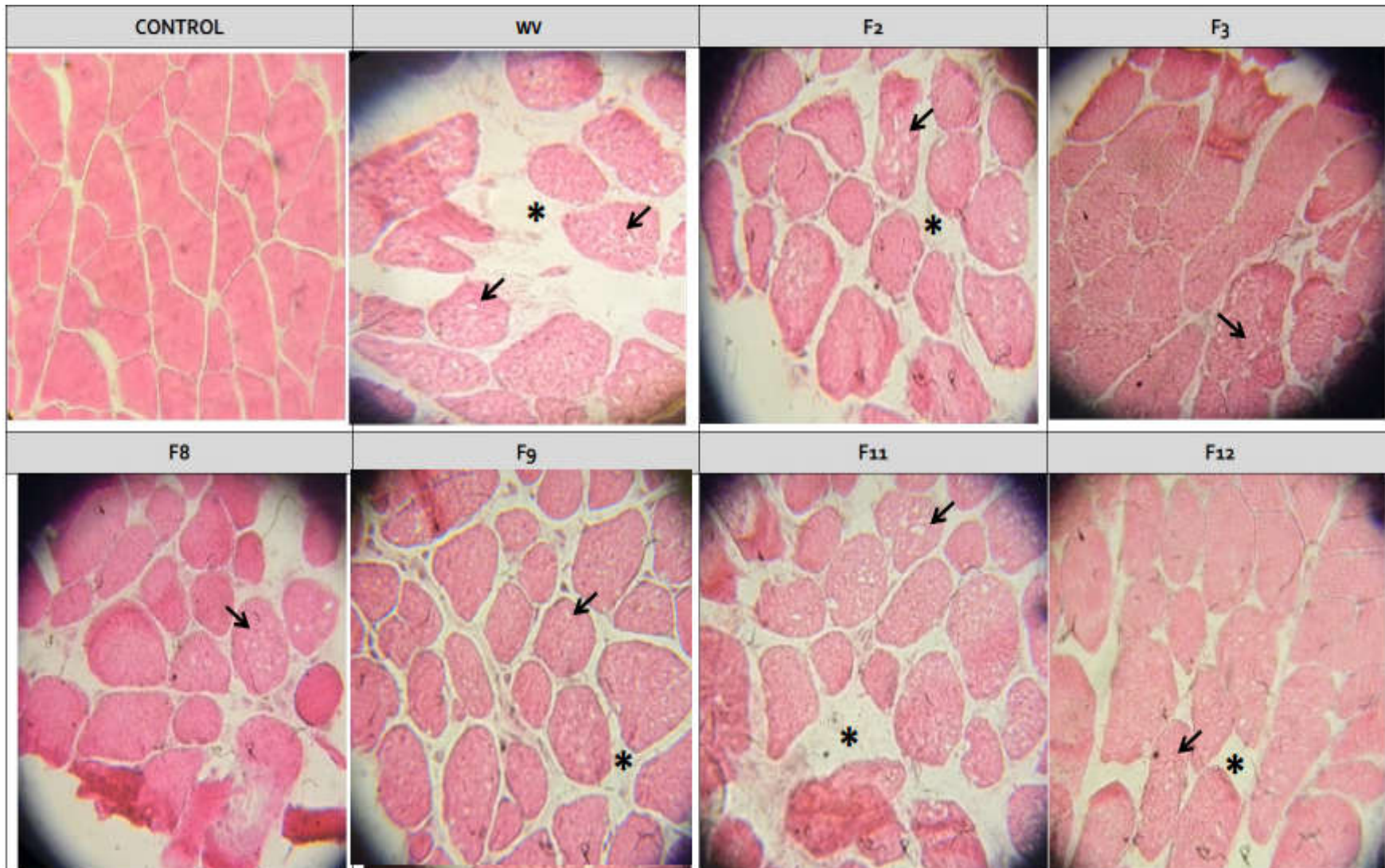
A) Cortes incubados por 15 min con H₂O y VT como control, o con algunas fracciones obtenidas por intercambio aniónico. Cortes transversales de 6 µm de grosor. Tinción HyE. Aumento: 400x. * = espacios aumentados entre las fibras. → = aparentes vacuolas dentro de las fibras musculares.



B) Cortes incubados por 30 min con H₂O y VT como control, o con algunas fracciones obtenidas por intercambio aniónico. Cortes transversales de 6 μm de grosor. Tinción HyE. Aumento: 400x. * = espacios aumentados entre las fibras. → = aparentes vacuolas dentro de las fibras musculares.



C) Cortes incubados por 45 min con H₂O y VT como control, o con algunas fracciones obtenidas por intercambio aniónico. *Cortes transversales de 6 μm de grosor. Tinción HyE. Aumento: 400x.* * = espacios aumentados entre las fibras. → = aparentes vacuolas dentro de las fibras musculares.



V. Pruebas de daño a músculo con fracciones de HPLC-FR

i. Determinación de actividad CK

La **Fig. 13** muestra los resultados de la determinación de la actividad CK. Esta se mantuvo en niveles bajos en las muestras tomadas al tiempo 0 min, y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que era de esperarse considerando que a ese tiempo no se habían administrado ni los venenos ni las fracciones. En las mediciones correspondientes a 15 min, encontramos que al incubarse con SS y CS, la actividad se mantiene baja, mientras que con SP y las fracciones hubo un aumento, que fue significativamente diferente de los controles SS y CS. La fracción F6 fue la que produjo el aumento más notorio, seguida de la F7. Para el minuto 45 después de agregar los venenos, observamos que la fracción F7 es la que produjo mayor actividad de CK, y F6 le siguió.

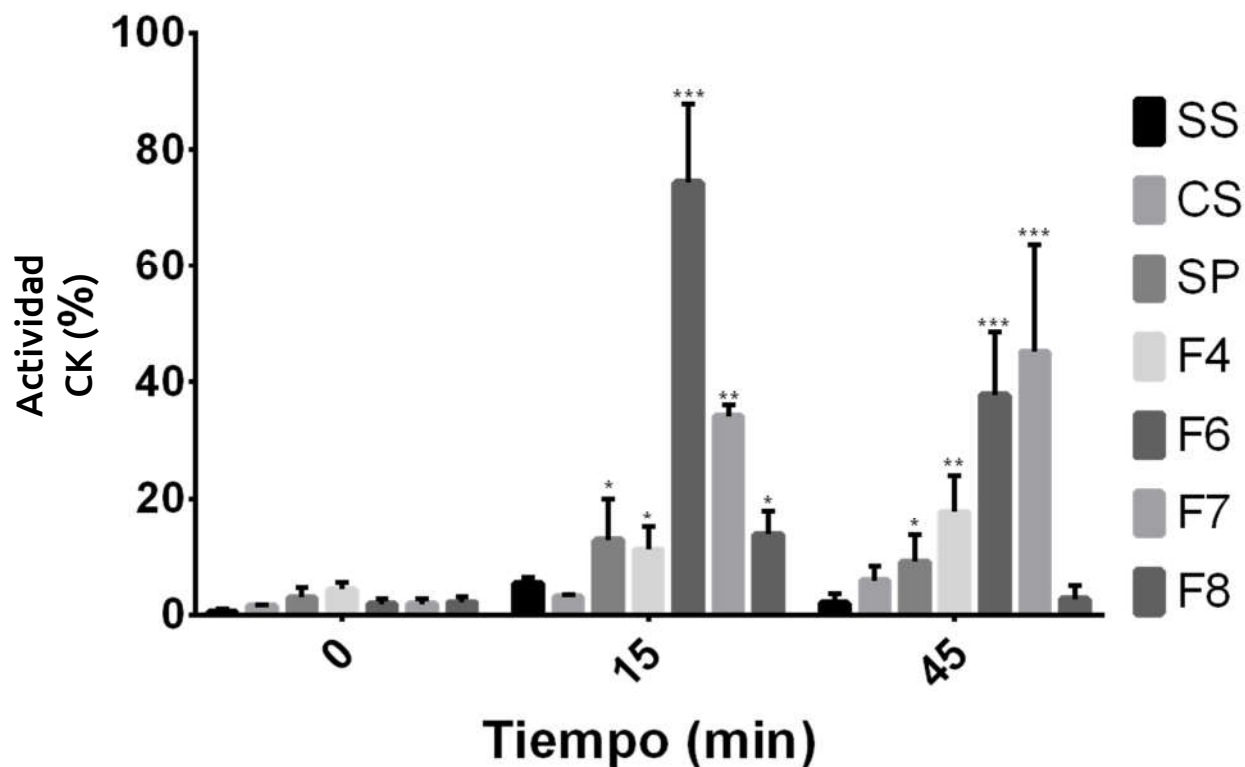


Figura 13. Actividad CK *in vitro*. Se realizaron mediciones al tiempo 0 min, antes de exponer el músculo a los controles y las fracciones de veneno. SS= solución salina; CS= veneno total de *C. durissus*; SP= veneno total de *S. polymorpha*; F4-F8= fracciones obtenidas por HPLC de fase reversa. Se muestra la media \pm SEM. Los asteriscos representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos homogéneos según el análisis estadístico.

ii. Tinciones estructurales

En la **Fig. 14A** se muestran microfotografías de algunos cortes teñidos con HyE. Encontramos que SS no altera la arquitectura muscular, ya que se distingue con claridad la estructura fascicular, así como la posición periférica de los núcleos. El veneno CS parece afectar ligeramente la arquitectura tisular, con zonas de necrosis e inflamación. En las muestras expuestas a SP, se observan también áreas donde la estructura fascicular es reconocible, la mayoría de los núcleos se encuentran en posición periférica, si bien se señala un núcleo en posición central; también encontramos zonas de inflamación y necrosis.

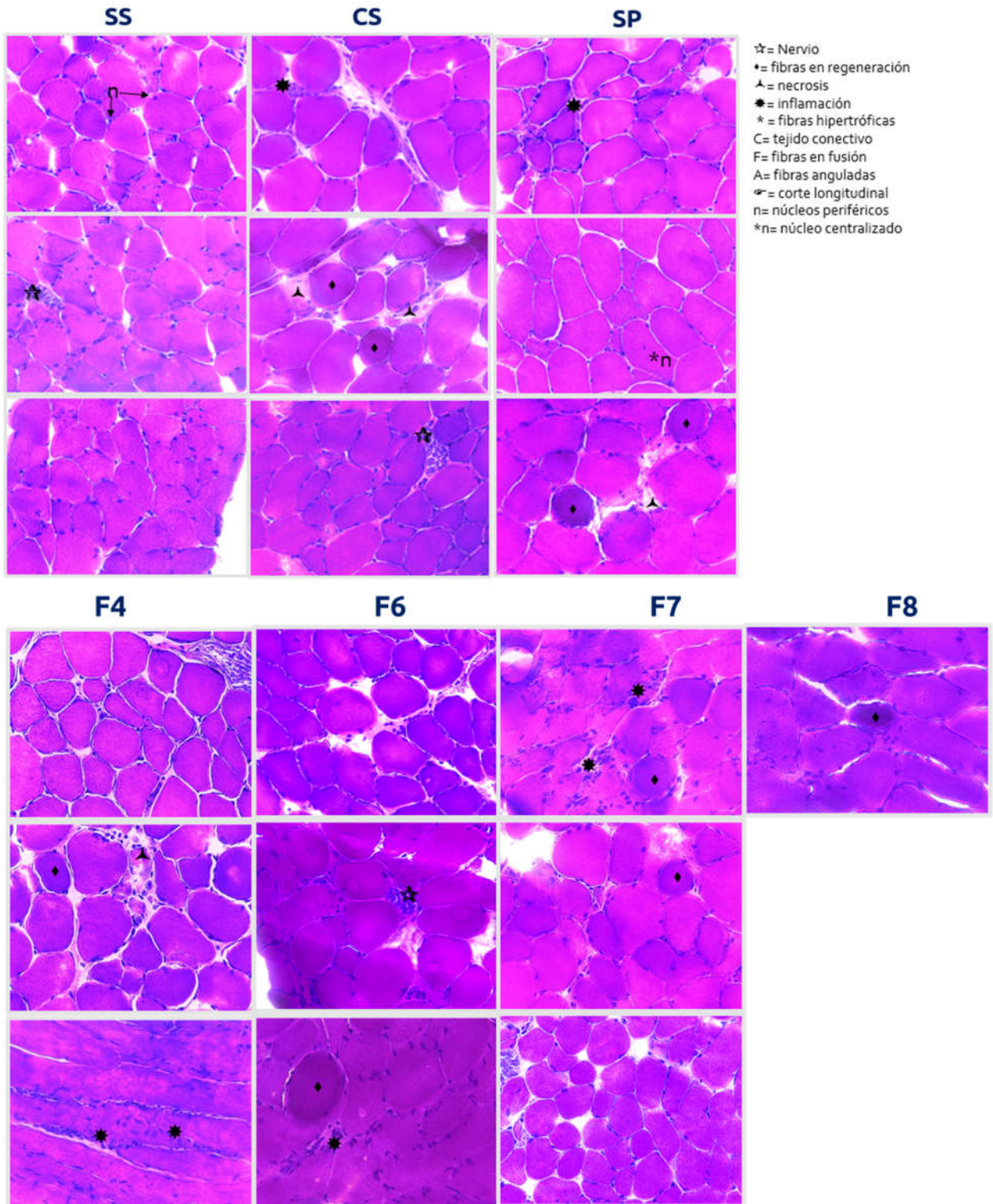
En el tejido incubado con F4 observamos también zonas de inflamación, la cual se muestra de manera particular en el tercer corte de orientación longitudinal; hay indicios de necrosis y se señalan algunas fibras hipertróficas. Al exponer a F6, encontramos zonas de inflamación principalmente. En el caso de tejido incubado con F7 también es notoria la inflamación, algunos indicios de necrosis y la presencia aparente de fibras en fusión. Finalmente, en el tejido expuesto a la fracción F8, hallamos evidencia de internalización nuclear.

En la **Fig. 14B** se muestran los resultados de la tinción con la técnica de tricrómico modificado de Gomori, que permite identificar algunas alteraciones morfológicas de las mitocondrias, como la presencia de fibras rojas rasgadas (FRR). Es interesante que se encontraron algunas FRR en los tejidos incubados con VT y fracciones, pero no con el control negativo (SS).

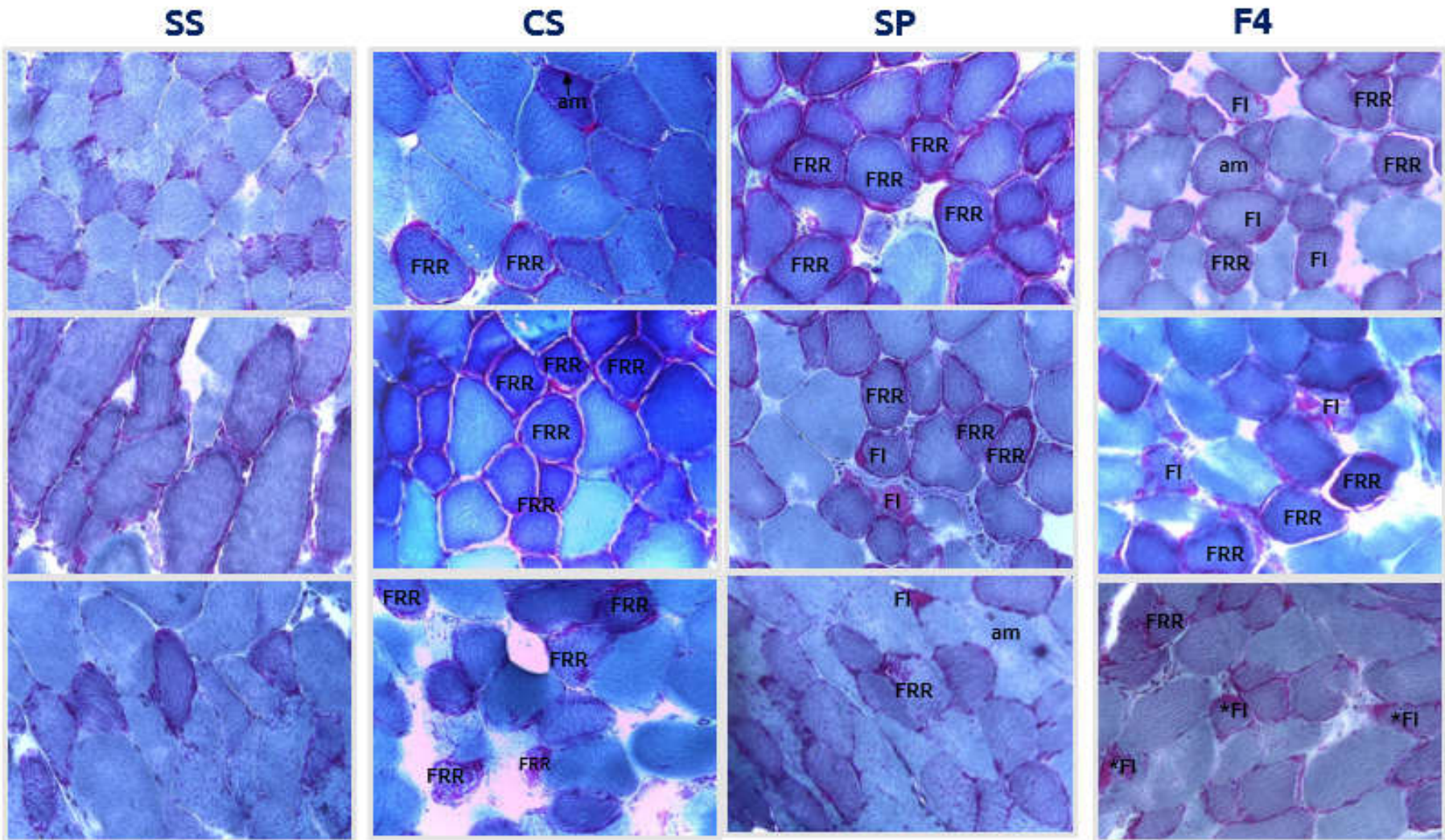
Llevamos a cabo una cuantificación de las FRR por campo, en un total de 9 campos por tratamiento y aplicamos un análisis estadístico (ANOVA), el cual mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras expuestas tanto a SP como a las fracciones F4, F6 y F7, y al control negativo, SS; en el caso de F8 no se encontraron diferencias significativas.

Figura 14. Cortes de músculo incubado con fracciones de HPLC-FR.

A) Cortes de músculo esquelético tratado con SS y VT como control, con CS y con algunas fracciones obtenidas por HPLC-RP. Cortes transversales de 7 μ m de grosor. Tinción HyE. Aumento: 400x.



B) Cortes de músculo esquelético tratado con SSP y VT como control, y con algunas fracciones obtenidas por HPLC-RP. *Cortes transversales de 7 µm de grosor. Tinción tricrómico modificado de Gomori. Aumento: 400x.*



FRR= Fibras Rasgadas Rojas

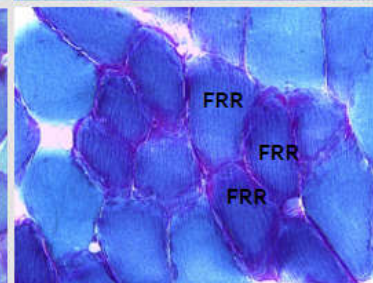
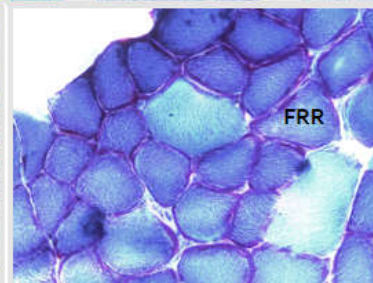
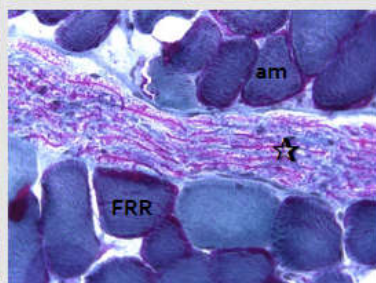
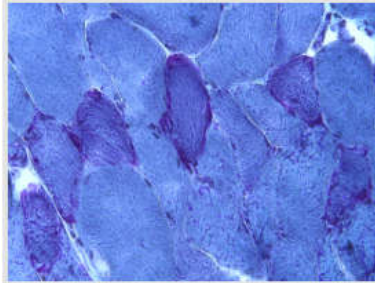
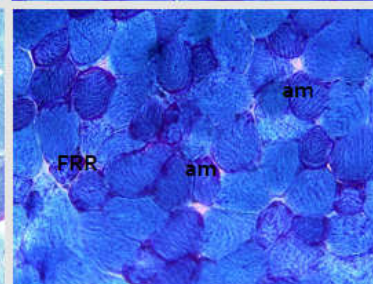
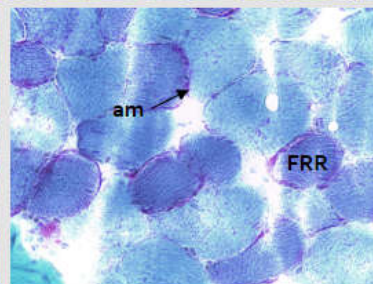
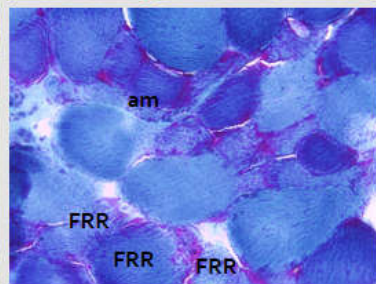
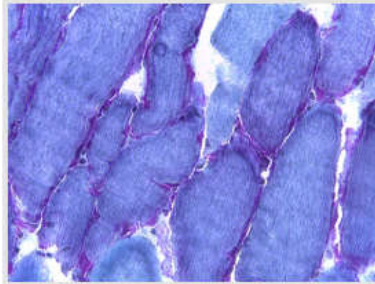
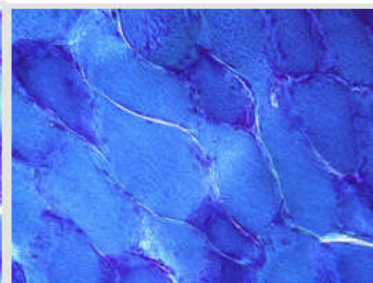
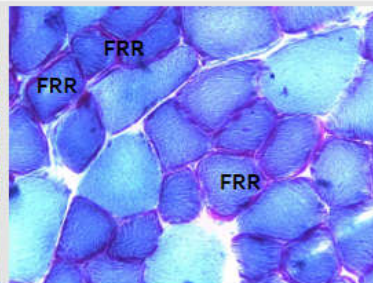
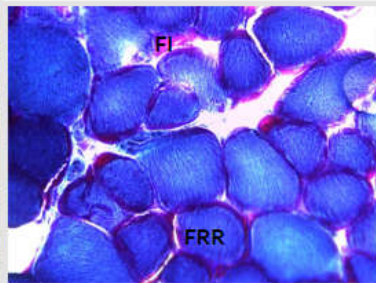
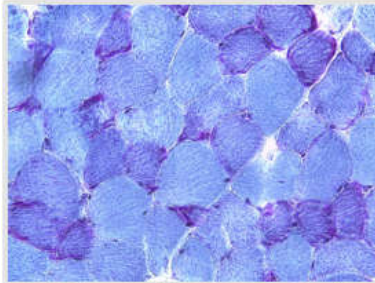
SS

F6

F7

F8

FI= fibras con inclusiones
am= acúmulos mitocondriales
☆= Nervio



iii. Pruebas de daño mitocondrial

Se midieron las reacciones enzimáticas de NADH y COX, a fin de evaluar la actividad mitocondrial de los complejos I y IV de la cadena respiratoria en los músculos expuestos a los venenos y fracciones. Estas reacciones se basan en la formación de un producto insoluble, visible al microscopio óptico (Moreno León, 2016; Rosero-Salazar *et al*, 2014; Sargaiyan *et al*, 2014).

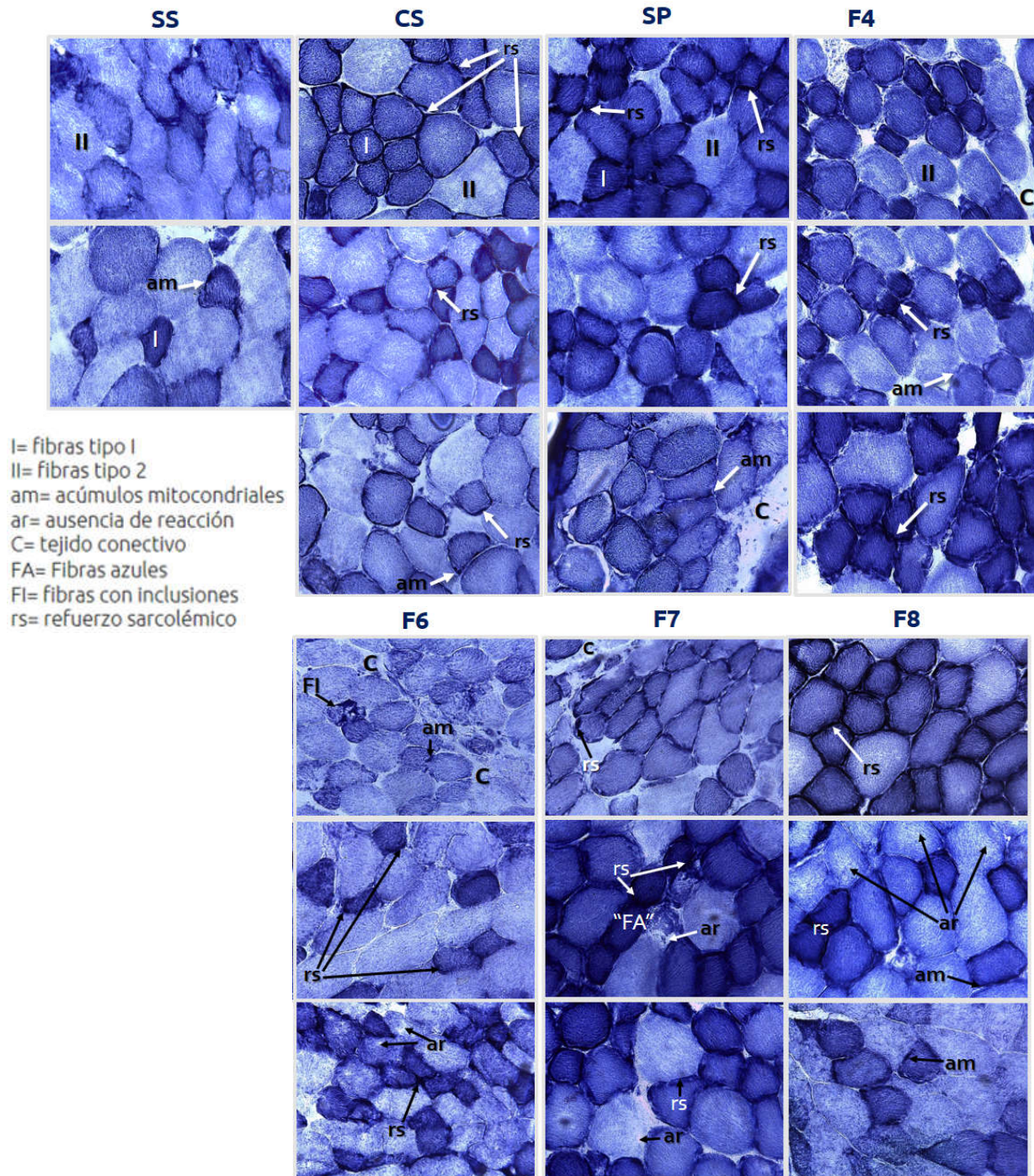
La **Figura 15A** muestra los resultados correspondientes a la reacción de NADH. Esta técnica evalúa la actividad NADH de manera indirecta, por la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) a formazán (NBT⁻), un compuesto de azul muy intenso; de este modo es posible identificar a las fibras tipo I, altamente oxidativas y ricas en mitocondrias (acúmulos mitocondriales, am), adquieren un tono azul oscuro, y las fibras tipo II que se tiñen de tonos azules más claros, como se señala en el panel correspondiente al tejido incubado con SS. En cuanto al músculo expuesto a CS, se señalan fibras tipo I con refuerzo sarcolémico (rs), y algunas con acúmulos mitocondriales (am). Este fenómeno (rs) lo observamos también en tejido incubado con SP, F4, F6, F7 y F8. En F6 pudimos comprobar la presencia de fibras con inclusiones, identificadas con la tinción T-G, además de que se distinguen algunas zonas con ausencia de reacción (ar).

En la figura 15B se muestra la reacción de la citocromo C oxidasa (COX). En esta prueba, se forma un precipitado color marrón en el sarcoplasma, debido a la oxidación del colorante diaminobencidina (DAB) por acción de la COX mitocondrial. Las fibras tipo I se observan en café oscuro y las tipo II en tonos más claros, como se muestra en el panel correspondiente al tejido expuesto al control negativo (SS); incubando con CS se distinguen los tipos de fibras y se distinguen pequeñas zonas de ausencia de reacción (ar) en algunas fibras tipo II, también se señala una fibra fantasma o negativa (*). Como se puede observar, también se encontraron fibras negativas en el tejido incubado con SP, F4 y F7. Con F8 se observan cambios mínimos en el tejido.

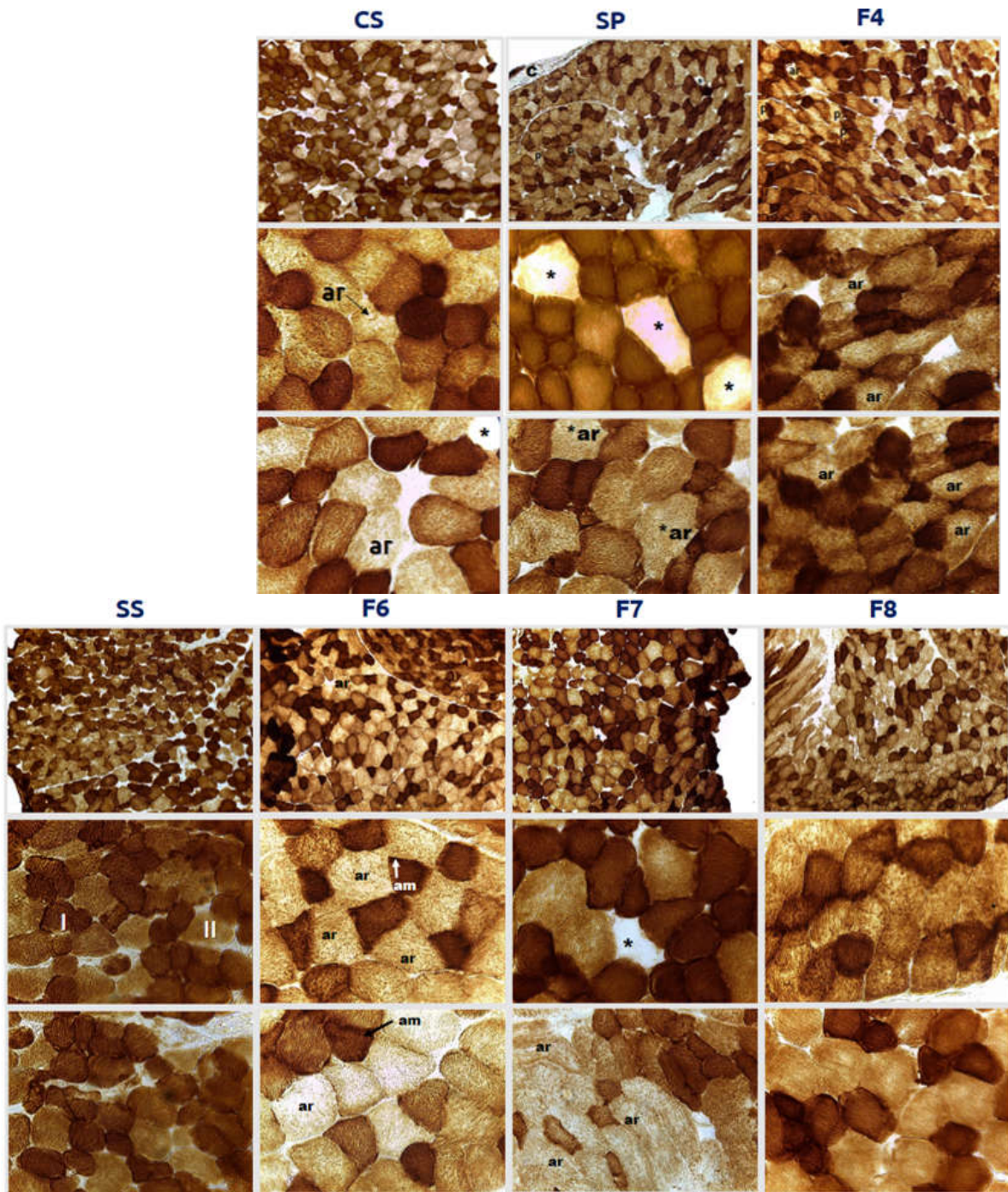
La prueba de ATPasa miosínica permite evaluar la distribución de las fibras según la rapidez de contracción (lentas o rápidas) aún en aquellas con atrofia selectiva y de manera independiente de la edad del individuo. El método para evaluar la ATPasa se basa en la formación de sulfuro de cobalto (CoS), un precipitado negro. A pH 9.4, las fibras tipo I se ven en tonos claros y las tipo II son más oscuras, como se observa en la figura 15C (Moreno-León, 2016; Rosero-Salazar *et al*, 2014).

Figura 15. Reacciones enzimáticas en músculo expuesto a veneno.

A. **Reacción de NADH.** Cortes de EDL tratado con SS, CS y SP como control, y con algunas fracciones obtenidas por HPLC-RP. Cortes transversales de 7 µm de grosor. Aumento: 400x.



B. Reacción de COX. Cortes de EDL tratado con SS, CS y SP como control, y con algunas fracciones obtenidas por HPLC-RP. Cortes transversales de 7 µm de grosor. Aumento: 100x (primera fila de microfotografías) y 400x.

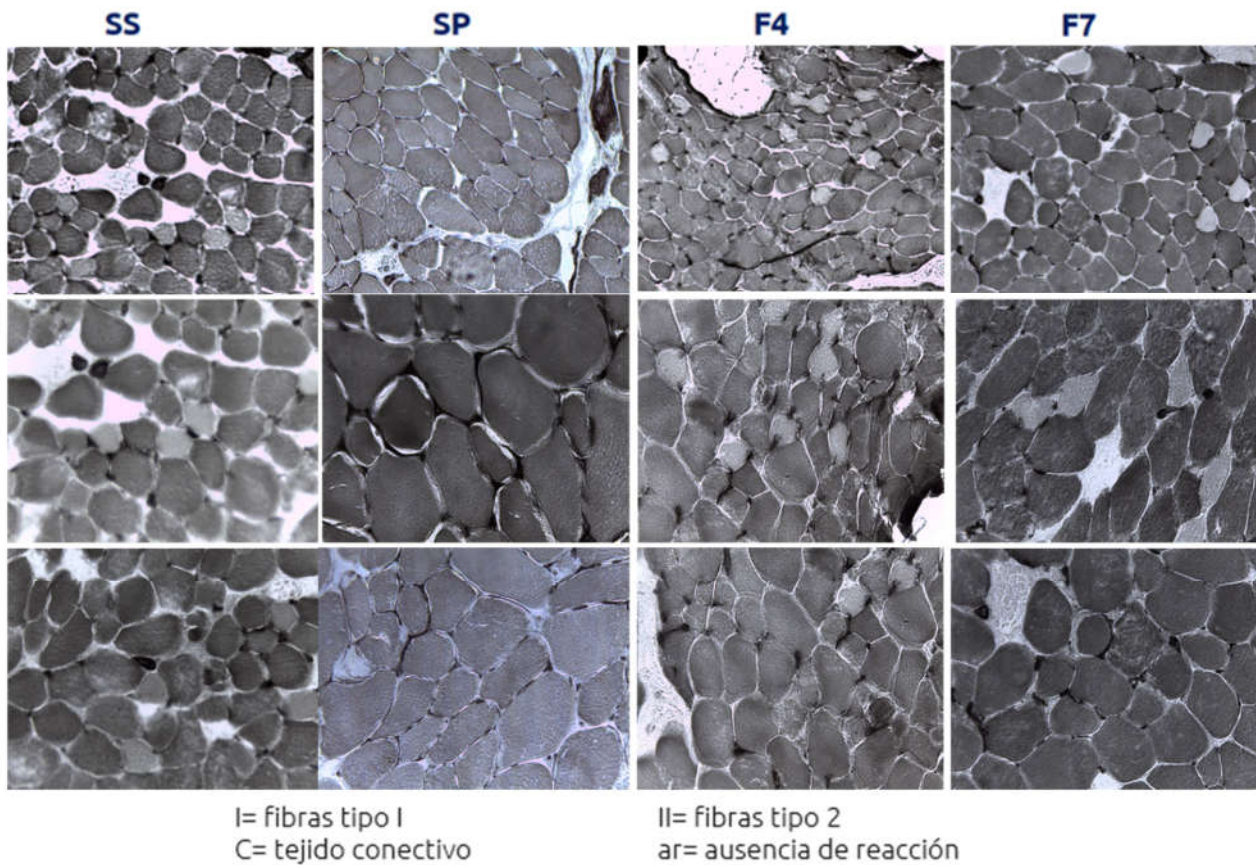


I= fibras tipo I
II= fibras tipo 2

*= fibras fantasma
ar= ausencia de reacción

C= tejido conectivo
p= fibras pálidas

C. Reacción de ATPasa miosínica. Cortes de EDL tratado con SS, CS y SP como control, y con algunas fracciones obtenidas por HPLC-RP. Cortes transversales de 7 µm de grosor. Aumento: 100x (primera fila de microfotografías) y 400x.



i. Cuantificación de la actividad enzimática NADH

En la **figura 16** se muestran resultados de la cuantificación de actividad NADH en el músculo expuesto al veneno y sus fracciones, realizada con el software FIJI (Schindelin, *et al*, 2012). En el panel A se muestra la reacción enzimática en una muestra control, en la que se observa la coloración azul debida a la formación de azul de formazán y en el panel B se muestra el resultado de la cuantificación mediante el software: las áreas marcadas en rojo corresponden a las áreas donde el azul de formazán fue más intenso. Se tomaron en cuenta 9 campos por cada muestra de tejido (27 campos por tratamiento) y se calculó el porcentaje de área del campo marcada en azul oscuro -las zonas con mayor actividad mitocondrial.

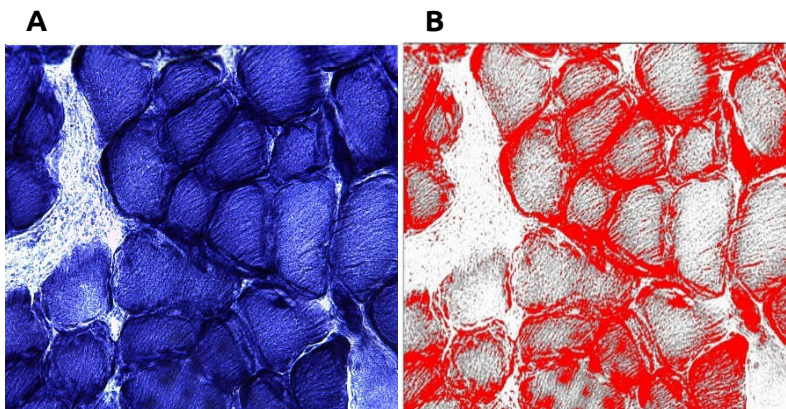


Figura 16. Cuantificación de actividad NADH con software FIJI. A) Microfotografía de actividad enzimática NADH. **B)** Microfotografía procesada en FIJI para resaltar las áreas de actividad enzimática. Aumento: 40x.

Los resultados de dicha cuantificación se muestran en la **figura 17**. Debido a que en todas las fibras musculares existe actividad mitocondrial –y por lo tanto actividad NADH-, considerando además que entre las fibras tipo II encontramos las llamadas “fibras azules”, al graficar el porcentaje de área teñida encontramos que esta es significativamente menor en los cortes expuestos a F6, F7 y F8 (**), mientras que con VT parece que no hay diferencia al comparar con el área teñida al incubar con control negativo –lo cual puede ser un enmascaramiento debido a la presencia de las fibras azules-.

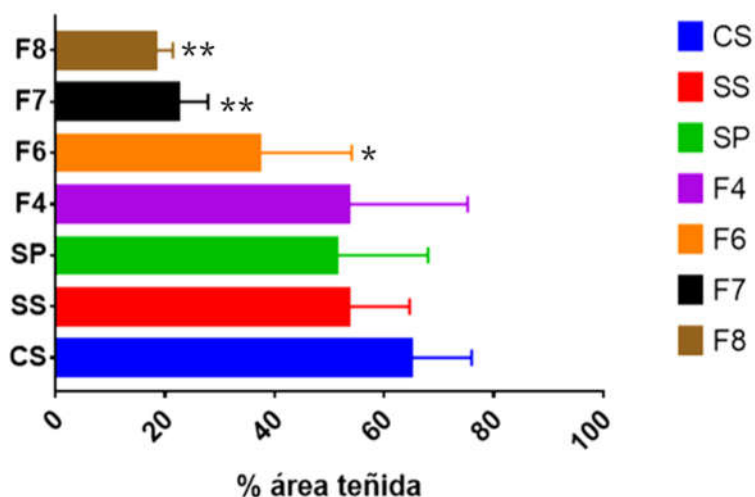


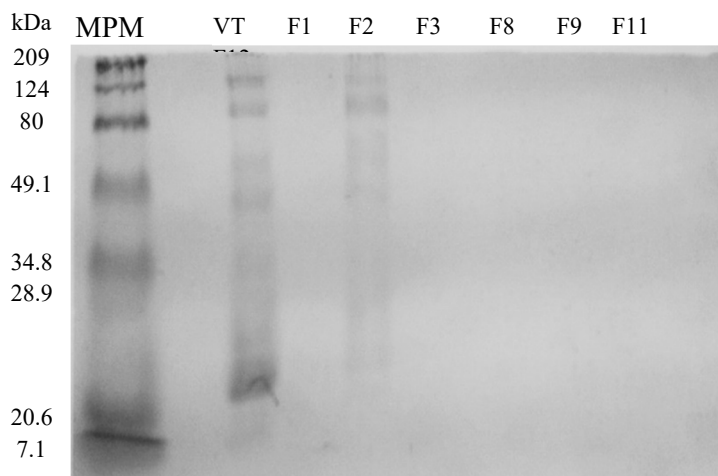
Figura 17. Porcentaje de área de actividad NADH. Se muestran los porcentajes de áreas de actividad NADH, cuantificados mediante el software FIJI. Valores de la prueba exacta de Fisher, * $p=0.0465$ para F6, $p=0.002$ para F7; $**p<0.00001$ para F8.

VI. Búsqueda del agente mitotóxico

i. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por intercambio aniónico y por HPLC

Como se observa en la Fig. 18, al comparar el perfil electroforético del VT y de la fracción 2 (F2, carril 5), son muy parecidos, por lo que se han realizado nuevas separaciones cromatográficas y se prepararon nuevos geles SDS-PAGE, con resultados similares al gel mostrado.

Figura 18. Perfil electroforético de VT y fracciones. Gel al 12% de acrilamida; carril 1: marcadores de peso molecular (MPM); carril 3: 7 µg de VT; carriles 4-10: fracciones obtenidas por intercambio aniónico. Se indica en el extremo izquierdo el peso en kDa de los marcadores utilizados.



Debido a los resultados obtenidos con la electroforesis de las fracciones de intercambio aniónico, se optó por otra vía de separación del VT: HPLC-FR, de modo que también se obtuvo el perfil electroforético de las fracciones que fueron obtenidas mediante esta cromatografía.

Se tomaron 10 µg de cada una de las fracciones y se separaron en gel de poliacrilamida al 12%. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. En la Fig. 19 se muestra el perfil electroforético de dichas fracciones.

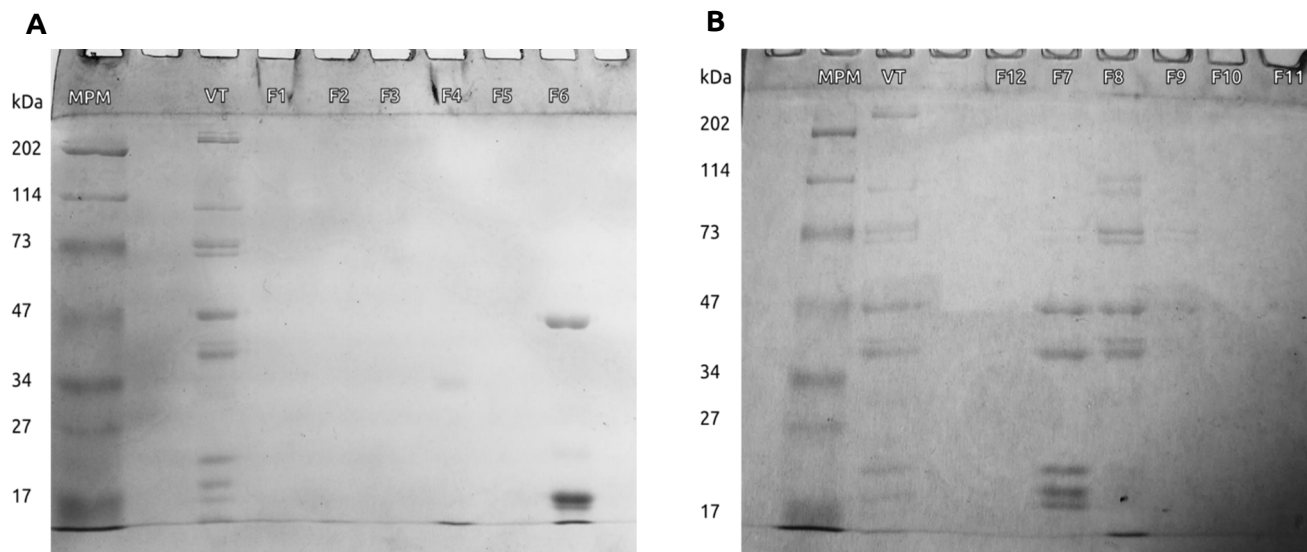


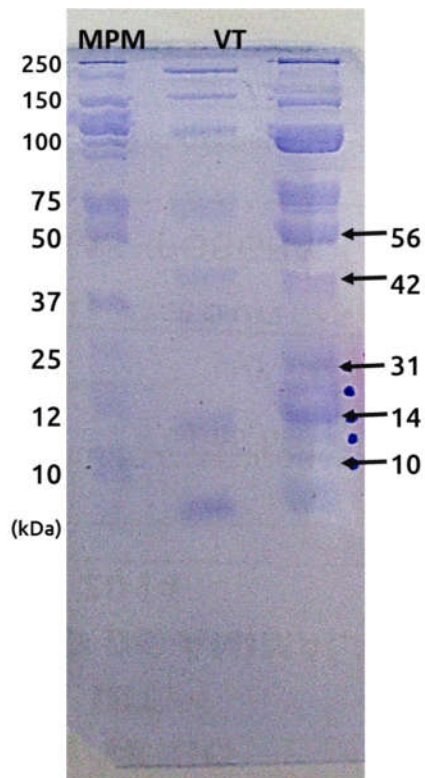
Figura 19. Perfil electroforético de las fracciones obtenidas por HPLC de fase reversa.

- A) Perfil de las fracciones F1 a F6. Carril 1: Marcadores de peso molecular. Carril 3: VT. Carriles 4 a 9: fracciones F1 a F6. Se indican a la izquierda los pesos moleculares, en kDa, de los marcadores empleados. Gel teñido con azul de Coomassie.
- B) Perfil de las fracciones F6 a F12. Carril 2: Marcadores de peso molecular. Carril 3: VT. Carriles 4 a 9: fracciones F7 a F12. Se indican a la izquierda los pesos moleculares, en kDa, de los marcadores empleados. Gel teñido con azul de Coomassie.

ii. Obtención de componentes proteínicos por electroforesis-electroelución

Se obtuvo VT por estimulación mecánica de las forcípulas para luego ser cuantificado por el método Lowry. Posteriormente se separaron 2.8 mg de VT en HPLC de fase reversa con el objetivo de obtener a F6 y medir actividad CK de las bandas contenidas en dicha fracción; sin embargo, se produjo una degradación de la fracción, lo cual impidió continuar con las pruebas.

Debido a lo anterior se procedió a separar el VT en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 16% de acrilamida, para obtener las bandas correspondientes a los pesos de 9, 10, 14, 31, 42 y 56 kDa, correspondientes a los pesos de las bandas observadas en la fracción F6 obtenida por HPLC de fase reversa (**Fig. 20**).



Se realizó el corte de las bandas mencionadas y se llevaron a electroelución con el objetivo de separar la proteína del gel de acrilamida. Las bandas se colocaron dentro de membranas permeables y se dializaron durante 2 hr a 4°C y en agitación constante.

Figura 20. Bandas sometidas a electroelución. Se señalan con flechas (→) las bandas cortadas. Carril 1: marcadores de peso molecular (MPM). Carril 3: VT. Gel al 16% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie.

iii. Actividad miotóxica *in vitro* de componentes individuales

Se tomaron muestras de sobrenadante del experimento de miotoxicidad *in vitro*, antes de agregar el veneno de *S. polymorpha* (SP), veneno de *Crotalus durissus* (CS), solución salina (SS) como controles, y las bandas de 10, 14, 31, 42 y 56 kDa, a un tiempo= 0 min, y a los minutos 15 y 45, mientras el tejido seguía en incubación y burbujeo constante.

Como se muestra en la **figura 21**, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los tiempos evaluados. Sin embargo, al comparar las mediciones del tiempo 45 min con el tiempo 0 min, se observó una tendencia a aumentar la actividad de CK, mientras que la actividad medida al tiempo 15 min se mantuvo baja, a los niveles del tiempo 0 min, es decir previo a la administración del VT y de las bandas probadas.

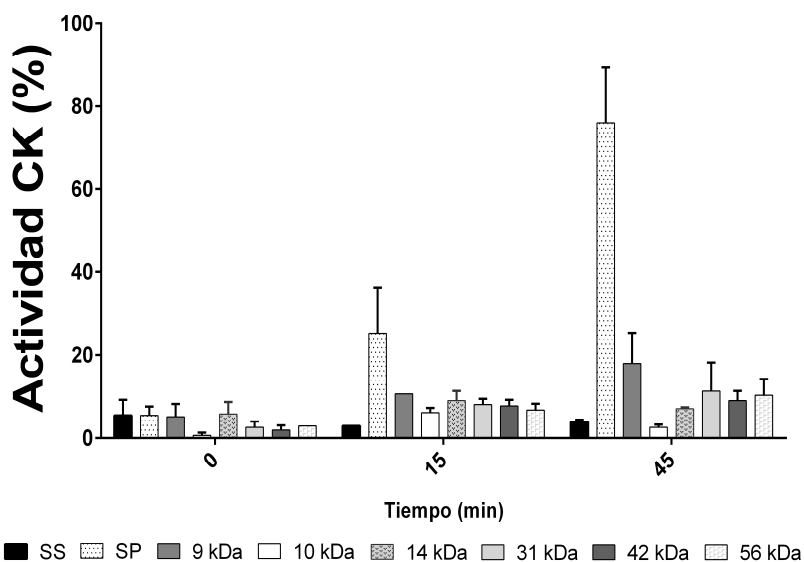


Figura 21. Actividad CK *in vitro* de bandas "individuales. Se realizaron mediciones al tiempo 0 min, antes de exponer el músculo a los controles y las fracciones de veneno. SS= solución salina; SP= veneno total de *S. polymorpha*; bandas de 9,10, 14, 31, 42 y 56 kDa. Se muestra la media \pm SEM. Los asteriscos representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos homogéneos según el análisis estadístico.

Puesto que no identificamos diferencias significativas entre los tratamientos con las bandas individuales, se realizó una nueva separación de VT en gel de poliacrilamida al 16% para cortar las bandas de 10 y 42 kDa para probarlas en conjunto y determinar si la actividad miotóxica requiere de la presencia de la hialuronidasa de 42 kDa; se eligió la banda de 10 kDa ya que fue la que produjo mayor actividad CK a los 45 min de incubación, después del VT. Sin embargo, no se logró obtener cantidades suficientes para realizar estas pruebas.

DISCUSIÓN

Como se mencionó en el apartado de antecedentes, se ha reportado que el veneno de los ciempiés del género *Scolopendra* contiene una mezcla de toxinas con actividad fosfolipasa A₂, hialuronidasas, miotoxinas, entre otras, por lo que estos resultados concuerdan con reportes de formación de vacuolas y degradación de músculo esquelético en ratones tras la administración i.m. de veneno de *Apis mellifera*, que se sabe está compuesto por una mezcla de componentes como la melitina, fosfolipasas A₂, apamina y hialuronidasas (El-kik, *et al.*, 2013). De modo similar, al exponer músculo de pollo a una miotoxina (acaniotoxina-1) con actividad fosfolipasa A₂ de la serpiente *Acanthophis rugosus* se documenta su vacuolización (Wickramaratna, *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que el veneno de varios animales puede producir daño al tejido muscular. En el caso de las serpientes, por ejemplo, este daño se puede presentar por el efecto de 2 tipos de componentes: metaloproteasas y fosfolipasas tipo A₂, PLA₂ (Fuly *et al.*, 2000; De Oliveira *et al.*, 2003; Sieb y Gillessen, 2003).

De igual modo, se ha reportado la presencia de ambos tipos de enzimas en el veneno de escolopendras (Mohamed *et al.*, 1983; Malta *et al.*, 2008; González *et al.*, 2009). Específicamente en el caso de *S. polymorpha* se logró caracterizar una PLA₂, llamada Scol/pla (González *et al.*, 2009), empleando condiciones de separación que utilizamos como modelo; debido a diferencias en cuanto al tiempo de retención y resolución entre el perfil reportado por González *et al.* (2009) y los perfiles obtenidos en este trabajo, surge la necesidad de realizar pruebas de actividad fosfolipasa con las fracciones F4 y F6 obtenidas por RP-HPLC, que nos pueden aportar información valiosa en la caracterización de los componentes responsables de alteraciones musculares.

La CK es una proteína que se encuentra en músculo cardíaco y esquelético. Sus niveles séricos se usan como un indicador de daño muscular en ratones; se miden en suero asumiendo que niveles sanguíneos altos de CK representan un daño al músculo, o fragilidad de la membrana sarcolémica (Nagaraju y Gordish, 2008).

Fuly y colaboradores (2000) realizaron estudios de miotoxicidad, empleando técnicas histológicas y pruebas de actividad CK, para evaluar una PLA₂ aislada del veneno de la serpiente *Lachesis muta*, encontrando que la liberación de CK por efecto de la toxina

mostraba una dependencia de la dosis empleada, y que sus efectos eran más pronunciados 2 hr después de ser aplicada; en trabajos previos (Tabullo, 2012) hemos observado que el VT de *S. polymorpha* ejerce los efectos más notorios tras 45 min de ser aplicado, no obstante antes de realizar las pruebas de liberación de CK con VT y fracciones, realizamos un experimento de actividad CK utilizando solo VT y SSP a 0, 45 y 120 min después de añadirlos al músculo EDL, encontrando que la liberación máxima se produce a los 45 min y tras 120 min la actividad se ve reducida prácticamente al nivel inicial, por lo que decidimos realizar las mediciones a tiempos 0, 15 y 45 min.

En otro estudio, realizado por De Oliveira y otros (2003), se probó también la actividad de una PLA2 básica del veneno de la serpiente *Bothrops jararacussu*; sus resultados muestran alteraciones en el músculo EDL que incluyen también signos de edema, fibras musculares de aspecto redondeado (fibras abalonadas, como las que encontramos tras incubar con VT y F6). Del mismo modo, en el estudio de Fuly y colaboradores (2008) se detectó la presencia de este tipo de fibras redondeadas; en ambos casos se atribuye a las PLA2 ese tipo de alteración muscular. Considerando estas evidencias, se fortalece la necesidad de realizar la prueba de actividad fosfolipasa a las fracciones F4 y F6.

Debido a la poca abundancia de las fracciones F4, F6 y a algunas dificultades en el proceso de corte del músculo, los resultados de la histoquímica son principalmente cualitativos, pero en cierto modo se complementan con los resultados de las determinaciones de actividad CK. Es decir, al observar los cortes teñidos, parece ser que los más alterados son los incubados con la fracción F6 y F4, mientras que los incubados con SSP y F8 se muestran más conservados. En el caso de las incubaciones con F4, también muestra alteraciones interesantes, como la presencia de fibras necrosadas. Y en la gráfica de la actividad CK, podemos apreciar que efectivamente, la incubación con SSP y F8 tiene efectos muy parecidos en cuanto a producir una baja liberación de CK, cuya liberación es un indicador de daño muscular (Nagaraju y Gordish, 2008).

Asimismo, los valores más altos de la actividad enzimática se encontraron al incubar precisamente con F6, mientras que VT produce niveles un poco más bajos, pero más altos que los suscitados por SSP. Y las fracciones F6 y F7 –no evaluada histológicamente–, produjeron niveles similares a los de VT.

CONCLUSIONES

- Se verificó que los especímenes de ciempiés colectados y cuyo veneno se usó en la presente investigación pertenecen a la especie *S. polymorpha*.
- El empleo de HPLC-FR permitió una mejor separación de los componentes de veneno de *S. polymorpha* para efectuar el estudio de sus propiedades miotóxicas, en contraste con la cromatografía de intercambio aniónico.
- Se identificaron tres fracciones obtenidas por HPL-FR con actividad miotóxica *in vitro*: fracciones F4, F6 y F7.
- Tanto el veneno completo como las fracciones F4, F6 y F7 causan efectos miotóxicos identificables tras un corto periodo de exposición (45 min).
- El daño producido por el veneno y las fracciones F4, F6 y F7 incluyen pérdida de la organización fascicular del núcleo, signos de inflamación y necrosis, así como también señales de daño a la cadena respiratoria mitocondrial.

REFERENCIAS

- Abarca, C. C., Balbás, P. y Gutiérrez-Villafuerte, M.C. (2001). "¿Saber el uso en la medicina tradicional de la escolopendra?" en: Hojas de la comunidad 2000. Unidad Central de Estudios para el Desarrollo Social. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Pp. 367-371).
- Ahlgren, S.C. y Levine, J.D. (1993). Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience* 52: 1049-55.
- Arias-Pérez, J.L. (2005). Cuaderno de prácticas en neurociencias. Universidad de Oviedo, Departamento de Psicología. Pág. 34.
- Authier, N., Coudore, F., Eschalier, A. y Fialip, J. (1999). Pain related behaviour during vincristine-induced neuropathy in rats. *NeuroReport* 6: 965-8.
- Authier, N., Gillet, J.P., Fialip, J., Eschalier, A. y Coudore, F. (2003). An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Exp Neurol* 182: 12-20.
- Baños, J. E. y Ruiz-Barría, G. (2006). La evaluación del dolor experimental en el laboratorio: los modelos de dolor neuropático en animales. *Rev. Soc. Esp. Dolor* 8: 542-552.
- Bennett, G. y Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107.
- Bhagirat, T., Chingtham, B. y Mohen, Y. (2006). Venom of a hill centipede *Scolopendra viridicornis* inhibits growth of human breast tumor in mice. *Indian Journal of Pharmacology* 38 (4): 291-292.
- Brancaccio, P., Lippi, G., & Maffulli, N. (2010). Biochemical markers of muscular damage. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 48(6), 757-767.
- Caro, B. A.D. (2005). Purificación y bioquímica de los componentes tóxicos contenidos en el veneno de la *Scolopendra* spp. Tesis de Maestría. CEIB-UAEM. México.
- Chilobase, (2006). Chilobase: A web resource for Chilopoda taxonomy. Disponible en: <http://chilobase.bio.unipd.it/>.

- Clement, C.H. (2003). Purificación y caracterización de hialuronidasa del veneno de *Brachypelma vagans*, una tarántula mexicana y comparación con otras posibles actividades enzimáticas del veneno de algunas *Scolopendra* sp. Tesis de Maestría. CEIB-UAEM. México.
- Cooper, A.M., Fox, G.A., Nelsen, D.R. y Hayes, W.K. (2014). Variation in venom yield and protein concentration of the centipedes *Scolopendra polymorpha* and *Scolopendra subspinipes*. *Toxicon* 82:30–51.
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Gutiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Sandoval, J.A., y Córdoba-Domínguez, J.A. (2010). Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología* 33(4): 207-213.
- Cruz, A. (2010, Mayo 23). El IMSS gasta por paciente hasta 44 mil pesos en fármacos para dolor neuropático. La Crónica de hoy. Disponible en: http://www.cronica.com.mx/nota.php?id_nota=507951
- Cupul-Magaña, F. G. (2007). *Scolopendra viridis* Say, 1821 (Cienpatas, ciempiés, cientopiés, escolopendra) Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopendridae. *Dugesiana* 14(2): 53-57.
- Cupul-Magaña, F. G. (2011). Guía para la determinación de las familias de ciempiés (Myriapoda: Chilopoda) de México. *Interciencia* 36(11):853-859.
- Cupul-Magaña, F.G. (2009). Nuevas localidades para quilópodos (Chilopoda) en la costa de Jalisco y Sinaloa, México. *Dugesiana* 16(2): 81-85.
- Cupul-Magaña, F.G. (2013). An annotated list of the centipedes (Chilopoda) in the National Collection of Arachnids, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Addendum: Scutigleromorpha and Scolopendromorpha. *Insecta Mundi*. 0282: 1-10.
- Cupul-Magaña, F.G. (2013). Comunicación personal.
- De Oliveira, M., Cavalcante, L.G., Arruda, E. Z., Melo, P.A., Silva, M. D.P., y Gallaci, M. (2003). Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. *Toxicon* 42:373-379.
- DeLeo, J. A., Coombs, D.W., Willenbring, S., Colburn, R.W., Fromm, C., Wagner, R. y Twitchell, B.B. (1994). Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain* 56: 9-16.
- Dugon, M.M, Black, A. y Arthur, W. (2012). Variation and specialisation of the forcipular apparatus of centipedes (Arthropoda: Chilopoda): A comparative morphometric and microscopic investigation of an evolutionary novelty. *Arthropod Structure & Development* 41 (3):231-243.

- Edgecombe, D.E. y Giribet, G. (2007). Evolutionary Biology of Centipedes (Myriapoda: Chilopoda). *Annu Rev Entomol* 52:151–70.
- Eliav, E., Herzberg, U., Ruda, M.A. y Bennett, G.J. (1999). Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain* 83:169-82.
- El-kik, C. Z., Fernandes, F.F.A., Tomaz, M. A., Gaban, G.A., Fonseca, T.F., Calil-Elias, S., Oliveira, S.D.S, Melo, P.A., Silva, C.L.M., y Martinez, A.M.B. (2013). Neutralization of *Apis mellifera* bee venom activities by suramin. *Toxicon* 67 (2013): 55–62.
- Fillingim, R.B., King, C.D., Ribeiro-Dasilva, M.C., Rahim-Williams, B. y Riley, J.L. (2009). Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain* 10 (5):447-485.
- Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimaraes, J.A., y Melo, P.A. (2000). Myotoxic activity of an acidic phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta*(Bushmaster) snake venom. *Toxicon* 38:961-972.
- Gomes, A., Datta, A., Sarangi, B., Kar, P.K., y Lahiri, S.C. (1982). Occurrence of histamine and histamine release by centipede venom. *Indian J. Med. Res.* 76:888– 891.
- Gomes, A., Datta, A., Sarangi, B., Kar, P.K., y Lahiri, S.C. (1983). Isolation, purification and pharmacodynamics of a toxin from the venom of the centipede *Scolopendra subspinipes dehaani* Brandt. *Indian J. Exp. Biol.* 21:203– 207.
- González-Morales, L. (2005). Purificación y secuenciación de los componentes tóxicos del veneno del ciempiés *Scolopendra viridis* Say. Tesis de maestría. CEIB-UAEM. México
- González-Morales, L. (2010). Caracterización bioquímica y molecular de los componentes del veneno del ciempiés *Scolopendra viridis* Say. Tesis doctoral. CEIB-UAEM. México. NOTA: en realidad se refiere a *S. polymorpha*.
- González-Morales, L., Pedraza-Escalona, M., Diego-Garcia, E., Restano-Cassulini, R., Batista, C.V.F., Gutiérrez, M.C. y Possani, L.D. (2014). Proteomic characterization of the venom and transcriptomic analysis of the venomous gland from the Mexican centipede *Scolopendra viridis*. *Journal of proteomics* 111: 224-237. NOTA: en realidad se refiere a *S. polymorpha*.
- Gutiérrez, M.C., Abarca, C. y Possani, L.D. (2003). A toxic fraction from *Scolopendra* venom increases the basal release of neurotransmitters in the ventral ganglia of crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 135: 205-214.
- Hannon, H.E., y Atchison, W.D. (2013). Omega-Conotoxins as Experimental Tools and Therapeutics in Pain Management. *Mar. Drugs* 11: 680-699

- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. y Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77-88.
- Hasan, S. y Hassan, K. (2005). Proteinuria associated with centipede bite. *Pediatr Nephrol* 20: 550-551.
- Hernández, C.J.J., Moreno-Benavides, C. (2005). *Medicina del dolor*. Centro Editorial Universidad del Rosario. Colombia.
- Humbert A., y Saussure H. de (1870) *Myriapoda nova Americana*, Series 2. *Revue et Magasin de Zoologie* 22:196–205.
- Ibarra, R.E.Y. (2011). Identificación y caracterización de hialuronidasas presentes en el veneno de *Scolopendra viridis* Say, 1821. Tesis de maestría. CEIB-UAEM. México.
- IMSS (2010). Tratamiento farmacológico del dolor neuropático en mayores de 19 años. México. Disponible en: www.imss.gob.mx/profesionales/guiasclinicas/Documents/441GER.pdf
- Justo-Jacomini, D.L., Campos-Pereira, F.D., Aparecido-dos Santos, P. J.R., Delazari dos Santos, L., da Silva-Netod, A. J., Thieza-Giratto, D., Sérgio Palma, M., De Lima Zollnere, R., Brochetto-Braga, M.R. (2013). Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. *Toxicon* 64 (2013) 70–80.
- Kim, S. y Chung, J.M. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-63.
- Kimura, L.F., Prezotto-Neto, J.P., Tavora, B., Antoniazzi, M.M., Knysak, I., Guizze, S.P.G., Santoro, M.L., Barbaro, K.C. (2013). Local inflammatory reaction induced by *Scolopendra viridicornis* centipede venom in mice. *Toxicon* 76:239–246.
- Kupers, R., Yu, W., Persson, J.K., Xu, X.J. y Wiesenfeld-Hallin, Z. (1988). Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain. *Pain* 76:45-9.
- Lawrence, L. y Cahill, C.M. (2010). TNF- α and neuropathic pain –a review. *J Neuroinflammation* 7 (27).
- Lewis, J.G.E. (1981). *The biology of centipedes*. Cambridge University Press. EEUU.
- Lohman, D., Schleifer, R. y Amon, J.J. (2010). Acces to pain treatment as a human right. *BMC Medicine* 8:8. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/8/8>.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Malta, M.B., Lira, M.S., Soares, S.L., Rocha, G.C., Knysak, I., Martins, R., Guizze, S.P., Santoro, M.L., y Barbaro, K.C. (2008). Toxic activities of Brazilian centipede venoms. *Toxicon* 52 (2): 255-263.
- Mattiello-Sverzuta, A.C., y da Cruz-Höfling, M.A. (2000). Toxin 2 (PhTx2), a neurotoxic fraction from *Phoneutria nigriventer* spider venom, causes acute morphological changes in mouse skeletal muscle. *Toxicon* 38: 793-812.
- Mena Bustos, D.M. (2016). Caracterización de hialuronidasas del veneno de *Scolopendra polymorpha*. Tesis de maestría. CEIB-UAEM. México.
- Mohamed, A .H., Abu-Sinna, G., El-Shabaka, H.A. y Abd El-Aal, A. (1983). Proteins, lipids, lipoproteins and some enzyme characterizations of the Venom extract from the centipede *Scolopendra morsitans*. *Toxicon* 21: 371–377.
- Mohamed, A .H., Zaid, E., El-Beih, N.M., y Abd El-Aal, A. (1980). Effects of an extract from the centipede *Scolopendra morsitans* on intestine, uterus and heart contractions and on blood glucose and liver and muscle glycogen levels. *Toxicon* 18: 581–589.
- Monzón-Muñoz, F.J. y BLASCO, G.R.M. (1997). Patología causada por Artrópodos de interés toxológico y alergológico. *Bol. S.E.A.* 20:193-215.
- Moreno-Benavides, C. y Prada, M.D. (2004). Fisiopatología del dolor clínico. Asociación Colombiana de Neurología. Colombia.
- Moreno-León, D. Metodologías y técnicas para el estudio de enfermedades musculares. Hospital Universitari de Bellvitge. Disponible en: www.bellvitgehospital.cat/info_corporativa/MetodosPatologiaMuscular.pdf; consultado en mayo 2016.
- Mosconi, T. y Kruger, L. (1996). Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: Ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64: 37-57.
- Muñoz, A. B. (2006). Purificación y caracterización de la proteína responsable de la actividad hialuronidasa presente en el veneno del ciempiés (*Scolopendra viridis* Say, 1821). Tesis de maestría. CEIB-UAEM. México.
- Nagaraju, K., y Gordish, H. (2008). Serum creatine kinase analysis in mouse models of muscular dystrophy. Treat-NMD Neuromuscular Network. Wellstone Muscular Dystrophy Center,

Washington, DC. Disponible en: http://www.treat-nmd.eu/downloads/file/sops/md/MD_M.2.2.001.pdf

OpenStax. (2013, 6 marzo). 4.4 Muscle Tissue and Motion – Anatomy and Physiology [Open Textbook]. Recuperado 26 febrero, 2020, de <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/4-4-muscle-tissue-and-motion/>

Peng, K.F., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X.F., Jia, P., Liu, J.Z. y Yu, H.N. (2010). Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. *Toxicon* 55(2): 274-279.

Pocock, R. I. 1895-1910. Chilopoda and Diplopoda. *Biologia Central Americana* 14: 1–217, 15 pl.

Polomano, R.C., Mannes, A.J., Clark, U.S. y Bennett, G.J. (2001). A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* 94:293-304.

Porat, C. O. (1876). Om några exotiska myriopoder. *Bihang Till K. Sv. Vet.-Akad. Hand.* 4(7):1-48.

Rates, B., Bemquerer, M.P., Richardson, M., Borges, M.H., Morales, R.A .V., De Lima, M.E. y Pimenta, A. (2007). Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): shedding light on Venoms from a neglected group. *Toxicon* 49: 810– 826.

Reyes Chiquete, D.; González Ortiz, J.C.; Mohar Betancourt, A.; Meneses García, A. (2011). Epidemiología del dolor por cáncer. *Rev Soc Esp Dolor* 18 (2):118 – 134.

Ridaura-Sanz, C, (2008). La biopsia en el diagnóstico de la enfermedad pediátrica. *Acta Pediatr Mex* 29(6):347-54.

Ridaura-Sanz, C. (2008). Biopsia Muscular. *Acta Pediatr Mex* 29(6):347-54.

Rodríguez Alejandro, C. I. (2014). Purificación y caracterización de péptidos antimicrobianos provenientes del veneno de *Scolopendra polymorpha*. Tesis de maestría. CEIB-UAEM. México.

Rosero-Salazar, D.H., Salazar-Monsalve, L., Tovar-Sánchez, M.A. (2014). Histoquímica enzimática en el diagnóstico de miopatías: revisión sistemática. *Medicina & Laboratorio* 20: 467-488.

Ruiz, G., Ceballos, D. y Baños, J.E. (2004). Behavioral and histological effects of endoneurial administration of nerve growth factor: possible implications in neuropathic pain. *Brain Res* 1011: 1-6.

Sargaiyan, V. y Bansal, A. (2014). Enzyme Histochemistry: a review. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research* 2: 191-195.

- Seltzer, Z., Dubner, R. y Shir, Y. (1990). A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-18.
- Shelley, R. M. (2002). A synopsis of the North American centipedes of the order Scolopendromorpha (Chilopoda). *Virginia Museum of Natural History Memoir* (5)1–108.
- Sieb, J.P., y Gillessen, T. (2003). Iatrogenic and toxic myopathies. *Muscle Nerve* 27: 142–156.
- Slutsky, D. (2009). "Chapter 19: Techniques for nerve compression" en Chung, K.C., *Hand and Upper Extremity Reconstruction –Procedures in reconstructive surgery series*. Elsevier. China (pág. 255-276). Disponible en: http://drdavidslutsky.com/publications/nerve_compression.pdf
- Stankiewicz, M., Hamon, A., Benkhalifa, W.K., Hue, B., Lucas, S., Mebs, D. y Pelhate, M. (1999). Effects of a centipede venom fraction on insect nervous system, a native *Xenopus* oocyte receptor and on an expressed *Drosophila* muscarinic receptor. *Toxicon* 37: 1431-1445.
- STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.
- Tabullo, D.R.J. (2012). Efectos de la administración de veneno de *Scolopendra viridis* Say, 1821 en la respuesta murina a estímulos térmicos y mediadores inflamatorios del dolor. Tesis de maestría. CEIB-UAEM. México. NOTA: en realidad se refiere a *S. polymorpha*.
- Tay-Zavala, J., Castillo-Alarcón, L., Sánchez-Vega, J.T. y Romero-Cabello, R. (1998). Insectos venenosos de importancia médica. *Rev Fac Med UNAM* 41(6):241-246.
- The UniProt Consortium (2015). *Nucleic Acids Res.* vol. 43 (D1) p. D204-212.
- Pérez Unanua, M., Roiz Fernández, J. C., y Diazaraque Marín, R. (2001). Rabdomiólisis inducida por el ejercicio. *Medifam*, 11(9), 92-95.
- Undheim, E.A.B., Fry, B.G. y King, G.F. (2015). Centipede Venom: Recent Discoveries and Current State of Knowledge. *Toxins* 7:679-704.
- Undheim, E.A.B., y King, G.F. (2011). On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon* 57:512-524.
- Vargas, C. E. S. (2016). Jefe de Clínica de Nervio y Músculo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Comunicación personal.
- Wagner, R.R., Myers, R. (1996). Endoneurial injection of TNFalpha produces neuropathic pain behaviors. *NeuroReport* 7:2897-901.

- Wall, P.D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J.W., Schonfeld, D., Seltzer, Z. y Tomkiewicz, M.M. (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-13.
- Wang, I.K., Hsu, S.P., Chi, C.C., Lee, K.F., Lin, P.Y., Chang, H.W. y Chuang, F.R. (2004). Rhabdomyolysis, Acute Renal Failure, and Multiple Focal Neuropathies After Drinking Alcohol Soaked with Centipede. *Renal Failure* 26(1): 93-97.
- Waugh, A., & Grant, A. (2013). "The musculoskeletal system CHAPTER 16" en: Ross and Wilson: *Anatomy and Physiology in Health and Illness* (12th edition). Churchill Livingstone.
- Welsh, J.H., y Batty, C.S. (1963). 5-Hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. *Toxicon* 1: 165 – 170.
- White, J. (2004). "V. Natural Toxins. 244: Overview of venomous snakes of the world" en *Medical Toxicology*. 3ra edición. Lippincott Williams & Wilkins. Pp. 1543-1559.
- Wickramaratna, J.C., Fry, B.G., Aguilar, M. I., Kini, R.M., y Hodgson, W.C. (2003). Isolation and pharmacological characterization of a phospholipase A2 myotoxin from the venom of the Irian Jayan death adder (*Acanthophis rugosus*). *British Journal of Pharmacology* 138: 333-342.
- Wood, Jr. H.C. (1865). The Myriapoda of North America. *Transactions of the American Philosophical Society, New Series* 13(2):137-248.
- Yildiz, A., Biçeroglu, S., Yakut, N., Bilir, C., Akdemir, R. y Akilli, A. (2006). Acute myocardial infarction in a young man caused by centipede sting. *Emerg Med J* 23:e30.
- You, W.K., Sohn, Y.D., Kim, K.Y., Park, D.H., Jang, Y., y Chung, K.H. (2004). Purification and molecular cloning of a novel serin protease from the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 239-250.

APÉNDICES

A1. Publicación en Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)

ISSN 0065-1737

Acta Zoológica Mexicana (n.s.), 30(3): 731-733 (2014)

Nota Científica
(*Short Communication*)

NUEVOS REGISTROS DE CIEMPIÉS (MYRIAPODA; CHILOPODA) PARA MORELOS, MÉXICO

Tabullo-De Robles, J., Gutiérrez, M. del C. & Cupul-Magaña, F. G. 2014. New records of centipedes (Myriapoda; Chilopoda) from Morelos, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 30(3): 731-733.

ABSTRACT. Twenty one species of centipedes have been reported in the Mexican state of Morelos. The presence of the lithobiomorphs *Atethobius mirabilis* and *A. scutigera*, and the scolopendromorphs *Newportia stollii*, *Rhysida longipes* and *Scolopocryptops mexicana* are reported here for the first time; whereas three new localities in the state are reported for *Scolopendra polymorpha*.

Los ciempiés (Myriapoda: Chilopoda) son un grupo importante de artrópodos depredadores que se encuentran en la mayoría de los hábitats terrestres; utilizan su veneno para matar o inmovilizar a sus presas, predominantemente insectos. Comprenden aproximadamente 3,300 especies, distribuidas en cinco órdenes. La mayor diversidad se encuentra en los trópicos y zonas semitempladas. Son parte significativa de la fauna del suelo y pasan la mayoría de su tiempo debajo de éste, así como de piedras, hojarasca, cortezas y leños (Edgecombe & Giribert 2007; Cupul-Magaña 2013).

En México están presentes 180 especies de ciempiés; para Morelos se han registrado 21 especies representando cuatro órdenes y diez familias (Cupul-Magaña 2013). El material examinado en este trabajo proviene de recolectas (por búsquedas visuales) realizadas por personal del Laboratorio de Neurofarmacología del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CEIB-UAEM) durante el año de 2013, con la finalidad de obtener material biológico para desarrollar estudios farmacológicos del veneno de los ciempiés. Los ejemplares se depositaron en el Laboratorio de Neurofarmacología del CEIB-UAEM y fueron conservados en alcohol al 70%. Para su determinación se utilizaron los trabajos de Chamberlin (1915, 1943), Verhoeff (1934), Shelley (2002), Schileyko y Minelli (1998) y Chagas-Júnior (2003). La información sobre su distribución nacional y dentro del estado fue de acuerdo con Cupul-Magaña (2013).

Recibido: 26/09/2013; aceptado: 26/05/2014.

Se identificaron dos especies de litobiomorfos (Lithobiomorpha: Lithobiidae) y cuatro especies de escolopendromorfos (Scolopendromorpha: Scolopocryptopidae y Scolopendridae). El material examinado se presenta a continuación:

Lithobiomorpha Pocock, 1891

Lithobiidae Newport, 1844

Atethobius mirabilis Chamberlin, 1915. Material examinado: Cuernavaca, campus Chamilpa de la UAEM, 28/VIII/2013, elevación (elev.) 1905 m, 18.985167° N-99.231433° W, bosque de pino-encino, colector (col.) J. Tabullo, 1 ejemplar (ej.), macho, talla de 16.30 mm (sin cabeza). Registros previos en México (Endémica): Distrito Federal. Registros previos en Morelos: Ninguno, primer registro para el estado. Nota: El terguito XIV cubre la totalidad del terguito XV (Chamberlin, 1915).

Atethobius scutiger Verhoeff, 1934. Material examinado: Cuernavaca, campus Chamilpa de la UAEM, 28/VIII/2013, elev. 1905 m, 18.985167° N-99.231433° W, bosque de pino-encino, col. J. Tabullo, 2 ejemplares (ejs.), machos, tallas de 21.11 mm y 21.27 mm. Registros previos en México (Endémica): Estado de México. Registros previos en Morelos: Ninguno, primer registro para el estado. Nota: El terguito XIV cubre parcialmente al terguito XV (Verhoeff, 1934).

Scolopendromorpha Pocock, 1895

Scolopocryptopidae Pocock, 1896

Newportia stollii Pocock, 1896. Material examinado: Cuernavaca, campus Chamilpa de la UAEM, 26/VIII/2013, elev. 1900 m, 18.985167° N-99.231433° W, bosque de pino-encino, 2 ejs., (sexo no determinado = snd), tallas de 25.95 mm y 25.33 mm, colectores (cols.) J. Tabullo, E. Y. Ibarra Rojas, C. I. Rodríguez, J. M. Castro y L. Valladares. Registros previos en México: Campeche, Chiapas y Veracruz. Registros previos en Morelos: Ninguno, primer registro para el estado.

Scolopocryptops mexicana Humbert & Saussure, 1869. Material examinado: Cuernavaca, campus Chamilpa de la UAEM, 26/VIII/2013, elev. 1900 m, 18.985167° N-99.231433° W, bosque de pino-encino, cols. J. Tabullo, E. Y. Ibarra Rojas, C. I. Rodríguez, L. Valladares y J. M. Castro, 1 ej., snd, talla de 36.77 mm. Registros previos en México: Chiapas, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz. Registros previos en Morelos: Ninguno, primer registro para el estado.

Scolopendridae Leach, 1815

Rhysida longipes Newport, 1845. Material examinado: Cuernavaca, campus Chamilpa de la UAEM, 11/III/2013, elev. 1934 m, 18.985033° N -99.23735° W, área de composta entre raíces de palma, cols. J. Tabullo, E. Y. Ibarra Rojas, C. I. Rodríguez y L. Valladares. 2 ejs., snd, tallas de 44.54 mm y 64.7 mm. Registros previos en México: Campeche, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Sinaloa. Registros previos en Morelos: Ninguno, primer registro para el estado.

Scolopendra polymorpha Wood, 1861. Material examinado: Barrio de Ixtlahuacan, Yautepec (primer registro para la localidad = pr1), 21/XI/2013, elev. 1226 m, 18.896619° N -99.054897° W, en ambiente peridomiciliar debajo de ladrillos, col. V. Martínez, 2 ej., snd, tallas de 106.19 mm y 124.64 mm. Colonia 3 de mayo, Emiliano Zapata (pr1), 12/XI/2013, elev. 1650 m, en ambiente domiciliar, col. L. Valladares, 1 ej., snd, talla de 96.78 mm. Cuernavaca (pr1), 9/XI/2013, elev. 1549 m, 18.9304° N -99.2295° W, en ambiente domiciliar, col. C. I. Rodríguez. 1 ej., snd, talla de 98 mm. Registros previos en México: Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas. Registros previos en Morelos: Tepoztlán.

AGRADECIMIENTOS. Al Programa de Doctorado en Ciencias Naturales y a la Dirección de Cooperación y Desarrollo Internacional de la UAEM que facilitaron la estancia de JTDR en el Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara (CUC-UDG). A los revisores anónimos por sus comentarios.

LITERATURA CITADA

- Chagas-Júnior, A.** 2003. Revisão das espécies neotropicais de Scolopocryptopinae (Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopocryptopidae). MSc. Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Chamberlin, R. V.** 1915. New chilopods from Mexico and the West Indies. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 59: 493-541.
- Chamberlin, R. V.** 1943. On Mexican centipeds. *Bulletin of the University of Utah, Biological Series*, 7: 1-55.
- Cupul-Magaña, F. G.** 2013. La diversidad de los ciempiés (Chilopoda) de México. *Dugesiana*, 20: 17-41.
- Edgecombe, D.E. & Giribet, G.** 2007. Evolutionary Biology of Centipedes (Myriapoda: Chilopoda). *Annual Review of Entomology*, 52: 151-70.
- Schileyko, A. & Minelli, A.** 1998. On the genus *Newportia* Gervais, 1847 (Chilopoda: Scolopendromorpha: Newportiidae). *Arthropoda Selecta*, 7: 265-299.
- Shelley, R. M.** 2002. A synopsis of the North American centipedes of the order Scolopendromorpha (Chilopoda). *Virginia Museum of Natural History Memoir*, 5: 1-108.
- Verhoeff, K. W.** 1934. Beiträge zur Systematik und Geographie der Chilopoden. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik*, 66: 1-112.

JUDITH TABULLO-DE ROBLES,¹ MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ¹ Y FABIO G. CUPUL-MAGAÑA²

¹Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C. P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México. <judith.tabullo@uaem.mx>; <carmengu@uaem.mx>. ²Centro Universitario de la Costa, UdeG, Av. Universidad No. 203, Delegación Ixtapa, C.P. 48280, Puerto Vallarta, Jalisco, México. <fabio_cupul@yahoo.com.mx>.

A2. Nuevo registro de *Otostigmus pradoiii* para México

THE PAN-PACIFIC ENTOMOLOGIST
92(1):51–55, (2016)

Scientific Note

New record of the centipede *Otostigmus (Parotostigmus) goeldii* Brölemann, 1898 (Scolopendromorpha: Scolopendridae: Otostigminae) from Mexico

The centipede genus *Otostigmus* Porat, 1896 consists of three subgenera: *Otostigmus* (s. str.), *O. (Parotostigmus)* Pocock, 1896 and *O. (Dactylotergitius)* Verhoeff, 1937 (Chagas-Júnior 2012). *Otostigmus (Parotostigmus)* is recorded from West and Central Africa and Central and South America (Chagas-Júnior et al. 2007, Edgecombe & Bonato 2011) and is distinguished by a combination of characters including: prefemur of ultimate legs without spines; coxopleural process short or lacking, without apical spines; and male last pair of legs often with a cylindrical projection (appendix) from the base of the prefemur (Edgecombe & Bonato 2011). The only species of *O. (Parotostigmus)* known from Mexico is *O. (Parotostigmus) denticulatus* (Pocock, 1896) (Cupul-Magaña 2013). This species was proposed for specimens collected in Amula (the modern name is Almolonga; elevation 1220–2134 m) and Omilteme (the correct spelling is Omiltemi; elevation 2134–2743 m), Guerrero (Pocock 1896) and has also been collected in Costa Rica and Guatemala (Chamberlin 1922) (Fig. 1). Herein, we record a second species in Mexico, *O. (P.) goeldii* Brölemann, 1898, previously known from Brazil, Costa Rica, and Venezuela (Attems 1930, Chagas-Júnior 2012) (Fig. 1).

Specimens examined. Mexico: Morelos: Tepoztlán (Fig. 1): cemetery, 10/X/2014, 18° 58' 58" N–99° 05' 25" W, 1♀ (body length in mm/width of tergite 10 in mm: 37.8/2.2; last pair of legs 9.6 mm long; antennae 8 mm long), under stone, collectors: E. Y. Ibarra-Rojas, A. O. Rivera-Ramírez, C. I. Rodríguez-Alejandro, J. Tabullo De Robles and L. Valladares-Cisneros. The specimen is deposited in the Entomological Collection of the Centro de Estudios en Zoología, Universidad de Guadalajara (CZUG), Mexico.

Description. Cephalic plate (Fig. 2A) and tergites 1–21 reddish-brown; forcipular coxosternum, pleurites and sternites 1–21 light green; antennae, legs and last pair of legs bluish; cephalic plate slightly wider than long, smooth, without sutures or sulci but with two slightly short longitudinal depressions at the posterior border; tooth plate slightly wider than long; antennae reaching the middle of tergite 5, with 16 antennomeres (right with 13–16 missing), 1–2 and proximal ¼ of 3 glabrous on all sides, 3 densely setose on apical ¼, setae short, yellowish; forcipular coxosternum smooth, without sulci or depression; tooth wider than long, with four teeth on each plate (Fig. 2B), median teeth partly fused, without bristles; process of forcipular trochanteroprefemur with two low inner teeth and terminated in an acute tip; pedal segments 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 with spiracles (Fig. 2C); tergites 1–4 without paramedian sutures; tergites 4–20 with complete paramedian sutures; tergites 7–21 margined; tergite 21 without sutures (Fig. 2D); sternites smooth, anterior margin wider than posterior; sternite 21 slightly wider than long, converging posteriorly, with a low longitudinal median depression, posterior border slightly concave; coxopleuron with numerous pores; pore field nearly covering entire coxopleuron, only the posterior and dorsal margins without pores, apical border without spines; legs 1 and 3 with two

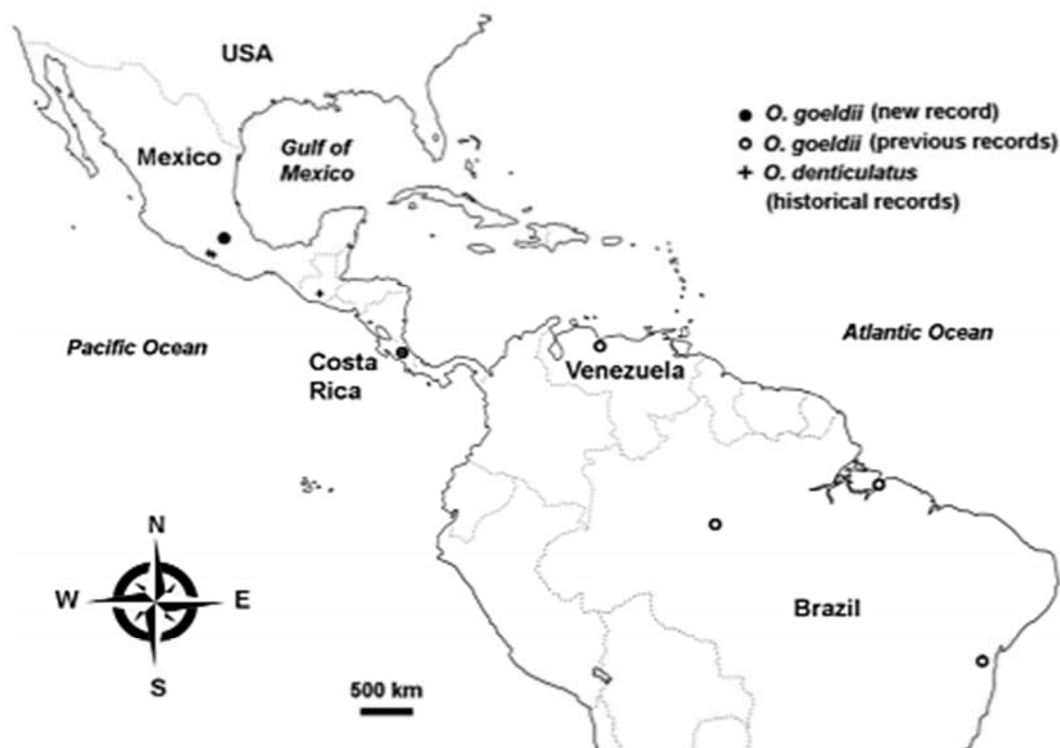


Figure 1. The known localities of *Otostigmus* (*Parotostigmus*) *goeldii* (black circle = new locality in Mexico; white circles = previous records) and *O.* (*Parotostigmus*) *denticulatus* (cross = historical records) in America.

tarsal spurs; legs 2 and 4–20 with one tarsal spur; last pair of legs without tarsal spur, long and slender (Fig. 2E).

Specimens examined. Mexico: Morelos: Cuernavaca: urban area: kitchen house, 21/VI/2015, 18° 55' 57" N–99° 11' 25" W, 1♂ (body length in mm/width of tergite 10 in mm: 50/4.5; ultimate pair of legs 13.5 mm long; antennae 13 mm long), collector: M. A. Guzmán-Robles. The specimen is deposited CZUG.

Description. Cephalic plate and tergites 1–21 reddish-brown; forcipular coxosternum, pleurites and sternites 1–21 light green; antennae, legs and last pair of legs bluish; cephalic plate slightly wider than long, smooth, without sutures or sulci but with two slightly short longitudinal depressions at the posterior border; tooth plate slightly wider than long; antennae reaching middle of tergite 5, with 17 antennomeres (left with 7–17 missing), 1–2 and proximal ¼ of 3 glabrous on all sides, apical ¼ of 3 densely setose, setae short, yellowish; forcipular coxosternum smooth, without sulci or depression; tooth wider than long, with four teeth on each plate, median teeth partly fused, without bristles; process of forcipular trochanteroprefemur with two low inner teeth and terminated in an acute tip; pedal segments 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 with spiracles; tergites 1–5 without paramedian sutures; tergites 6–20 with complete paramedian sutures; tergites 7–21 margined; tergite 21 without sutures; sternites smooth, anterior margin wider than posterior; sternite 21 slightly wider than long, converging posteriorly, with a low longitudinal median depression, posterior border slightly concave; coxopleuron with numerous pores; pore field nearly covering entire coxopleuron, only the posterior and dorsal margins without pores, apical border without spines; legs 1–3 with two tarsal

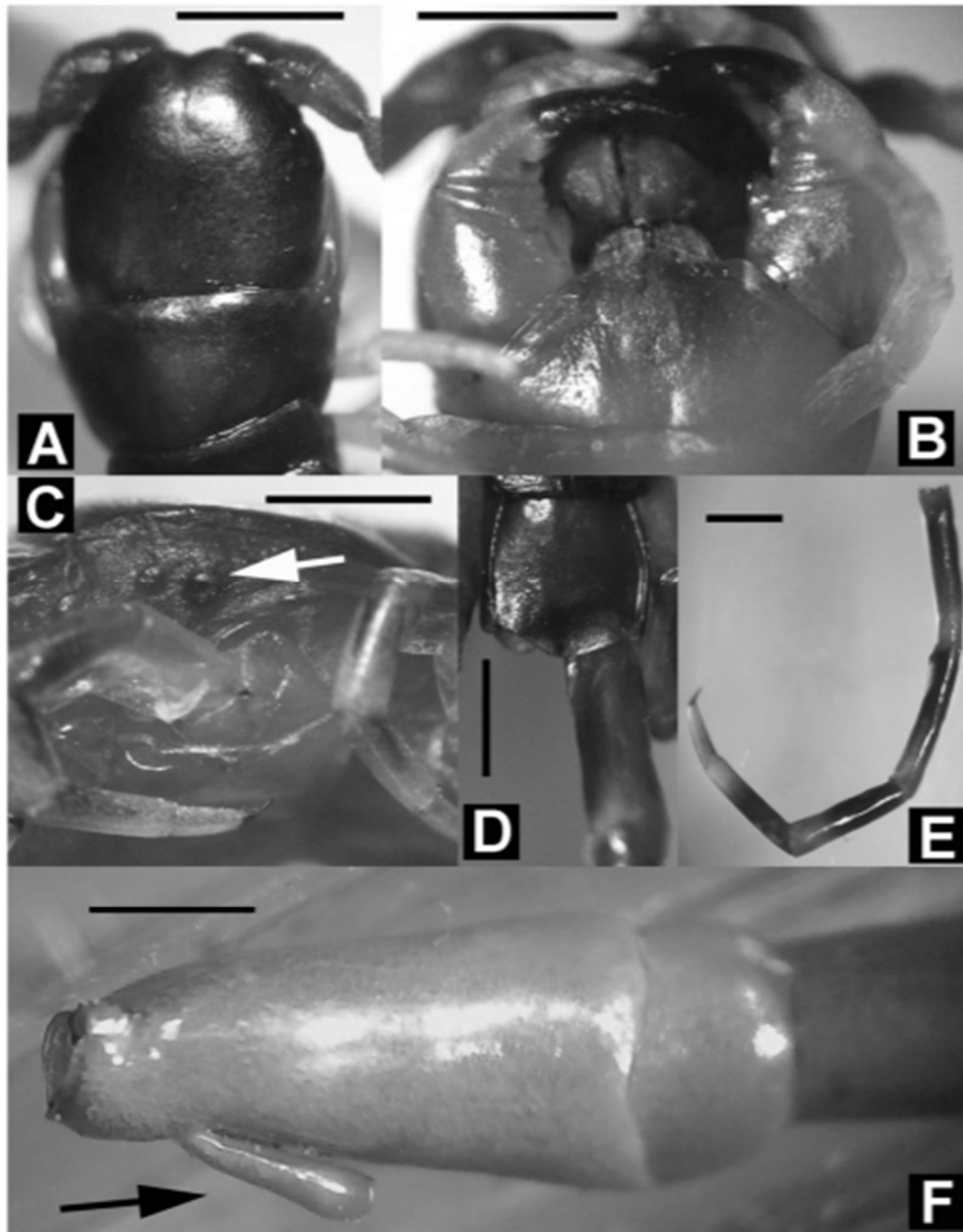


Figure 2. *Otostigmus (Parotostigmus) goeldii* female from Tepoztlán: A) Cephalic plate and tergites 1 and 2, dorsal view. B) Forcipular coxosternum and anterior part of the first leg-bearing segment, ventral view. C) Spiracle on pleurite eighth, lateral view (right side). D) Tergite 21 and prefemur of ultimate leg (right), ventral view. E) Ultimate leg (left), lateral view. *Otostigmus (Parotostigmus) goeldii* male from Cuernavaca: F) Digitiform appendix from the base of the prefemur of the ultimate leg (right leg, ventral view). Scale bar 1 mm.

spurs; legs 4–20 with one tarsal spur; last pair of legs without tarsal spur, long and slender, prefemur with short digitiform appendix, without tuft of setae at the tip, tuft of reddish setae on the dorsal side; digitiform appendix $\frac{1}{4}$ the length of prefemur (Fig. 2F).

Specimens examined. Mexico: Morelos: Tepoztlán: cemetery, 5/VI/2015, 18° 58' 57" N–99° 5' 26" W, 1♂ (body length in mm/width of tergite 10 in mm: 21/1.4; ultimate pair of legs 10.5 mm long; antennae 5 mm long), collectors: E. Y. Ibarra-Rojas, A. O. Rivera-Ramírez, C. I. Rodríguez-Alejandro, J. Tabullo De Robles and L. Valladares-Cisneros. The specimen is deposited CZUG.

Description. Body pale yellow; cephalic plate slightly wider than long, smooth, without sutures or sulci but with two slightly shorter longitudinal depressions at the posterior border; tooth plate slightly wider than long; antennae reaching the middle of tergite 5, with 17 antennomeres, 1–2 and proximal ¼ of 3 glabrous on all sides, apical ¼ of 3 densely setose, setae short, yellowish; forcipular coxosternum smooth, without sulci or depression; tooth wider than long, with four teeth on each plate, median teeth partly fused, without bristles; process of forcipular trochanteroprefemur with two low inner teeth and terminated in an acute tip; pedal segments 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 with spiracles; tergites 1–5 without paramedian sutures; tergites 6–20 with complete paramedian sutures; tergites 7–21 margined; tergite 21 without sutures; sternites smooth, anterior margin wider than posterior; sternite 21 slightly wider than long, converging posteriorly, with a low longitudinal median depression, posterior border slightly concave; coxopleuron with numerous pores; pore field nearly covering entire coxopleuron, only the posterior and dorsal margins without pores, apical border without spines; legs 1–3 with two tarsal spurs; legs 4–20 with one tarsal spur; last pair of legs without tarsal spur, long and slender, prefemur with short digitiform appendix, without tuft of setae at the tip; digitiform appendix ¼ the length of prefemur.

Acknowledgments. This work was supported, in part, by the Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, México). We thank the editor and anonymous reviewers for their constructive comments, which helped us to improve the manuscript.

Fabio Germán Cupul-Magaña, *Centro Universitario de la Costa, Universidad de Guadalajara, Av. Universidad 203, Delegación Ixtapa, C.P. 48280, Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, e-mail: fabio_cupul@yahoo.com.mx (corresponding author)*; Luis Enrique Cruz-Trujillo¹, Judith Tabullo-De Robles², Raymundo Mireles-Merchant³, Eduardo Cortes-Pérez⁴, Lucero Valladares-Cisneros⁵, Erika Yazmín Ibarra-Rojas⁶, María del Carmen Gutiérrez-Villafuerte⁷ and Francisco Hernández-Pérez⁸, *Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C. P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México, e-mails: quike_2589@hotmail.com¹, judith.tabullo@uaem.mx², cotkroz@hotmail.com³, eduardocorteseduardo-45@outlook.com⁴, lvalladares@uaem.mx⁵, erikayazmin.ibarra@uaem.mx⁶, carmengu@uaem.mx⁷ and franko20_10@hotmail.com⁸*; and Christian Kronmüller, *Lüssweg 35, 89233 Neu-Ulm, Germany, e-mail: info@myriapoden.de.*

LITERATURE CITED

- Attems, C. 1930. Myriapoda 2. Scolopendromorpha. *Das Tierreich* 54:1–308.
 Chagas-Júnior, A. 2012. The centipede genus *Otostigmus* Porat in Brazil: Description of three new species from the Atlantic Forest; a summary and an identification key to the Brazilian species of the genus (Chilopoda, Scolopendromorpha, Scolopendridae, Otostigmata). *Zootaxa* 3280:1–28.

- Chagas-Júnior, A. I. Knysak & S. P. G. Guizze. 2007. Revalidation of the subgenus *Dactylotergitius* Verhoeff, and redescription of *Otostigmus* (*D.*) *caudatus* Brölemann and *Otostigmus* (*D.*) *cavalcantii* Bücherl (Scolopendromorpha: Scolopendridae: Otostigminae). *Zootaxa* 1639:57–67.
- Chamberlin, R. V. 1922. The centipeds of Central America. *Proceeding of the United States National Museum* 60:1–17.
- Cupul-Magaña, F. G. 2013. La diversidad de los ciempiés (Chilopoda) de México. *Dugesiana* 20(1):17–41.
- Edgecombe, G. D. & L. Bonato. 2011. Order Scolopendromorpha, pp. 392–407. In: A. Minelli, (Ed.), *Treatise on Zoology—Anatomy, Taxonomy, Biology: The Myriapoda. Volume I*. Brill, Leiden, 530 pp.
- Pocock, R. I. 1896. Class Chilopoda. *Biología Centrali-Americana* 1:1–40.

Received 23 Sep 2015; Accepted 3 Nov 2015 by R. S.Zack, Jr.; Publication date 14 Apr 2016

A3. Preparación de la columna de intercambio aniónico

1. Se forma un tapón de fibra de vidrio en la base de la columna y se procede a llenarla con la resina (DEAE-Sepharose, Sigma Aldrich), hasta lograr un volumen de 10 ml, a 4°C.
2. Se enjuaga con agua destilada la columna, aproximadamente con 100 ml, para eliminar el etanol en que está disuelta la resina originalmente.
3. Se activa la columna agregando 100 µl de HCl 1N, seguidos de 100 ml de agua destilada, 100 µl de NaOH 1M y 100 ml de agua destilada para enjuagar.
Se equilibra agregando buffer de CH₃COONH₄ 20 mM, aproximadamente 50 ml, hasta que el filtrado tenga un pH de 4.7 (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

A4. Conservación en frío de músculo esquelético

1. Se enfría isopentano (C₅H₁₂) colocándolo en baño maría con nitrógeno líquido (N₂), hasta que adquiera un aspecto denso y aparezcan manchas blancuzcas.
2. Se colocan los fragmentos de músculo sobre porciones de corcho, orientados de modo vertical, empleando goma de tragacanto como adhesivo.
3. Se sumergen las muestras en el isopentano, agitando constantemente por 2 minutos.
4. El tejido congelado puede ser procesado en el criotomo o ser almacenado para uso posterior (*protocolo adaptado por F. Fernández Valverde, en el Laboratorio de Patología Experimental, INNyM*).

A5. Tinción HyE para cortes crioconservados

Reactivos: hemateína, eosina, etanol de 96° y 100°, solución etanol-xilol (1:1), xilol, H₂O.

Procedimiento:

1. Se colocan las laminillas en una canastilla de tinción y se sumergen por 14 min en hemateína.
2. Se hace un enjuague en agua corriente.
3. Se sumerge la canastilla por 5 min en eosina.
4. Se hace un enjuague en agua corriente.
5. Se sumergen por 3 minutos en:
 - a. Etanol de 96°, 2 veces
 - b. Etanol de 100°, 2 veces

- c. Etanol-Xilol (1:1)
 - d. Xilol. 2 veces.
6. Se hace el montaje con resina.

Resultados: los componentes ácidos se tiñen de azul a morado, y los componentes de carácter básico se tiñen en tonos rojizos. Las fibras musculares se tiñen de rojo-rosa, el tejido conectivo se observa en rosa claro, mientras que los núcleos celulares, el infiltrado inflamatorio y tejido nervioso aparecen azul-morado.

Aplicación: Permite evaluar forma y tamaño de las fibras, presencia de necrosis, atrofas, hipertrofias, inclusiones citoplasmáticas, infiltrados inflamatorios.

A6. Tinción tricrómico modificado de Gomori (TG)

Reactivos: hematoxilina de Harris, colorante TG, agua acidificada (CH_3COOH al 1%), agua.

Procedimiento:

1. Se colocan los cortes crioconservados en una canastilla de tinción y se sumergen por 10 min en hematoxilina.
2. Se hace un enjuague en agua corriente.
3. Se sumerge la canastilla por 35 min en colorante TG.
4. Se hacen 3 enjuagues en agua acidificada.
5. Se deshidratan los cubreobjetos en alcoholes y xilol (ver paso 5 de tinción HyE).
6. Se montan laminillas con resina.

Resultados: El tejido conectivo se tiñe de verde; los núcleos se observan morado o negro; permite evaluar la estructura del tejido nervioso.

Aplicación: Tinción ideal para identificar fibras rojas rasgadas (*protocolo adaptado por F. Fernández Valverde, en el Laboratorio de Patología Experimental, INNyM.*

A7. Tinción de NADH (enzimática)

Reactivos:

- a) Buffer de fosfatos 0.2 M, a pH= 7.4, con fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) y fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) a 0.2 M.
- b) Medio de incubación, que contiene: 4 ml de H_2O destilada, 4 mg de nitroazul de tetrazolio (NBT por sus siglas en inglés), 10 mg de difosfopiridina nucleótido reducido (DPN^+ o NADH) y 6 ml del buffer de fosfatos 0.2 M.

Nota: se deben usar guantes al manejar los reactivos y preparar las soluciones.

Procedimiento:

1. Se disuelven el NBT y NADH en el agua y después se agrega el buffer. La preparación de las soluciones y el manejo de los reactivos se deben realizar con guantes.
2. Se incuban los cortes crioconservados en el medio preparado por 30 min a temperatura ambiente.
3. Se realiza un enjuague con agua destilada.
4. Se realiza el montaje con gelatina-glicerina y se colocan las laminillas en la estufa para que se distribuya perfectamente la gelatina y no queden burbujas entre los cortes.

Resultados: Las fibras tipo I (con alta actividad) se tiñen de azul oscuro y las fibras tipo II aparecen más claras.

Aplicación: Evaluar la enzima mitocondrial, que se puede ver afectada cuando hay daño al músculo. La presencia de fibras negativas indica alteraciones en el complejo I de la cadena respiratoria (*protocolo adaptado por F. Fernández Valverde, en el Laboratorio de Patología Experimental, INNyM*).

A8. Tinción de COX (enzimática)

Reactivos:

- a) Medio de incubación. 10 ml de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 7.4), 10 mg de diaminobencidina (DAB, cromógeno) y 10 mg de citocromo C (sustrato).

Procedimiento:

1. Se prepara el medio de incubación a temperatura ambiente y se filtra antes de usarse.
2. Se colocan los cortes crioconservados en un koplín y se introducen en la estufa a 37°C por 4 hr en el medio de incubación
3. Se montan las laminillas con gelatina-glicerina.

Resultados: Las fibras tipo I se tiñen de un café oscuro (alta capacidad metabólica oxidativa), mientras que las fibras tipo II adquieren un tono más claro (mayor capacidad para metabolismo anaeróbico).

Aplicación: permite evaluar la actividad mitocondrial (marrón) y alteraciones metabólicas por ausencia del complejo IV de la respiración mitocondrial (reacción negativa) (*protocolo adaptado por F. Fernández Valverde, en el Laboratorio de Patología Experimental, INNyM*).

A9. Tinción ATPasa miosínica (enzimática)

Soluciones:

- a) Cloruro de calcio (CaCl_2) al 2% en agua.
- b) Cloruro de cobalto (CoCl_2) al 2% en agua.
- c) Solución "A": 2.42 gr de TRIS en 100 ml de agua.
- d) Solución "B": 1.7 ml de HCl concentrado en 100 ml de agua.
- e) Buffer TRIS-HCl: 50 ml de solución A, 4 gr de CaCl_2 , 5 ml de solución B y 145 ml de agua.
- f) Solución TRIS-HCl- CaCl_2 : 100 mg de ATP, 10 ml de solución TRIS-HCl, a pH 9.4

Procedimiento:

1. Se colocan los cortes crioconservados en un koplín con solución A, 10 min a temperatura ambiente y se enjuagan con agua destilada
2. Se incuban por 40 min a 37°C en solución con TRIS-HCl- CaCl_2
3. Se enjuaga en agua destilada por 3 min
4. Se incuba 3 min en CaCl_2
5. Se incuba 3 min en CoCl_2
6. Se realizan 3 lavados con agua destilada
7. Se colocan los cortes en una canastilla de tinción metálica, en agua, y se añaden de 3 a 5 gotas de sulfuro de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}]$
8. Se agita y enjuaga nuevamente con agua
9. Se montan las laminillas con gelatina-glicerina.

Resultados: Fibras tipo I aparecen claras y las fibras tipo II se observan oscuras. Fibras necróticas producen reacción negativa.

Aplicación: Facilita evaluación de tamaño, distribución y número de fibras tipo I y II, pues se mantiene aún en fibras atroficas y es independiente de la edad, estado de actividad y nutricional del individuo (*protocolo adaptado por F. Fernández Valverde, en el Laboratorio de Patología Experimental, INNyN*).

1 **A10. Artículo sometido al Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**
2 **(JVATiTD)**

3
4 **1 Mice mitochondrial activity disruption and local**
5
6
7
8 **2 muscle damage induced by *Scolopendra***
9
10
11 **3 *polymorpha* venom**

14 **4 KEYWORDS:** centipede, venom, myotoxic activity

17 **5 ABSTRACT**

20 **6 Background.** *Scolopendra polymorpha* (*S. polymorpha*) is a predatory centipede
21 whose venom contains a multiplicity of biochemical effectors that can cause muscle
22 damage and cumulative cell destruction on its prey. Although *S. polymorpha* and
23 other centipede venoms have been investigated before, there is a lack of information
24 about the morphological and biochemical patterns elicited by their myotoxic effects.
25 To get a better understanding of these processes, this paper presents evidence of
26 skeletal muscle damage, and alterations on key biochemical mediators that appear
27 only after exposition to centipede venom. **Methods.** Venom was collected and
28 fractioned using RP-HPLC; mouse *Extensor digitorum longus* (EDL) muscle was
29 exposed to whole venom and venom fractions to evaluate myotoxicity by means of
30 creatine kinase (CK) -a muscle damage marker- activity measurements and
31 histochemical analysis. **Results.** CK activity was higher in EDL muscle exposed to
32 venom and fractions F6 and F7 than in unexposed muscle. This increase was
33 observed after 15 min of venom incubation, and remaining stable up to 45 min. The
34 EDL muscle exposed to venom showed signs of muscle damage, such as necrosis,
35 inflammation, loss of fascicular structure as well as mitochondrial accumulations and
36 red ragged fibers, suggesting impairment in the normal mitochondrial arrangement.
37 Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and cytochrome oxidase (COX) tests

1
2
3
4 24 also indicate that respiratory complexes could be affected. **Conclusion.** Our results
5
6 25 suggest a differential biochemical composition in *S. polymorpha* venom, based on
7
8 26 the different effects of four venom fractions on the cells tested, according to
9
10 27 statistical evidence. Fractions F6 and F7 caused the most important alterations.

12 13 28 **BACKGROUND**

14
15
16 29 Centipedes or chilopods are venomous arthropods with a wide distribution
17
18 30 throughout the world -except for Antarctica-, belonging to more than 3300 species
19
20 31 and 5 orders, namely Scutigermorpha, Lithobiomorpha, Craterostigmomorpha,
21
22 32 Geophilomorpha and Scolopendromorpha [1,2]. They possess venomous glands
23
24 33 which are located on the head, inside a pair of forcipules; the Scolopendromorpha
25
26 34 genus includes those centipedes of medical importance since their bites to humans,
27
28 35 however rare, cause local symptoms such as burning pain, edema and inflammation.
29
30 36 There have been reports of headaches, anxiety, respiratory difficulties and even
31
32 37 acute renal failure and multifocal neuropathy induced after
33
34 38 drinking alcohol soaked with *Scolopendra subspinipes mutilans specimen, currently*
35
36 39 *used in chinese traditional medicine*) [3–7]. On the other hand, recent studies
37
38 40 confirm that centipede venoms are a rich and diverse source of novel compounds
39
40 41 and structural scaffolds, such as antimicrobial peptides with potential
41
42 42 biotechnological applications [8–10].

43
44 43 In spite of being such a diverse group, centipede venoms have not been as much
45
46 44 studied as those of spiders, scorpions or snakes. Most of the reports on centipede
47
48 45 venoms are focused on Asian species and only a few of them deal with their effects
49
50 46 at a histological level [11,12]. Hence, there is very scarce information available about
51
52 47 myotoxic potential effects of centipede venom, the local tissue damage that
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 48 produces and the underlying mechanisms or chemical nature of the toxic
4
5 49 components in their venoms [6.13.14]. In a previous study [14] on the effects in the
6
7 50 nociception of mice provoked by the venom of the common desert
8
9 51 centipede, *Scolopendra polymorpha*, autochthone to the northern and central
10
11 52 regions of Mexico [1,15], we found evidence of morphological and biochemical
12
13 53 alterations on skeletal muscle. Therefore, this study aimed to explore the *in*
14
15 54 *vitro* myotoxic potential of *S. polymorpha* venom, looking for muscular damage
16
17 55 signals, structural integrity modifications and cellular respiration impairing, for a
18
19 56 better understanding of the basic cellular mechanisms associated with muscle
20
21 57 pathology in general. In this paper we offer histological and biochemical evidence for
22
23 58 localized muscle tissue damage such as loss of both fascicular structure and fiber
24
25 59 polygonal shape, signs of necrosis, ragged fibers with certain accumulation of matter
26
27 60 in the periphery of the fibers, suggesting a possible damage to the electron transport
28
29 61 chain in response to centipede venom.
30
31
32
33
34
35

36 **MATERIAL AND METHODS**

37 **Animals and venom**

38
39 63 Female CD-1 mice (20-25 g) were provided by the Animal House of the Institute of
40
41 64 Biotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México (IBT UNAM). Animals
42
43 65 received food and water *ad libitum*. Centipedes (*S. polymorpha*) were collected in
44
45 66 the state of Morelos, Mexico. Venom was obtained by manual stimulation of the
46
47 67 venom claws, collecting it by capillarity using a micropipette tip into a tube containing
48
49 68 bidistilled water prior to be quantified by the Lowry method [11] and kept in storage
50
51 69 at -20°C until further utilization.
52
53
54
55
56
57

58 **Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)**

1
2
3
4 72 Venom was fractionated by reverse-phase high performance liquid chromatography
5
6 73 (RP-HPLC), in a C18 reverse-phase analytical column (Vydac, Hesperia, CA), using
7
8 74 a linear gradient from 0% solvent A (0.12% trifluoroacetic acid, TFA, in water) to 60%
9
10 75 solvent B (0.1% TFA in acetonitrile), at a flow rate of 1 ml/min for a 60 min run,
11
12 76 according to González-Morales and collaborators [17]. Fractions were manually
13
14 77 collected every 5 min., desalted, concentrated to dryness and stored at -20°C for
15
16
17 78 further experiments.

79 **Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

20
21
22
23 80 10 µg of each fraction were analyzed by SDS-PAGE (12% acrylamide gel) under non
24
25 81 reducing conditions [12]. Gels were stained with Coomassie blue (R-250, Bio-Rad,
26
27 82 USA). Prestained molecular weight markers (MWM) used were myosin, β-
28
29 83 galactosidase, bovine serum albumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor,
30
31 84 lysozyme and aprotinin, ranging from 6.5 to 198 kDa (Prestained SDS-PAGE
32
33 85 Standards, broad range, Bio-Rad, USA).

36 37 86 ***In vitro* CK activity assay**

38
39
40 87 *Extensor digitorum longus* (EDL) muscle was dissected from mice, it was weighed
41
42 88 and submerged in 3 ml of saline solution (SS) containing NaCl (135 mM), KCl (5
43
44 89 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂ (1 mM), NaHCO₃ (15 mM), NaH₂PO₄ (1 mM) and glucose
45
46 90 (11 mM), with constant bubbling (O₂ and CO₂) at 37°C, according to Fuly, et al
47
48 91 [13]. This solution was changed each 15 min for 45 min. Thereafter, the venom or
49
50 92 venom fractions to evaluate were added at a final concentration of 10 µg/ml. Aliquots
51
52 93 of 100 µl were taken out at different times (0, 15, and 45 min) throughout the assay.
53
54 94 Negative control was conducted in the presence of the SS. At the end of the
55
56 95 experiment, CK activity was measured in each aliquot using a commercial kit
57
58
59
60

1
2
3 96 (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden Germany).
4
5
6 97 Briefly, 50 µl of the samples were solubilized in 1 ml of reactive solution, and optical
7
8 98 density was measured at 340 nm at 0,1,2 and 3 min, to determine $\Delta A/\text{min}$ and obtain
9
10 99 enzymatic activity in international units (U/I). Afterwards, the activity was normalized
11
12 100 taking into account the weight (g) of each muscle sample.

15 101 **Histochemistry**

18 102 EDL muscle used in the CK activity assays was frozen in isopentane previously
19
20 103 cooled with liquid nitrogen. Transverse sections (7 µm thick) were cut using a
21
22 104 cryostat (-19°C) and subsequently stained with either haematoxylin and eosin (H&E),
23
24 105 or Gomori's modified thrichromic staining (MGT) to be examined under light
25
26 106 microscopy.

30 107 **Mitochondrial impairment**

33 108 Mitochondrial impairment was evaluated by the enzymatic response of respiratory
34
35 109 chain complexes I and IV. **NADH assay.** EDL muscle 7 µm thick, transverse
36
37 110 sections were incubated in a phosphate buffer (containing NaH_2PO_4 and Na_2PO_4
38
39 111 0.2M, pH= 7.4) with nitro-blue tetrazolium (NBT, 4 mg) and NADH (10 mg). Slices
40
41 112 were kept in the solution for 30 minutes at room temperature before mounting them.
42
43 113 The reduction of NBT yields the precipitation of a purple formazan compound in the
44
45 114 sites of mitochondrial activity in the sarcoplasmic reticulum. This staining technique
46
47 115 allows the identification of type I fibers, which appear darker than type II fibers. **COX**
48
49 116 **assay.** Muscle sections were incubated at 37°C for 30 minutes in a phosphate buffer
50
51 117 (with NaH_2PO_4 and Na_2PO_4 0.2M, pH= 7.4) containing 10 mg of diaminobenzidine,
52
53 118 then were mounted. Mitochondrial activity is evidenced by a brownish coloration;
54
55 119 type I fibers appear darker than type II ones.
56
57
58
59
60

120 **Statistical analysis**

121 Data was submitted to analysis of variance (ANOVA), considering a completely
122 random design. ANOVA premises were verified in accordance to the following tests:
123 Kolmogorov-Smirnov to evaluate normality [20]; Levene's to check variance
124 homogeneity [14]. Multiple comparisons of means were fulfilled through Fisher LSD
125 test (least significant difference test). Level of significance was established ($\alpha = 0.05$)
126 and STATISTICA v7.0 (StatSoft, Inc) was used to analyze data.

127 **RESULTS**

128 **Venom fractionation**

129 We obtained twelve venom fractions (F1 to F12) from RP-HPLC (Figure S1, panel A)
130 and selected fractions F4, F6, F7, and F8 for testing of their myotoxic effects in
131 mouse tissue. These fractions were selected after several chromatographic runs on
132 the basis of their protein content evaluated through SDS-PAGE (Figure S1 panel B).

133 ***In vitro* CK activity**

134 SP and fractions (F4, F6, F7) triggered CK activity in muscle incubated for 15 and 45
135 min, which is an indicator of early muscle damage, while SS did not cause a
136 significant increase (Figure 1). Although SP and the fractions tested showed
137 statistically significant differences with SS control (ANOVA univariate tests of
138 significance $P_{value} < 0.00002$), the effects were more evident with the individual
139 fractions. F6 accounted for almost the 80% of the CK activity at 15 minutes (LSD test
140 $P_{value} = 0.00013$), while F7 accounted for nearly 50% of the CK activity at 45 minutes
141 (LSD test $P_{value} = 0.002$). The F4 and F8 fractions do not contribute significantly to
142 the increase in CK.

1
2
3 143 ***S. polymorpha* venom induced morphological muscle alterations and severe**
4
5 144 **myotoxic effects**
6
7

8 145 **Histological analysis**
9

10
11 146 H&E staining of cell cross sections showed loss of fascicle architecture, along with
12
13 147 signs of necrosis and inflammation in muscle exposed to *S. polymorpha* whole
14
15 148 venom (SP) and fractions, and also the presence of dark stained rounded, abnormal
16
17 149 fibers; whereas saline solution (SS) and F8 exposed samples showed a higher level
18
19 150 of conservation: fiber cells were polygonal in shape, with peripheral nuclei, and were
20
21 151 organized in fascicles (Figure 2). Furthermore, modified Gomori trichrome stain
22
23 152 evidenced little conservation of muscle structure in treated cells, shown by the
24
25 153 presence of “ragged red fibers” (RRF) (Figure 3).
26
27
28
29

30 154 We quantified the number of RRF per field in a total of 9 fields per condition. A
31
32 155 statistical analysis (ANOVA) showed significant differences between samples
33
34 156 exposed to both whole venom (SP) and venom fractions (F4, F6 and F7) and the
35
36 157 negative control (SSI) ((p-value: 0.00; F: 45.3; see Supplementary table 1), with the
37
38 158 exception of muscle incubated with fraction F8, whose effect was not different from
39
40 159 that of SS.
41
42
43
44

45 161 **Mitochondrial activity disruption signals induced by *S. polymorpha* venom**
46

47 162 We tested NADH enzymatic activity and we found the presence of ragged blue fibers
48
49 163 -which stained darkest- (Figure 3, arrows), in muscle treated with SP and fractions.
50

51
52 164 In comparison, control slices showed a regular distribution of dark (type I) and lighter
53
54 165 (type II) stained fibers. It is worth noticing that we could identify the presence of
55
56 166 round shaped fibers -as with the H&E staining-, that also showed abnormally
57
58 167 elevated NADH activity, whereas some areas of diminished activity were found in
59
60

1
2
3 168 bigger (“swollen”) fibers. When we analyzed the stained area in treated and control
4
5 169 cells we observed that the percentage of stained cells was associated with
6
7
8 170 exposition to venom fractions, where F6, F7 and F8 showed the major effects
9
10 171 ($p=0.002$; $***p < 0.00001$) (Figure 5). Upon evaluation of COX activity we found
11
12 172 fibers with very weak reaction (*arrows*, fig. 6E, venom fraction F6) and even COX-
13
14 173 negative fibers, which exhibited complete absence of reaction (asterisks in fig. 6B,
15
16
17 174 SP). In contrast, control fibers showed an even staining and make it possible to
18
19 175 clearly distinguish among I (dark brown) and II fiber types (light brown).
20
21

22 176 **DISCUSSION**

23
24
25 177 The cellular myotoxicity effects induced by snakes, scorpions and arachnid venoms
26
27 178 have been largely reported in scientific literature, mostly by their direct implications in
28
29 179 acute envenomation in humans or domestic animals [2]. In contrast, centipede
30
31 180 venoms have been less approached since there is a comparatively minor incidence
32
33 181 of clinical cases. We evaluated the myotoxic effect of SP venom in mice muscle
34
35 182 tissue, and we found it to induce structural alterations and also signs of mitochondrial
36
37 183 disruption.
38
39
40
41

42 184 The presence of ragged red fibers is a common phenomenon on snake and arachnid
43
44 185 bites, caused -in human fibers- by the accumulation of abnormal mitochondrial
45
46 186 aggregates below the sarcolemma [15] (Figure 2). These mitochondrial aggregates
47
48 187 suggest possible alterations in the overall mitochondrial function of cells. These post-
49
50 188 exposition structural effects may be due to the release of early inflammation effectors
51
52 189 as well as the action of enzymatic mediators that account for myotoxicity [16].
53
54
55

56 190 Since increases in CK levels indicate cell damage of skeletal muscle fibers these
57
58 191 results agree well with tissue damage observed in the histological analysis and
59
60

1
2
3 192 confirm that the observed effects are a consequence of *S. polymorpha* venom
4
5 193 myotoxic activity. Malta et al., [6], found that the venom of other scolopendrid
6
7 194 species caused direct hemolysis and fibrinolytic activity, often associated with the
8
9 195 centipede ability to produce metalloproteases, phospholipases and hyaluronidase
10
11 196 enzymes. We detect local inflammatory and cell structural compromised signals in
12
13 197 early times after inoculation (15 min), compared with *Scolopendra viridicornis* studies
14
15 198 [16] who detect the first inflammatory and histological reactions at 30 min after
16
17 199 inoculation in a similar animal model. Besides, the myotoxic activity observed seems
18
19 200 to be the result of concerted actions of more than one component in the venom,
20
21 201 since more than one fraction (F6 and F7) altered the cell muscle morphology and five
22
23 202 purified components from those fractions, showed no effects on CK activity compared with
24
25 203 SP (Figure S2). We discard that the effect observed on Ck activity was done by
26
27 204 phospholipase activity, since in a previous work, we purified, by RP-HPLC a phospholipase
28
29 205 A2 [17,18], which eluted at a retention time of 46.2 min, corresponding at F9 in this study. In
30
31 206 addition, at least two components (14 kDa and 42 kDa bands) corresponding with
32
33 207 phospholipase activity reported by González, *et al.* [17] had not effect on CK activity.
34
35 208 We evaluated the integrity of respiratory chain complex I with NADH stain, which is
36
37 209 also used to differentiate between types of muscle fibers –type I stain darker due to
38
39 210 higher mitochondrial activity, and type II appear lighter-, and to reveal abnormal
40
41 211 mitochondrial aggregation or altered activity -such as lack of reaction-. We identified
42
43 212 the presence of very dark stained fibers (Figure 4), consistent with our GT findings of
44
45 213 ragged red fibers which suggest that centipede venom affects respiratory chain
46
47 214 complex I, since those blue fibers were only found in tissue exposed to venom or its
48
49 215 fractions.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 216 NADH enzymatic test allows us to confirm that muscle treated with centipede venom
4
5
6 217 experienced several alterations, such as the presence of ragged blue fibers -which
7
8 218 stained darkest-, consistent with the presence of ragged red fibers (RRF) we found
9
10 219 with GT stain in resemblance of histologic signatures for mitochondrial myopathies in
11
12 220 humans. A lack of reaction implies the total disruption of complex I (Figure 4B-E).

14
15 221 On the other side COX activity further confirms mitochondrial damage. These
16
17 222 findings suggest damage to mitochondrial complex IV, especially in type II fibers,
18
19 223 which is consistent with the damage we identified when we evaluated NADH activity.

20
21
22
23 224 Histochemical analysis shows that the centipede venom produces distinctive
24
25 225 changes among control negative and cells treated with venom fractions, in spite of
26
27 226 the different techniques we used. These findings could also be associated with
28
29 227 membrane damage, since it has been found that some spider venoms cause cell
30
31 228 contraction, membrane disruption and apoptosis [19]. It is worthy to mention that
32
33 229 HeLa cultures exposed to *S. polymorpha* whole venom exhibit similar responses
34
35 230 [20], suggesting that there is a compositional regularity in the biochemical
36
37 231 determinants contained in the venom of these centipedes, which are responsible for
38
39 232 the myotoxic effects. Despite the fact that *S. polymorpha* venom proteins are
40
41 233 renewed asynchronously [21] the myotoxic effects on different cells seem to be a
42
43 234 consequence of evolution and selection of this predatory and venomous animal.

44
45
46
47
48
49 235 To the best of our knowledge, this is the first comprehensive report about *S. polymorpha*
50
51 236 venom tissue damage effects where the respiratory chain activity is also altered. It is
52
53 237 plausible that further efforts could establish a new model to study human mitochondrial
54
55 238 myopathies and possible treatment alternatives.

56
57
58 239
59
60

1
2
3 240 **CONCLUSION**
4
5

6 241 The study of animal venoms has proven to be a helpful approach for the biomedical
7
8 242 field, but centipede venoms are amongst the least studied ones in comparison to
9
10 243 other arthropods -like scorpions and spiders-, and snakes, in spite of an increasing
11
12 244 evidence of their importance as a reservoir of novel proteins and enzymes. With this
13
14 245 study, we demonstrate that the myotoxic effects of *S. polymorpha* venom on mice
15
16 246 readily show a short period of time since the exposition, causing severe structural
17
18 247 and biochemical damage to skeletal muscle, something to expect when studying the
19
20 248 venom of a predatory animal, whose components have evolved to affect a wide
21
22 249 range of prey.
23
24
25
26

27 250 **REFERENCES**
28
29

- 30 251 1. Cupul-magaña FG. La diversidad de los ciempiés (Chilopoda) de México
31
32 252 Mexican Diversity of Centipedes (Chilopoda). Dugesiana. 2013;20:17–41.
33
34 253 2. Undheim E, Fry B, King G. Centipede Venom: Recent Discoveries and Current
35
36 254 State of Knowledge. Toxins (Basel) [Internet]. 2015;7:679–704. Available from:
37
38 255 <http://www.mdpi.com/2072-6651/7/3/679/>
39
40
41
42 256 3. Stankiewicz M, Hamon A, Benkhalifa R, Kadziela W, Hue B, Lucas S, et al.
43
44 257 Effects of a centipede venom fraction on insect nervous system, a native *Xenopus*
45
46 258 oocyte receptor and on an expressed *Drosophila* muscarinic receptor.
47
48 259 1999;37:1431–45.
49
50
51
52 260 4. Gutierrez C; Abarca C; Possani LD. A toxic fraction from scolopendra venom
53
54 261 increases the basal release of neurotransmitters in the ventral ganglia of
55
56 262 crustaceans. 2003;135:205–14.
57
58
59
60

- 1
2
3 263 5. Wang I-K, Hsu S-P, Chi C-C, Lee K-F, Lin PY, Chang H-W, et al.
4
5 264 Rhabdomyolysis, acute renal failure, and multiple focal neuropathies after drinking
6
7 265 alcohol soaked with centipede. *Ren Fail.* 2004;26:93–7.
8
9
10 266 6. Malta MB, Lira MS, Soares SL, Rocha GC, Knysak I, Martins R, et al. Toxic
11
12 267 activities of Brazilian centipede venoms. *Toxicon.* 2008;52:255–63.
13
14
15 268 7. Hasan S, Hassan K. Proteinuria associated with centipede bite [3]. *Pediatr.*
16
17 269 *Nephrol.* 2005. p. 550–1.
18
19
20
21 270 8. Rodríguez-Alejandro CI; Gutiérrez MC. Antimicrobial activity of SPC13, new
22
23 271 antimicrobial peptide purified from *Scolopendra polymorpha* venom. *Anti-Infective*
24
25 272 *Agents.* 2019;17.
26
27
28
29 273 9. Undheim EAB, Jenner RA, King GF. Centipede venoms as a source of drug leads.
30
31 274 *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11:1139–49.
32
33
34 275 10. Hakim MA, Yang S, Lai R. Centipede venoms and their components: Resources
35
36 276 for potential therapeutic applications. *Toxins (Basel).* 2015. p. 4832–51.
37
38
39 277 11. Lowry. Lowry Protein Assay. *J Biol Chem.* 1951;265–75.
40
41
42 278 12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
43
44 279 bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5.
45
46
47 280 13. Fuly a L, Calil-Elias S, Zingali RB, Guimarães J a, Melo P a. Myotoxic activity of
48
49 281 an acidic phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake
50
51 282 venom. *Toxicon.* 2000;38:961–72.
52
53
54
55 283 14. Levene H. Levene test for equality of variances. *Contrib to Probab Stat.* 1960;1–
56
57 284 2.
58
59
60

- 1
2
3 285 15. Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T. Experimental
4
5 286 pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*.
6
7 287 2009;54:958–75.
8
9
10 288 16. Kimura LF, Prezotto-Neto JP, Távora BDCLF, Antoniazzi MM, Knysak I, Gióia
11
12 289 Guizze SP, et al. Local inflammatory reaction induced by *Scolopendra viridicornis*
13
14 290 centipede venom in mice. *Toxicon*. 2013;76:239–46.
15
16
17
18 291 17. González-Morales L. Caracterización bioquímica y molecular de los
19
20 292 componentes del veneno del ciempiés *Scolopendra viridis* Say. Universidad
21
22 293 Autónoma del Estado de Morelos; 2010.
23
24
25
26 294 18. González-Morales L, Diego-García E, Segovia L, Carmen Gutiérrez M del,
27
28 295 Possani LD. Venom from the centipede *Scolopendra viridis* Say: Purification, gene
29
30 296 cloning and phylogenetic analysis of a phospholipase A2. *Toxicon*. 2009;54:8–15.
31
32
33 297 19. Gao L, Shan BE, Chen J, Liu JH, Song DX, Zhu BC. Effects of spider *Macrothele*
34
35 298 raven venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacol Sin*.
36
37 299 2005;26:369–76.
38
39
40
41 300 20. Ronces Alvarado A. Determinación de la actividad apoptótica inducida por un
42
43 301 péptido aislado a partir del veneno de *Scolopendra polymorpha* sobre la línea celular
44
45 302 HeLa. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2018.
46
47
48 303 21. Cooper AM, Fox GA, Nelsen DR, Hayes WK. Variation in venom yield and
49
50 304 protein concentration of the centipedes *Scolopendra polymorpha* and *Scolopendra*
51
52 305 *subspinipes*. *Toxicon*. 2014;82:30–51.
53
54
55
56 306
57
58
59 307 **FIGURE LEGENDS**
60

1
2
3 308 **Figure 1. CK *in vitro* activity of whole venom and venom fractions.** CK activity,
4 expressed as percentage, was measured before the addition of venom or venom fractions
5 (time= 0 min) and 15 and 45 min after muscle exposition to venom or venom fractions. SS=
6 saline solution; SP= whole venom (10 µg/ml); F4-F8= venom fractions (10 µg/ml each). n=3;
7
8 311 *= statistical significance ($p<0.05$) between groups, ANOVA.
9
10 312

11
12 313
13
14 314 **Figure 2. Light micrographs of mouse EDL muscle exposed to *S. polymorpha***
15 **whole venom or its fractions.** (SS) Muscle incubated with saline solution. Normal
16 fibers with polygonal shape, peripheral nuclei and conserved fascicular structure.
17 Muscle incubated with whole venom (SP) or venom fractions F4, F6, F7 and F8,
18 respectively; there are signs of inflammation (*), necrosis (▲), loss of fascicle
19 architecture, round shaped fibers (♦). 400x; H&E stain.
20
21 317
22 318
23 319

24
25 320 **Figure 3. Mouse EDL muscle exposed to *S. polymorpha* whole venom or its fractions**
26 **showed signs of mitochondrial damage.** (SS) Muscle incubated with saline solution.
27 Normal fibers with polygonal shape, peripheral nuclei and conserved fascicular
28 structure. Muscle incubated with whole venom (SP) or venom fractions (F4 to F8);
29 some fibers show the appearance of ragged red fibers (arrows) associated to altered
30 mitochondrial activity; peripheral nuclei can be observed (arrow heads). Areas of
31 mitochondrial accumulation were also found (white arrows). 400x; Modified Gomori
32 thrichrome stain.
33
34 325
35 326
36 327

37
38
39 328 **Figure 4. NADH enzymatic activity.** (SS) Muscle incubated with saline solution. We
40 observe a chess board-like distribution of type I (darker) and II fibers. (B, C, D, E, F)
41 Muscle incubated with whole venom (SP) or venom fractions (F4 to F8); there are
42 signs of mitochondrial alterations, such as excessive coloration (*, “blue” fibers).
43 Areas of mitochondrial accumulation were also found (white arrows). 400x.
44
45 331
46 332

47
48
49 333 **Figure 5. NADH activity quantification with FIJI software. (A)** Micrograph without
50 filters, showing NADH activity. **(B)** Micrograph with filters applied to quantify the
51 areas of enzymatic activity (red) with FIJI Software. Magnification: 400x. **(C)** NADH
52 stained areas. After software treatment, a statistical analysis of the percentage of
53 NADH stained areas was performed. *= statistical significance ($p<0.05$).
54
55 337

56
57
58 338 **Figure 6. COX enzymatic activity.** (SS) Muscle incubated with saline solution. Type
59 I fibers appear in dark brown and II fibers are lighter. Muscle incubated with whole
60

1
2
3 340 venom (SP) or venom fractions (F4 to F8); there are signs of mitochondrial
4 341 alterations, evidenced by the presence of COX negative fibers (*) or areas with
5 342 weakened reaction (arrows). 400x.

8 9 343 **SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS**

10
11 344 **S1. Fractionation of *S. polymorpha* venom. A) RP-HPLC profile.** Crude venom
12 345 was separated using a C18 column in RP-HPLC. Linear gradient from 0% buffer A
13 346 (TFA 0.12% in H₂O) to 60% buffer B (TFA 0.1% in). Flow: 1 ml/min. Optical density
14 347 was monitored at 230 nm. **B) SDS-PAGE of RP-HPLC fractions.** Analysis
15 348 performed under non denaturing conditions. MWM= molecular weight markers; SP=
16 349 *S. polymorpha* whole venom; F1-F11= venom fractions. Coomassie blue stain.

17
18
19
20
21
22 350 **S2. CK *in vitro* activity of electroeluted bands.** CK activity, expressed as
23 351 percentage, was measured before the addition of venom or electroeluted bands
24 352 (time= 0 min) and 15 and 45 min after muscle exposition to venom or venom
25 353 fractions. SS= saline solution; SP= whole venom; 9 kDa-56 kDa= electroeluted
26 354 bands. Average values \pm SEM are shown. *= statistical significance ($p < 0.05$).

27 28 29 30 31 355 **AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS**

32
33
34 356 The datasets generated during and/or analyzed during the current study are
35 357 available from the corresponding author on reasonable request.

36 37 38 39 40 358 **ETHICS STATEMENT**

41
42
43 359 All experimental protocols that involved the use of animals were performed in
44 360 accordance to the guidelines approved by the bioethics committee of the IBT
45 361 (Instituto de Biotecnología), UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México).

46 47 48 49 50 362 **FUNDING**

51
52
53 363 This investigation was funded by CONACyT grant no. 267392.

54 55 56 364 **COMPETING INTERESTS**

57
58
59 365 The authors declare that they have no competing interests.
60

1
2
3 366 **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**
4
5

6 367 JTDR and MCG conceived this research and designed experiments, wrote the paper
7
8 368 and participated in the revisions of it. FFV and JVH participated in the design and
9
10 369 interpretation of the data. LVC participated in the performance of experiments and
11
12 370 provided technical support. JTDR performed experiments and analysis. ASR
13
14 371 performed all statistical analysis and contributed to write the paper. All authors read
15
16 372 and approved the final manuscript.
17
18
19

20
21 373

22
23 374 **ABBREVIATIONS**
24
25

26 375 ANOVA: analysis of variance.
27
28

29 376 CEIB: Centro de Investigación en Biotecnología.
30
31

32 377 CK: creatine kinase.
33
34

35 378 CONACyT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
36
37

38 379 COX: Cyclooxygenase.
39
40

41 380 H&E: haematoxylin and eosin stain.
42
43

44 381 IBT: Instituto de Biotecnología.
45
46

47 382 LSD test: least significant difference test.
48
49

50 383 MGT: Gomori's modified thrichromic stain.
51
52

53 384 MWM: molecular weight markers.
54
55

56 385 NADH: nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H).
57
58

59 386 NBT: nitro-blue tetrazolium.
60

- 1
2
3 387 RRF: ragged red fibers.
4
5
6 388 RP-HPLC: Reverse-phase high performance liquid chromatography.
7
8
9 389 *S. polymorpha*: *Scolopendra polymorpha*.
10
11
12 390 SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
13
14
15 391 SP: *S. polymorpha* venom.
16
17
18 392 SS: saline solution.
19
20
21 393 TFA: trifluoroacetic acid.
22
23
24 394 UAEM: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
25
26
27 395 UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

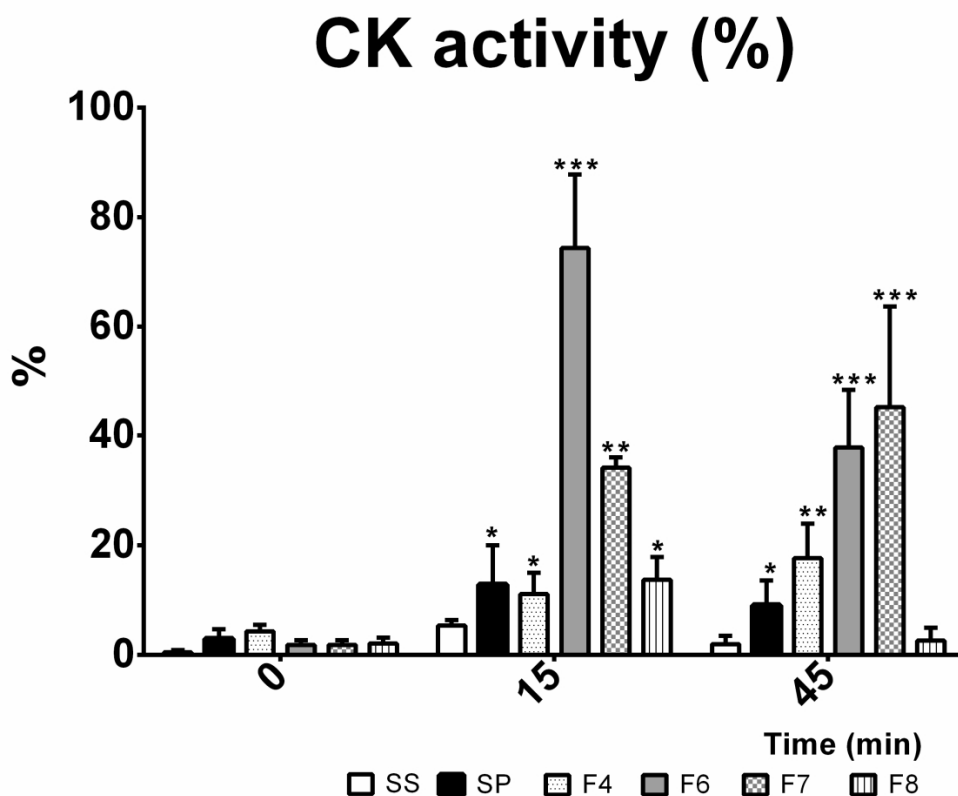


Figure 1. CK in vitro activity of whole venom and venom fractions. CK activity, expressed as percentage, was measured before the addition of venom or venom fractions (time= 0 min) and 15 and 45 min after muscle exposition to venom or venom fractions. SS= saline solution; SP= whole venom (10 µg/ml); F4-F8= venom fractions (10 µg/ml each). n=3; *= statistical significance ($p < 0.05$) between groups, ANOVA.

230x191mm (300 x 300 DPI)

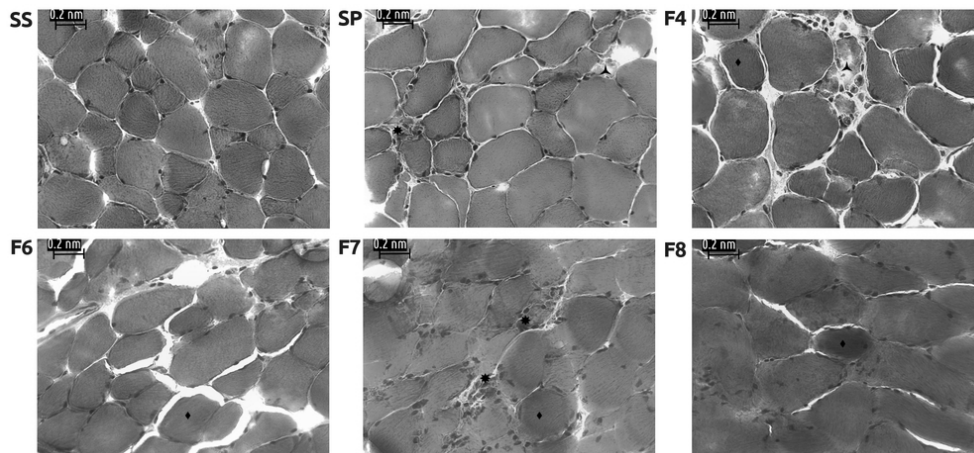


Figure 2. Light micrographs of mouse EDL muscle exposed to *S. polymorpha* whole venom or its fractions. (SS) Muscle incubated with saline solution. Normal fibers with polygonal shape, peripheral nuclei and conserved fascicular structure. Muscle incubated with whole venom (SP) or venom fractions F4, F6, F7 and F8, respectively; there are signs of inflammation (□), necrosis (□), loss of fascicle architecture, round shaped fibers (□). 400x; H&E stain.

42x19mm (600 x 600 DPI)

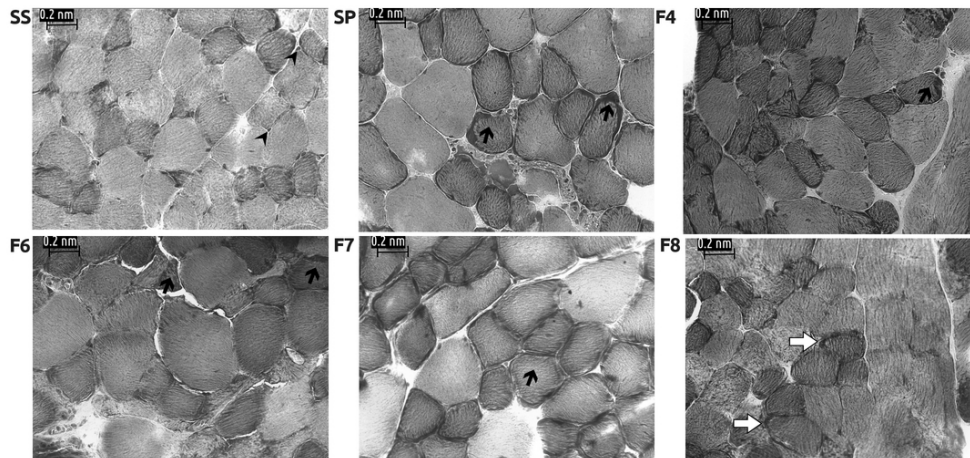


Figure 3. Mouse EDL muscle exposed to *S. polymorpha* whole venom or its fractions showed signs of mitochondrial damage. (SS) Muscle incubated with saline solution. Normal fibers with polygonal shape, peripheral nuclei and conserved fascicular structure. Muscle incubated with whole venom (SP) or venom fractions (F4 to F8); some fibers show the appearance of ragged red fibers (arrows) associated to altered mitochondrial activity; peripheral nuclei can be observed (arrow heads). Areas of mitochondrial accumulation were also found (white arrows). 400x; Modified Gomori thrichrome stain.

46x22mm (600 x 600 DPI)

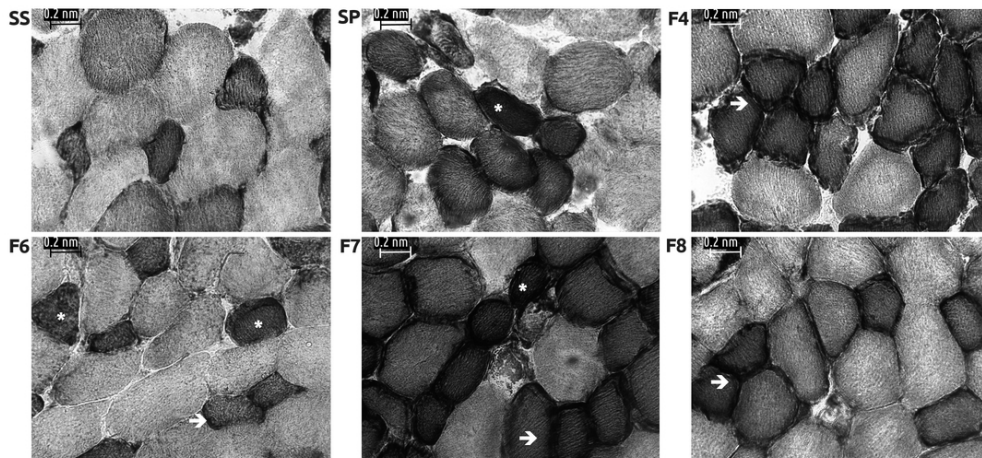


Figure 4. NADH enzymatic activity. (SS) Muscle incubated with saline solution. We observe a chess board-like distribution of type I (darker) and II fibers. (B, C, D, E, F) Muscle incubated with whole venom (SP) or venom fractions (F4 to F8); there are signs of mitochondrial alterations, such as excessive coloration (*, "blue" fibers). Areas of mitochondrial accumulation were also found (white arrows). 400x.

45x21mm (600 x 600 DPI)

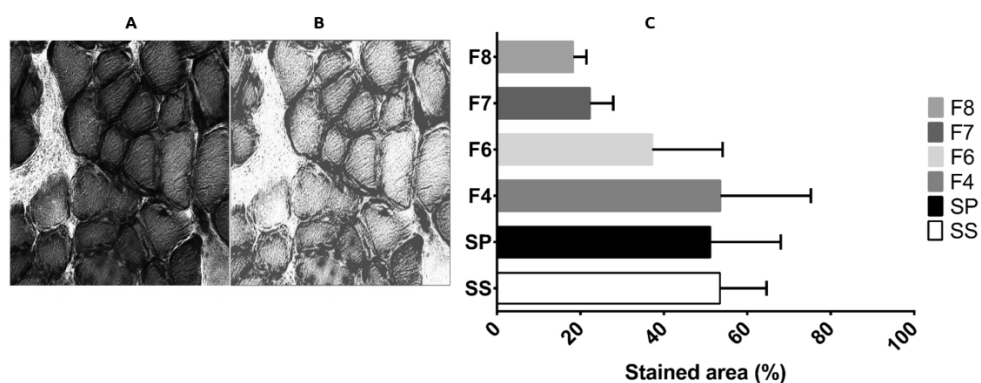


Figure 5. NADH activity quantification with FIJI software. (A) Micrograph without filters, showing NADH activity. (B) Micrograph with filters applied to quantify the areas of enzymatic activity (red) with FIJI Software. Magnification: 400x. (C) NADH stained areas. After software treatment, a statistical analysis of the percentage of NADH stained areas was performed. *= statistical significance ($p < 0.05$).

336x136mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

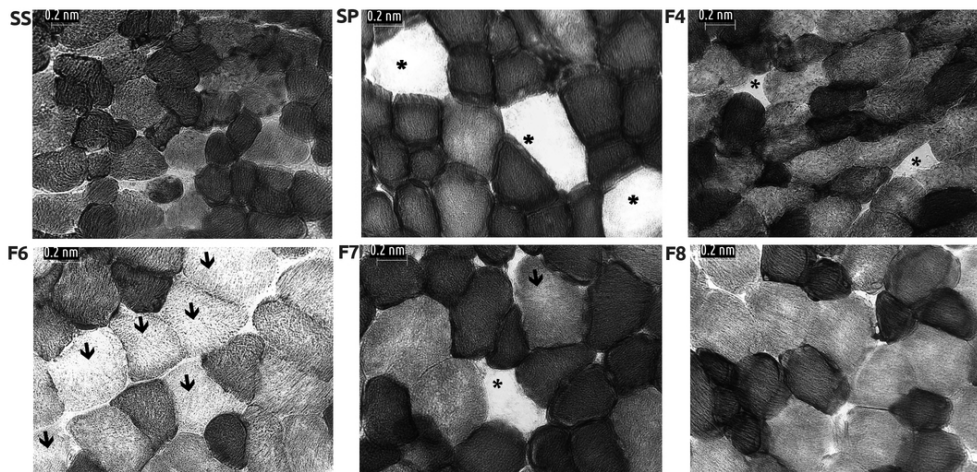
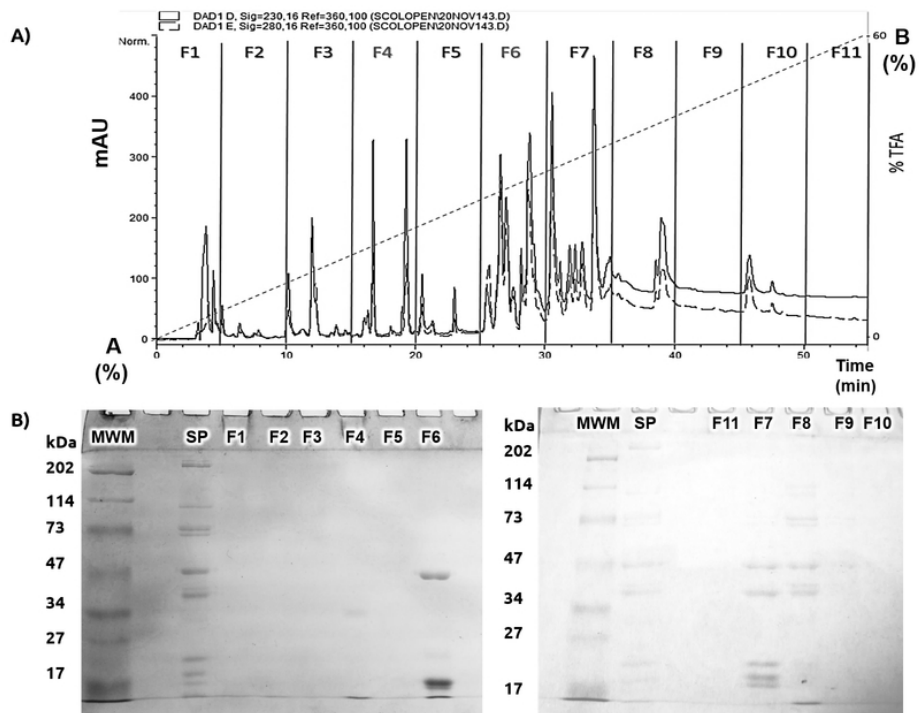


Figure 6. COX enzymatic activity. (SS) Muscle incubated with saline solution. Type I fibers appear in dark brown and II fibers are lighter. Muscle incubated with whole venom (SP) or venom fractions (F4 to F8); there are signs of mitochondrial alterations, evidenced by the presence of COX negative fibers (*) or areas with weakened reaction (arrows). 400x.

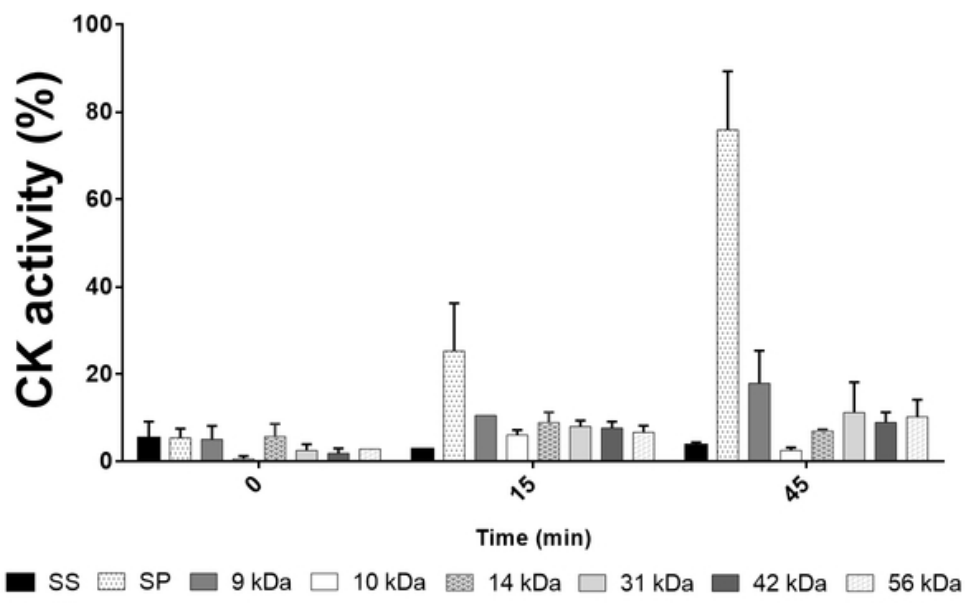
45x22mm (600 x 600 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



36x26mm (600 x 600 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



25x16mm (600 x 600 DPI)