

EFFECTO VASOMOTOR INDUCIDO POR EL VENENO TOTAL DE *Centruroides margaritatus* EN ANILLOS AÓRTICOS DE RATAS (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Margarita Rosa Romero Imbachí

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018**

EFFECTO VASOMOTOR INDUCIDO POR EL VENENO TOTAL DE *Centruroides margaritatus* EN ANILLOS AÓRTICOS DE RATAS (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Presentado por:

Margarita Rosa Romero Imbachi

Director:

José Toribio Beltrán Vidal

Asesores:

Jimmy Alexander Guerrero Vargas

Nelson Iván Cupitra

Karen Ángel Camilo

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Director: _____

José Toribio Beltrán Vidal, MSc.

Jurado: _____

Mayra Alejandra Velasco Reyes, MSc.

Jurado: _____

Ana Alicia Acosta Jurado, ESc.

Ciudad y fecha de sustentación: Popayán, Noviembre 6 del 2018

Dedicatoria:

*A mi Madre Yomar Umbachi,
A mi Padre Hugo Romero,
A mi hermana Yina Romero,
A mi familia,
Por ser mi motor, mi ejemplo a seguir,
Gracias por su amor, apoyo y por ser mi mayor motivación.*

“Durante toda la vida, las personas intentan tambalear tu fe en ti misma. Cuando esto suceda, recuerda que la única forma de que tengan éxito es que tú lo permitas. Cuando caminas por la calle de la vida, siempre mantén la frente en alta y sigue caminando. Nunca dejes que nadie sacuda tu fe en ti misma porque eso es todo lo que tienes.”

- Sherry Argov

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por guiarme en este camino para cumplimiento de esta meta.
- A la Universidad del Cauca, al Departamento de Biología y al Cuerpo de profesores, por brindarme la formación académica para lograr el título de profesional.
- Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), y a su personal por contribuir a mi formación.
- Al Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) de la Universidad del Cauca por contribuir en mi formación como investigadora.
- A la Universidad de Antioquia (UDEA) y el grupo de investigación PHYSIS por hacer posible la realización de parte de mis experimentos y compartir conmigo su conocimiento.
- A mi director José Toribio Beltrán Vidal, por su colaboración, por su paciencia, por su apoyo para la realización de mi trabajo, por transmitir sus conocimientos, por su amistad.
- A mí asesor Jimmy Guerrero Vargas, por compartir sus conocimientos, por su apoyo, por su amistad, por su colaboración y consejos que hicieron posible la realización de esta investigación.
- A mis asesores Karen Leonor Ángel Camilo y Nelson Iván Cupitra por todo lo enseñado, su apoyo incondicional, su paciencia, su tiempo dedicado y los consejos brindados, por ayudarme en la construcción como profesional, pero sobre todo por su amistad.
- A mis evaluadores por dedicarle tiempo en la evaluación en mi trabajo y por sus aportes.
- A los doctores Raúl Narváez Sánchez y Juan Camilo Castrillón por su ayuda y consejos brindados en mis experimentos y por compartir sus conocimientos durante mi estancia en Medellín.

- A mis padres, Hugo Albeiro Romero y Yomar Imbachi por su apoyo incondicional en todo momento, por luchar y creer en mí, pero ante todo por brindarme todo su amor.
- A mis hermanos Yina Andrea Romero y Emerson Romero por su apoyo, su cariño, sus consejos y cuidados.
- A mi familia, gracias por estar siempre ahí.
- A mis amigos de infancia, por su amistad incondicional sin importar donde nos encontremos.
- A mis amigos y compañeros con los que compartí durante toda mi la carrera por las experiencias, por su amistad y por el gran compañerismo.
- A mis compañeros y amigos monitores del CIBUC y GIHT; Karen, Andrés, Angie, Yula, Valentina, Malory, Yisel, Juan camilo por todas las buenas experiencias.
- A mis amigos y a todas las personas que me ayudaron de una u otra forma en este proceso y que se me escape por nombrar.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS

RESUMEN

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	JUSTIFICACIÓN	3
3.	MARCO TEÓRICO	5
3.1.	Los escorpiones	5
3.2.	Distribución geográfica en Colombia y clasificación taxonómica de <i>C. margaritatus</i>	6
3.3.	Escorpionismo.....	7
3.4.	Veneno de escorpiones	9
3.5.	La presión arterial media.....	10
3.6.	Electrolitos Ca ⁺⁺ , Na ⁺ , K ⁺	10
3.5.	Fisiología de la contracción del musculo liso	11
3.6.	Receptores muscarinicos	13
3.7.	Endotelio	13
3.7.1.	Fisiología del Endotelio.....	13
3.7.2.	Seratrodist e Indometacina.....	14
3.7.3.	L-name	14
3.7.4.	Prazosina.....	14
4.	ANTECEDENTES	15
5.	OBJETIVOS	19
5.1.	Objetivo general	19
5.2.	Objetivos específicos	19
6.	MATERIALES Y METODOS	20
6.1.	Tipo de estudio.....	20
6.2.	Sitio de colecta de individuos y mantenimiento en cautiverio.	20
6.3.	Obtención del veneno.	20
6.4.	Modelos experimentales	21
6.5.	Medición de la presión arterial (PA)	21

6.6. Niveles de electrolitos (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺⁺).....	22
6.7. Obtención del anillo aórtico.....	23
6.8. Anillo aórtico.....	24
6.8.1 Baño de órgano aislado.....	24
6.9. Análisis estadístico.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1.0. Síntomas presentados en los modelos experimentales.....	28
7.1. Presión arterial (PA).....	28
7.2. Niveles séricos de electrolitos.....	30
7.3. Prueba anillo aórtico.....	31
7.3.1. Efecto del veneno sobre el tono vascular.....	31
7.3.2. Efecto del veneno independiente de endotelio sobre el tono vascular.....	33
7.3.3. Efecto VCCm a agonistas contráctiles y vasorelajantes.....	34
8. DISCUSIÓN.....	36
9. CONCLUSIONES.....	44
10. RECOMENDACIONES.....	45
12. BIBLIOGRAFÍA.....	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>C. margaritatus</i> (Gervais 1841).....	7
Tabla 2. Clasificación clínica del accidente escorpiónico en Colombia.....	9
Tabla 3. Principales sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras del endotelio...13	
Tabla 4. PS, PD y PAM (mmHg) del grupo control y tratados con VCCm en los diferentes tiempos de observación (n=5) a una concentración del 80% de la DL50.....	28
Tabla 5. Niveles séricos de Na ⁺ k ⁺ y Ca ⁺⁺ (mmol/L) del grupo control y cada uno de los grupos (n=5) tratado con VCCm a diferentes concentraciones del 20%, 40% y 80% de la DL50.	30
Tabla 6. Valores de contracción (% con KCl) de los anillos aórticos sanos, incubados con L-name e Indometacina y con lesión endotelial, tratados con VCCm.....	32
Tabla 7. Función específica de los factores vasoactivos usados.	33
Tabla 8. Valores de contracción (% con KCl) de anillos aórticos incubados con L-name e Indometacina, Seratrodast y Prazocina, tratados con VCCm.....	33
Tabla 9. Valores de contracción (%) de los anillos aórticos en curvas de contracción; A: KCl B: U46 619 C: Fenilefrina y de relajación D: Carbacol (Cch) incubados con VCCm.....	35

RESUMEN

En Colombia el escorpionismo es un problema de salud pública, reportado como el segundo accidente provocado por animales venenosos después del ofidismo con 1.783 casos (2006 al 2010) de los cuales el 25% pertenecen a los escorpiones (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2012). Dada la importancia clínica debido a la frecuencia de accidentes y a sus hábitos sinantrópicos en áreas densamente pobladas, la toxicidad de sus venenos, la dificultad su del manejo por los centros de salud y los pocos estudios sobre su fisiopatología vascular, nos llevó en esta investigación a determinar la acción del veneno total del escorpión *Centruroides margaritatus* (VCCm) del valle geográfico del Patía; mediante un sistema *in vivo*, se determinó de la presión arterial usando un método no invasivo, además de la cuantificación de los niveles de electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) de ratas cepa Wistar, inoculadas con dosis sub-letales del VCCm. Seguidamente, se realizaron experimentos *ex vivo*, usando la técnica de baño de órgano aislado para determinar el efecto directo del VCCm en anillos aórticos de ratas. Se realizaron curvas acumulativas de concentración del VCCm (10 μg a 600 μg) con diferentes tratamientos (L-name, Indumetacina, Seratrodast y Prazocina). Se encontró un incremento de la presión diastólica, así como un aumento significativo de los niveles séricos de Ca^{2+} . Los resultados *ex vivo* permiten identificar una acción directa VCCm sobre el tono vascular (vasoconstricción) sobre los receptores alfa 1 adrenérgicos y parte de esta respuesta ser inhibida por el endotelio. Se concluye que el efecto vasomotor del VCCm, puede alterar de la presión arterial sistémica o de los niveles séricos de electrolitos. Este trabajo ayuda a tener una mejor comprensión del tratamiento clínico del envenenamiento en el monitoreo de la presión arterial y afecciones cardiovasculares;

igualmente es un aporte adicional a patologías relacionadas a canales iónicos y mejorar la comprensión de los mecanismos.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al escorpionismo un problema de salud pública desatendido (OMS, 2018), siendo el segundo accidente más prevalente de animales ponzoñosos a nivel mundial, especialmente en países tropicales con cerca de 1,2 millones de picaduras al año y más de 3.250 muertes. Se reporta un gran número de casos de envenenamiento en América latina, especialmente en México y Brasil con 200.000-250.000 y 8.000-21.000 casos por año respectivamente (Chippaux y Goyffon, 2008). En Colombia existen pocos registros sobre el accidente escorpiónico, sin embargo entre los años 2006 a 2010 se reportaron 441 casos de picaduras sin registro de muertes por este accidente (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2012). A pesar de que la mortalidad por escorpionismo puede parecer baja, los niños menores de 15 años representan el 32% de las víctimas fatales y los servicios de salud lo manejan con dificultad, sin embargo, en una evaluación global de epidemiología, se precisa la gestión y el tratamiento frente a la gravedad del envenenamiento principalmente en niños, para establecer el pronóstico e instituir tratamientos adecuados (Chippaux y Goyffon, 2008).

Actualmente existen 21 familias de escorpiones descritas en el mundo. La familia Buthidae una de las más estudiadas debido a su importancia médica, constituida por 91 géneros y 1.139 especies (sp) de escorpiones extendidos en todo el mundo (Rein, 2012). En Colombia esta familia está representada por 5 géneros: *Ananteris*, *Microtityus*, *Rhopalurus*, *Tityus* y *Centruroides*, (Guerrero-vargas *et al.*, 2013). Dentro del género *Centruroides* encontramos las sp: *C. grasilis*, *C.edwarsii*, *C. danieli* y *C. margaritatus* (Armas *et al.*, 2012).

El envenenamiento ocasionado por escorpiones de la familia Buthidae es de gran interés para la comunidad científica debido a que su veneno es una mezcla bioquímica compleja, formada por proteínas neurotóxicas de bajo peso molecular, que ejercen su acción sobre canales iónicos, ocasionando efectos nocivos en sus víctimas (Saldarriaga y Otero, 2000; Guerrero-vargas *et al.*, 2013). Este veneno

también induce una respuesta inflamatoria de manera sistémica, lo que produce la liberación de neurotransmisores y catecolaminas, que adicionalmente liberan hormonas peptídicas y vasoactivas como el neuropéptido-Y y la endotelina (D'Suze *et al.*, 2003).

El cuadro clínico del envenenamiento depende de la predominancia de los efectos colinérgicos y adrenérgicos o de la combinación de ambos, clasificando los signos y síntomas en categorías según su gravedad; la primera, incluye eventos locales como dolor severo y eritema; la segunda: ataxia, sudoración, salivación, náuseas y vómitos; la tercera: priapismo, diarrea, incoordinación, broncoespasmos; y en la cuarta categoría, se observan manifestaciones cardiorrespiratorias, neurológicas y hemodinámicas más graves (Cupo *et al.*, 2007; Khattabi *et al.*, 2011). Se ha demostrado que el envenenamiento por escorpiones resulta en manifestaciones cardiovasculares, como alteraciones de la presión arterial sistémica y alteraciones del ritmo cardíaco, generalmente ocasionado por los géneros *Centruroides*, *Tityus*, *Leiurus*, *Androctonus* y *Buthus* (Zlotkin *et al.*, 1978).

La capacidad de las toxinas para activar el sistema cardiovascular juega un papel importante en la morbilidad y letalidad del envenenamiento del escorpión *C. margaritatus*. La mayoría de las acciones de las toxinas de diferentes especies de escorpiones son indirectas, debido a la liberación de neurotransmisores adrenérgicos y colinérgicos, y por esto el tratamiento después del envenenamiento está dirigido a la inhibición de estos receptores adrenérgicos y colinérgicos (Teixeira *et al.*, 2001).

Estudios de efectos vasculares relacionados con el envenenamiento producidos por el escorpión *C. margaritatus*, apuntan a demostrar la actividad del veneno de manera indirecta sobre el tejido vascular (Bonilla, 2010; Galíndez-Cerón, 2014), sin embargo, hay carencia de estudios relacionados con la actividad directa del veneno en el tejido vascular, por lo anterior es importante evidenciar ¿si existe o no una acción directa del veneno completo de *C. margaritatus* en endotelio o musculo liso vascular (mlv)? y de ser así ¿su efecto es vasoconstrictor o vasodilatador y si tiene alguna relación con la PA o los electrolitos séricos?, lo cual puede ser un punto de partida para contribuir a mejorar el tratamiento clínico por envenenamiento escorpiónico en Colombia.

2. JUSTIFICACIÓN

En Colombia la picadura de escorpión constituye un motivo frecuente de consulta en algunas regiones del país con altos niveles de incidencia, especialmente en áreas rurales, no obstante el país cuenta con pocos registros que permitan definir con certeza la magnitud del escorpionismo (Barona et al., 2004). Hasta la fecha ni el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA, 2018) ni el Instituto Nacional de Salud de Colombia cuentan con un registro epidemiológico obligatorio para los accidentes escorpiónicos, y mucho menos se cuenta con una suficiente producción de antivenenos específicos (Gómez et al., 2002).

La especie *C. margaritatus*, objeto de esta investigación se ubica geográficamente en el Valle del Patía Departamento del Cauca, entre la cordillera central y occidental, presentando una alta incidencia del accidente escorpiónico en los habitantes de esta zona (Marinkelle, 1965; Galíndez, 2014) , sin embargo, el veneno de esta especie posiblemente no es el más agresivo en comparación con otras especies y las tasas de mortalidad son bajas, aunque se han reportado casos letales en niños y en ancianos (Borges et al., 2011). Las investigaciones previas realizadas para esta especie se han basado en algunas actividades biológicas de los componentes del veneno, fraccionamiento y caracterización de toxinas como la Margarotoxina (García-Calvo et al., 1993), manifestaciones clínicas del envenenamiento, como la dosis letal 50 (DL₅₀) y caracterización proteómica incluyendo dos nuevas toxinas (Guerrero-Vargas, 2008).

El veneno de *C. margaritatus* contiene entre otras moléculas, péptidos correspondientes a toxinas son modeladoras de los canales Na⁺ y otras que bloquean los canales de K⁺ que estimulan la actividad en la unión neuromuscular reportando síntomas frecuentes como: aumento de T° corporal, náuseas, vómitos, visión borrosa, cambios de la frecuencia respiratoria, además de presentar efectos sistémicos como midriasis, ataxia, piloerección, lo cual clasifica este veneno como neurotóxico, sumando a esto los efectos cardiotoxicos y hemodinámicos (Marinkelle, 1965; Guerrero-Vargas, 2008; Dueñas-Cuellar, 2014).

La mayoría de las toxinas del veneno tienen un efecto indirecto debido a la liberación de neurotransmisores adrenérgicos y colinérgicos, pero se ha evidenciado que la acción del veneno no solo depende de la liberación de neurotransmisores, sino también de un efecto directo del veneno (Teixeira *et al.*, 2001). Actualmente, los estudios con órgano aislado, han permitido evaluar de forma directa las alteraciones que se pueden generar en un órgano de interés, de manera que la respuesta no se ve afectada por otros sistemas (D'Suze *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta lo anterior se puede hipotetizar sobre un efecto directo del veneno en el musculo liso o en el endotelio, lo cual permite un conocimiento más amplio sobre las propiedades del veneno de esta especie, que sirvan como base de futuras investigaciones en el campo de la farmacología y la biotecnología.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Los escorpiones

Son artrópodos muy antiguos (400 millones de años), distribuidos en zonas tropicales y subtropicales del mundo, viven en áreas secas y templadas desde el nivel del mar hasta altitudes de 2.800 msnm, son de hábitos nocturnos generalmente extradomiciliares (ocultos en grietas, bajo rocas, troncos, etc), o domiciliarios (paredes, techos y dentro de las habitaciones) (Puerta Garcia y Mora, 2014; Teruel y Melic, 2015).

El cuerpo de un escorpión está dividido en: prosoma, mesosoma y metasoma. Los segmentos del prosoma están cubiertos por una especie de caparazón, el opistosoma es alargado, segmentado y dividido en mesosoma y metasoma de siete y cinco segmentos, respectivamente, el telson es en forma de aguijón, con glándula de veneno (Brusca & Brusca, 2003); figura 1.

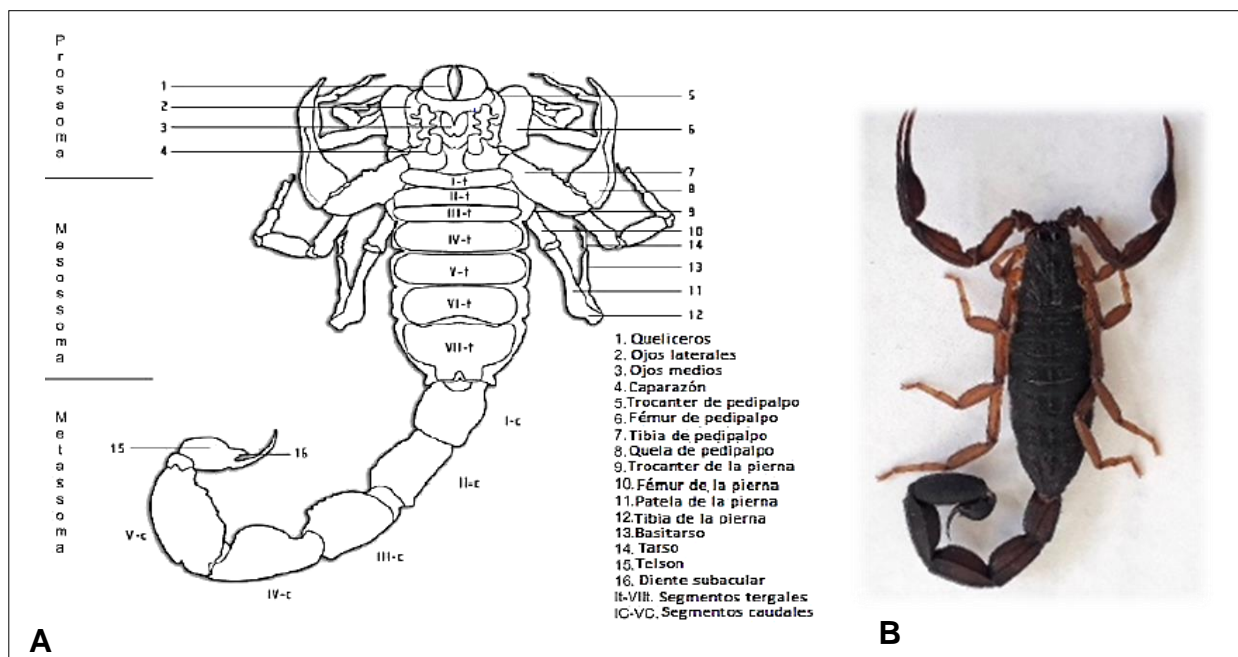


Figura 1. Morfología externa del escorpión **A** vista dorsal. Fuente: modificado de Flórez 2007. **B:** Especimen de *C. margaritatus*. Individuo colectado en el Valle del Patía (hembra adulta). (Fotografía: Andrés Olaya 2018).

Los escorpiones de la familia *Buthidae* son reconocidos morfológicamente por tener pinzas en sus pedipalpos, esternón en forma triangular y espina debajo del aguijón, por lo general son especies de coloraciones opacas; en contraste con otras familias que viven en Colombia, que son de colores brillantes, tienen pinzas robustas y de tamaño moderado y no tienen la espina debajo del aguijón, en cuanto al género *Centruroides* posee entre 8 y 9 hileras oblicuas de dentículos que tienen en los bordes internos de los dedos de las pinzas, además, tienen cuerpos más delgados y marrones, con patas de color marrón amarillento, figura 1. B. (Gómez y Otero, 2007; Guerrero-vargas *et al.*, 2013)

C. margaritatus es de tamaño moderado a grande (65-90 mm de longitud total) figura 1. B, de color pardo oscuro casi uniforme, por lo general con la parte ventral y el metasoma más pálidos, excepto las quillas por su coloración más oscura, con pedipalpos escasamente pilosos, sin cerdas notables sobre la pinza, peines con 24 a 28 dientes, metasoma: con cuatro pares de macrocerdas ventrolaterales; telson con la vesícula globosa; tubérculo subaculear pequeño, ligeramente separado de la base del aguijón (Armas *et al.*, 2012).

3.2. Distribución geográfica en Colombia y clasificación taxonómica de *C. margaritatus*

Colombia tiene 5 géneros de escorpiones: *Ananteris* (13 sp.), *Microtityus* (2 sp.), *Rhopalurus* (1 sp.), *Tityus* (30 sp.) y *Centruroides* (4 sp.), pertenecientes a la familia *Buthidae*, la cual contiene los géneros que representan un riesgo para la salud humana en Colombia como lo son: *Centruroides* con cuatro especies (*C. gracilis*, *C. danieli*, *C. edwardsiie* y *C. margaritatus*) que se distribuyen en la región del Caribe y en los Bosques secos de los valles andinos de los ríos Magdalena y Cauca (figura 2), sin embargo, se considera que algunas especies tienen mayor importancia médica debido a la frecuencia de accidentes y a sus hábitos sinantrópicos en áreas densamente pobladas, en lugar de la toxicidad de sus venenos (Guerrero-vargas *et al.*, 2013; Barona *et al.*, 2004). Para *C. margaritatus* restringieron la distribución geográfica al noroeste de Sudamérica; noroeste de Perú, Ecuador y suroeste de

Colombia (Valle del Cauca, Cauca y Nariño), también introducida en Cuba y Jamaica (Armas *et al.*, 2012).

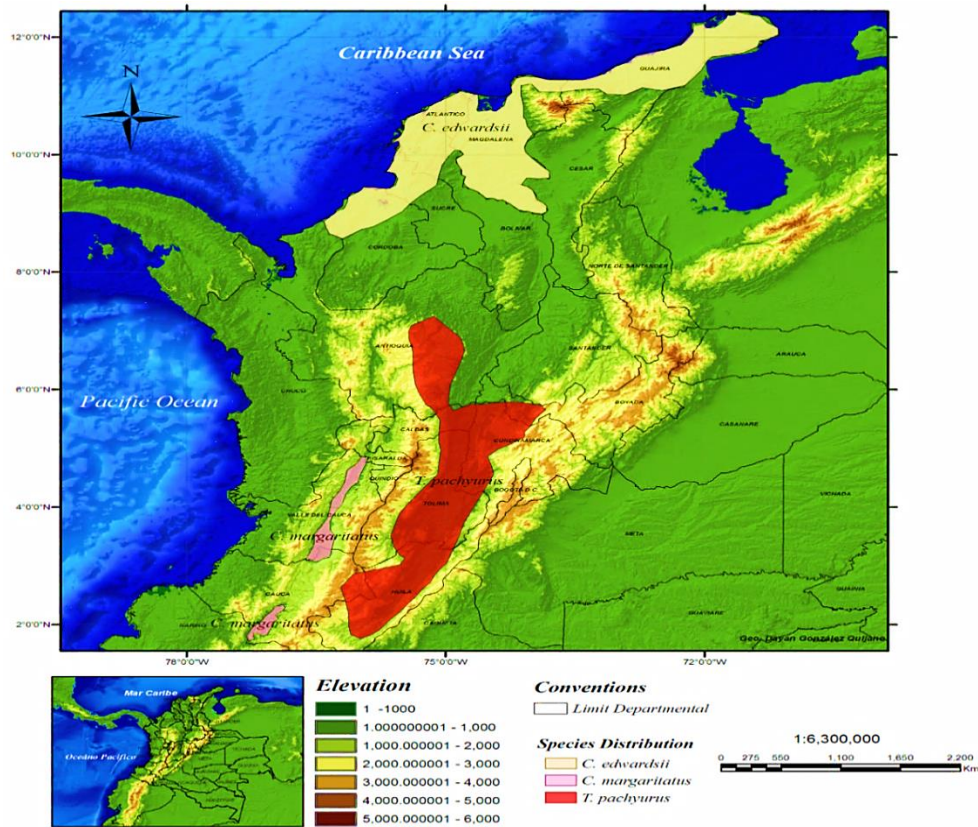


Figura 2. Distribución geográfica y altitudinal de *C. edwardsii*, *C. margaritatus* (en rosado) y *T. pachyurus* en Colombia. Tomado de Guerrero-Vargas *et al.*, (2013).

Clasificación Taxonómica	
Reino:	Animalia
Subphylum:	Chelicerata
Filo:	Arthropoda
Clase:	Arachnida
Orden:	Scorpiones
Familia:	<i>Buthidae</i>
Género:	<i>Centruroides</i>
Especie:	<i>Centruroides margaritatus</i>

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *C. margaritatus* (Gervais, 1841)

3.3. Escorpionismo

El escorpionismo es un cuadro clínico causado por una picadura de escorpión. En América Latina, el escorpionismo ocurre desde Norteamérica a Centroamérica con un elevado número de casos en países como México, Panamá y en Sudamérica

como Colombia, Venezuela, Argentina y Brasil (Roodt, 2015). Las especies del género *Centruroides* presentan un alto grado de toxicidad en sus venenos, plasticidad ecológica, gran capacidad reproductora y una amplia distribución, convertidas en especies oportunistas, potencialmente peligrosas para el hombre (Gómez y Otero, 2007).

A partir de 2008 Colombia aparece en la lista global de países afectados por el escorpionismo severo (Chippaux y Goyffon, 2008). Barona *et al.* (2004), expone que en Colombia algunas de las especies son de importancia médica y representan un riesgo para la salud humana, entre ellas *Centruroides* y *Tityus* pertenecientes a la familia *Buthidae*, distribuidos en Bosques secos de los valles andinos, en los ríos Magdalena, Cauca, y en la región Caribe, con una mayor frecuencia de accidentes en áreas densamente pobladas.

En un reconocimiento parcial de estadísticas nacionales acerca de la accidentalidad por animales venenosos en Colombia entre 2006 y 2010, se reportó 1.783 casos de los cuales el 25% pertenecen a los escorpiones, con mayor incidencia en Antioquia, Valle del Cauca, Cundinamarca, Cauca, Tolima, entre otros; siendo el escorpionismo el segundo accidente más frecuente después de la mordedura de la serpiente en Colombia (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2012), los casos de escorpionismo en estas regiones muestran que la población con mayor riesgo de envenenamiento sistémico son los niños menores de 10 años reportando a *Tityus* y *Centruroides* como los principales responsables de envenenamientos (Gómez *et al.*, 2002; Bolívar, 2015).

Los diversos grados de riesgos causados en el accidente escorpiónico dependen de una serie de factores como: la especie, la agresividad (que puede conducir a una serie de picaduras simultáneas), la capacidad de producción de veneno en su glándula, la edad, el peso, la respuesta individual de la víctima, la cantidad y la concentración del veneno inyectado (Chippaux y Goyffon, 2008). Adicionalmente el escorpionismo se clasifica en cuatro categorías según su sintomatología (tabla 2).

Manifestaciones locales	Manifestaciones sistémicas leves	Manifestaciones sistémicas moderadas	Manifestaciones sistémicas severas
Parestesias Dolor localizado Sudoración	Cefalea Nauseas Palidez	Confusión Ansiedad	Arritmias ventriculares Hipotensión Bradycardia Colapso cardiovascular
Equimosis local Eritema Hiperestesia	Salivación escasa Emesis aislada Rinorrea	Incoordinación Diarrea Diafonías Mioclonias	Insuficiencia respiratoria Edema pulmonar Ataxia
Sensación de quemadura Erupción bulbosa	Sudoración Odinofagia Fasciculaciones locales	Broncoespasmo Priapismo Emesis recurrente	Compromiso neurológico (coma) Pancreatitis Status convulsivo

Tabla 2. Clasificación clínica del accidente escorpiónico en Colombia. Tomado de Guerrero-Vargas *et al.*, (2013).

3.4. Veneno de escorpiones

En países de América como Brasil, México y Venezuela, además países como Arabia, Israel, África, entre países europeos y del medio oriente, se han llevado a cabo diferentes investigaciones relacionadas con efectos clínicos, venómica y proteómica de las especies escorpiónicas de mayor letalidad. El veneno escorpionico es una mezcla compuesta por gran cantidad de péptidos básicos que contiene diferentes tipos de neurotoxinas de bajo peso molecular, poseen niveles bajos de actividad enzimática y diferentes sustancias orgánicas como lípidos, carbohidratos, nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos libres e inorgánicas como diversos iones producidos para depredación, digestión y la protección (Sitprija y Sitprija, 2012; Gwee *et al.*, 2002)

El veneno de los escorpiones de la familia *Buthidae* son excelentes modelos para los estudios de la relación de estructura y función de proteínas, que a la vez intervienen en el funcionamiento de canales iónicos dependientes de voltaje presentes en las células de diferentes tejidos. Todas estas toxinas producen una perturbación severa de los procesos de excitación y conducción del impulso nervioso, además de alterar los procesos neuroquímicos induciendo una liberación desorganizada de neurotransmisores como la acetilcolina, adrenalina y óxido nítrico (Saldarriaga y Otero, 2000; Roodt, 2015; Guerrero-vargas *et al.*, 2013). De manera general, el veneno de la especie *C. margaritatus* del Valle del Patía, se ha catalogado como

neurotóxico, con la dosis letal 50 (DL₅₀) de 42,83 mg/k, que permitió considerarlo un veneno moderadamente tóxico (Guerrero-vargas, 2002). El veneno de *C. margaritatus* está compuesto en un 54% de toxinas de cadena corta que son bloqueadores de los canales de K⁺; 13% de toxinas de cadena larga, que son modeladoras de los canales de Na⁺ y un 33% péptidos más pequeños raramente descritos, además dos nuevos caracterizados químicamente como: margatoxina 2 (MgTx2) y margatoxina 3 (MgTx3) (Guerrero-Vargas, 2008).

3.5 La presión arterial media

La presión arterial promedio durante un ciclo cardíaco se denomina presión arterial media (PAM), representa la fuerza de conducción del flujo sanguíneo a través de la cisterna cardiovascular, que es el punto más elevado de la aorta, teniendo en cuenta que la sangre viaja a través del sistema circulatorio. La presión sistólica aumenta y la presión diastólica disminuye con una declinación generando la PAM. En cuanto a la importancia de la PAM esta reside en la aplicación que tiene este dato, en la interpretación de un episodio de Hipotensión arterial (Coranguez Reyes, 2010).

La presión arterial (PA) puede ser definida como la fuerza ejercida por la sangre sobre la pared de las arterias, el valor máximo de esta, se alcanza durante el periodo de expulsión sistólica y el mínimo al final del periodo de diastólico. De ahí, que al valor de P máxima se le denomine Presión sistólica (PS) y al valor mínimo presión diastólica (PD). La diferencia numérica entre los valores de la PS y PD constituye la presión de pulso o presión diferencial, y la presión arterial media (PAM) es la media aritmética de los valores de las presiones sistólica y diastólica. La presión arterial media funcional es mucho más difícil de determinar debido a la diferente duración de los periodos de sístole y diástole. Esta presión determina el grado de irrigación de los tejidos y puede estimarse con una aproximación aceptable por medio de la fórmula: $PAM = Ps + 2/3 Pd$ (Rinaldi y De la Serna, 2015).

3.6 Electrolitos Ca⁺⁺, Na⁺, K⁺

Los electrolitos son minerales necesarios para el desarrollo de determinadas funciones de las células que contienen partículas con carga positiva o negativa

(iones), cada electrolito está distribuido de forma diferente en el cuerpo; en las células (intracelulares) o en el flujo sanguíneo (extracelulares) (Arronte, 2013).

El potasio (K^+) se encuentra en el cuerpo humano dentro de las células (intracelular), y solo una pequeña fracción en el flujo sanguíneo fuera de las células, el potasio es importante para la función eléctrica de todas las células del cuerpo, y especialmente para las células musculares y nerviosas, que dependen para su función de un valor normal de potasio. En cuanto al sodio es uno de los minerales necesarios en el cuerpo en grandes cantidades, su contenido en la sangre influye en la cantidad de líquido en la circulación sanguínea (Gimenéz, 2015). Los iones sodio (Na^+) y potasio (K^+) junto con los de cloruros y el bicarbonato constituyentes de los líquidos corporales juegan un papel muy significativo en el mantenimiento normal de la distribución del agua entre las células, el plasma y el líquido intersticial, otro papel importante del Na y el K es permitir un ambiente favorable para la contracción muscular normal (Arronte, 2013).

El calcio desempeña un papel en la contracción muscular, la coagulación de la sangre, la liberación de hormonas y el control de la actividad de las enzimas (compuestos que regulan el metabolismo), también afecta la permeabilidad de las paredes celulares, por lo que una deficiencia de este electrolito favorece los calambres, mientras que un nivel mucho mayor de calcio causa síntomas graves como alteraciones del ritmo cardiaco o puede afectar la actividad cerebral (Gimenéz, 2015).

3.5. Fisiología de la contracción del músculo liso

El tejido muscular liso o visceral está formado por haces o fascículos de fibras musculares rodeadas por vainas de tejido conectivo, con inervación a cargo del sistema nervioso autónomo (por lo que la contracción es involuntaria), el cual produce constricción de los vasos sanguíneos, de las vías respiratorias, tubo digestivo y la vejiga. Los tipos de músculo liso son: el multiunitario que se ejerce principalmente por señales nerviosas y el músculo liso unitario ejercido por estímulos no nerviosos, donde el flujo iónico simple sin potenciales de acción pueden viajar

desde una fibra a otra y hacer que se contraigan simultáneamente (Whyton y Hall, 2006).

La contracción del músculo liso es regulado por actina y miosina que interactúan entre sí en el proceso de contracción del músculo liso por un aumento de los iones de calcio en medio intracelular, el cual puede estar producido por la estimulación nerviosa de fibras de músculo liso, estimulación hormonal, distensión de la fibra o incluso cambios en el ambiente químico de la fibra, sin embargo, el músculo liso no contiene Troponina, por lo que la contracción del músculo liso es activada por la combinación de los iones de calcio con la Calmodulina (Kierszenbaum, 2011) figura 3.

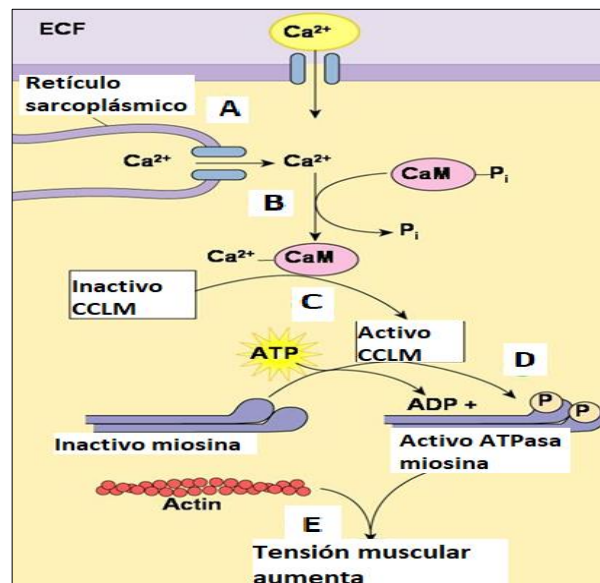


Figura 3. Esquema de contracción en músculo liso: aumento de Ca^{++} citosólico es la señal para la contracción: A aumento intracelular de Ca^{++} y liberación del retículo sarcoplásmico. B: Ca^{++} se une a Calmodulina (CaM). C: Ca^{++} más calmodulina activan la cinasa de cadenas ligeras (CCLM). D: CCLM fosforila las cadenas ligeras de las cabezas de miosina y aumenta actividad de la miosina ATPasa. E: los puentes cruzados de miosina activos se deslizan a lo largo de la actina generan tensión muscular (Chicharro y Mojares, 2008).

3.6. Receptores muscarínicos

Farmacológicamente, los receptores colinérgicos se subdividen en muscarínicos y nicotínicos al obtener respuesta de ciertos agonistas y antagonistas colinérgicos, anatómicamente los receptores muscarínicos se encuentran en los efectores autonómicos con inervación parasimpática como: músculo liso, corazón y glándulas (Rothlin, 2003). Los receptores muscarínicos se encuentran acoplados con proteínas G, que pueden ejercer gran variedad de acciones intracelulares, según el tipo de proteína G a la que se encuentren acoplados. Estos receptores incluyen respuestas rápidas o lentas, con activación/inhibición de diversas vías de mensajeros intracelulares o segundos mensajeros, donde las cuatro vías principales están mediadas por AMP cíclico, GMP cíclico, iones Ca^{++} y por productos de la hidrólisis de fosfato de fosfatidilinositol (Flores y Segura, 2005).

3.7 Endotelio

Es la capa celular de los vasos sanguíneos y el corazón entre la sangre y el resto de los tejidos, producen y liberan sustancias activas que actúan como mensajeros, responde a estímulos de sustancias químicas, estímulos mecánicos como los cambios de la presión arterial y distensión de las paredes, controla el paso de los solutos y algunas células sanguíneas, regulando el tono vascular liberando sustancias tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras que mantienen un permanente equilibrio del tono vascular y un flujo normal en los vasos (Coloccini, 2003; Duboscq, 2017).

3.7.1. Fisiología del Endotelio

En el tono vascular, el endotelio detecta los cambios tanto de presión como de tensión de la pared del vaso así como también estímulos que provocan las sustancias vasoactivas circulantes liberadas por las plaquetas y leucocitos y el *shear stress* respondiendo con la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas (tabla 3) (Coloccini, 2003; Duboscq, 2017).

Vasodilatadoras	Vasoconstrictoras
-----------------	-------------------

Óxido Nítrico (ON)	Angiotensina II (A II) de acción constrictora directa e indirecta a través del estímulo para la liberación de la Endotelina (ET-1)
Bradicinina	
Prostaciclina	Tromboxano A2 que es un metabolito del ácido araquidónico
Factor Hiperpolarizante derivado del Endotelio (EDHF) a través de cambios en la polarización de la membrana	Prostaglandina H2

Tabla 3: Principales sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras del endotelio.

3.7.2 Seratrodast e Indometacina

Son agentes antiinflamatorios no esteroideos, que además de las acciones antiinflamatorias, tienen acciones analgésicas, antipiréticas e inhibidoras de plaquetas. Actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de ciclooxigenasa, que convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, precursores de las prostaglandina (Rojas, 2005). La inhibición de la síntesis de prostaglandinas explica sus acciones analgésicas, antipiréticas e inhibidoras de plaquetas, otros mecanismos pueden contribuir a sus efectos antiinflamatorios. Seratrodast es un antagonista del receptor de tromboxano A2 (TXA2) y el mecanismo de acción de la indometacina es como un inhibidor de la ciclooxigenasa (bloquea COX 1 y COX 2) (Base de datos PubChem).

3.7.3. L-name

Enzima Inhibidora de compuestos o agentes que se combinan con una enzima de tal manera que impiden la combinación sustrato-enzima normal y la reacción catalítica. El éster metílico de Nomega-Nitro-L-arginina (L-name) es un inhibidor no selectivo del óxido nítrico sintasa. (Base de datos PubChem).

3.7.4. Prazosina

Es un antagonista adrenérgico alfa-1 selectivo utilizado en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca; hipertensión; enfermedad de raynaud; hipertrofia prostática; y retención urinaria. (Base de datos PubChem). La prazosina no activa la liberación de norepinefrina, causa vasodilatación periférica debido a la inhibición selectiva y competitiva de los receptores adrenérgicos alfa 1 postsinápticos vasculares, reduciendo así la resistencia y la presión arterial vascular periférica (Administración Nacional de Medicamentos, 2015)

4. ANTECEDENTES

Se consultaron bases de datos como Science Direct, Scopus, EBSCO, Google Academic, biblioteca y hemeroteca de la Universidad del Cauca. De los documentos encontrados referentes a venenos de escorpiones, se eligieron los que se asocian a efectos hemodinámicos, vasculares y cardiotoxicos, a partir de estos se presentan los más relacionados a esta investigación.

Estudios que involucran otras especies del género *Centruroides*, han investigado en el desarrollo de posibles tratamientos anticancerígenos como antimicrobianos, a partir de algunos de los compuestos activos del veneno (García *et al.*, 2003). Además se ha caracterizado toxinas como la margaratoxina (Mtx) que tiene un efecto bloqueador de los canales de kv.1 3 de potasio que están implicados por ejemplo, en la proliferación inducida por VEGF (factor de crecimiento endotelial) donde el efecto hiperpolarizante de este, es reducido significativamente por Mtx al bloquear los canales de K⁺ demostrando gran afinidad de esta toxina con el VEGF (Erdogan *et al.*, 2005). También tiene efecto bloqueador de los canales de K⁺ en la relajación inducida por Epicatequina quien actúa en vaso sanguíneo (efecto independiente de endotelio) donde la Mtx bloquea la acción de la epicatequina que pueden estar implicados los canales kv1.3 (Marinko *et al.*, 2018).

Los trabajos de investigación realizados con el escorpión *C. margaritatus* se han enfocado en estudiar la composición de su veneno y el grado de toxicidad en diferentes líneas celulares, actualmente se llevan a cabo un gran número de investigaciones con canales iónicos dependiente de voltaje. Marinkelle CJ. (1965), realizó uno de los primeros trabajos de escorpionismo con el veneno de la especie *C. margaritatus* de la ciudad Cali en el suroeste colombiano en esta investigación se encontraron que los síntomas más comunes e importantes en 31 pacientes envenenados fueron dolor, edema local y fiebre, 1-20 horas después de la picadura hubo hiperventilación intensa y salivación moderada, además determinaron la DL₅₀ del veneno la cual fue de 59,9 mg / kg. Una de las primeras investigaciones realizadas con este veneno fue llevada a cabo por García-Calvo *et al.*, (1993), con la purificación, caracterización y la biosíntesis de la margaratoxina (MgTx), un péptido de

39 residuos de aminoácidos, que inhibe selectivamente canales de potasio dependientes de voltaje.

Años más tarde Guerrero-Vargas (2002), con la especie *C. margaritatus* del Valle del Patía aportó conocimientos importantes en el aislamiento, purificación y evaluación de neurotoxinas de esta especie (con 52 toxinas diferentes) y en la determinación de la DL₅₀ (42,83 mg/kg). Con efectos neurotóxicos, que permiten considerarlo como un veneno moderadamente tóxico.

Este mismo autor en el año 2006, encontró que la especie *C. margaritatus* es capaz de producir accidentes moderados y graves complicaciones en los seres humanos, reitera que los venenos de escorpión son una mezcla compleja de péptidos que ejercen su acción a través de la modulación de canales iónicos en membranas biológicas. Luego en el 2008, llevó a cabo la caracterización proteómica del veneno de *C. margaritatus* donde se muestra que el 54% son toxinas de cadena corta (2,5 a 6,0 kDa) son bloqueadores de los canales de K⁺; 13% de toxinas de cadena larga (6,5 a 8,0 kDa), que son moduladoras voltaje dependientes de sodio y el 33% de los componentes presentes en veneno son péptidos más pequeños (2,0 kDa) raramente descritos. De los 91 componentes de masa molecular distintas, fueron aislados y caracterizados dos nuevos péptidos, la margatoxina 2 (MgTx2) y margatoxina 3 (MgTx3) (Guerrero-Vargas, 2008).

Dueñas (2009), evalúa el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del VCCm *in-vivo*, identificando el efecto neurotóxico y cambios en los canales iónicos dependientes de calcio, así como la inducción de rupturas en el ADN.

En el Perú, se aisló y caracterizó parcialmente un péptido con actividad antibacteriana del veneno del escorpión de *C. margaritatus*, que mostró ser el péptido que representa aproximadamente el 3% (con un peso molecular de 7,3 kDa) composición proteica total del veneno (Rivera *et al.*, 2010). Además, en otro estudio se evaluó el efecto renal, generado por el veneno del escorpión *C. margaritatus* en riñón aislado de ratas y la citotoxicidad en células MDCK (Galíndez-Cerón, 2014). También se ha realizado el aislamiento y caracterización de componentes citotóxicos (fracciones F24, F30 e F31), citolíticos sobre la bacteria patogénica Gram-negativa

K. pneumoniae y Gram-positiva *S. aureus* con efecto inhibitorio aunque es nula la actividad citolítica en los eritrocitos humanos y neurotóxicos presentes en el veneno de *C. margaritatus* (Dueñas-Cuellar, 2014)

Hasta el momento no se han llevado estudios que permitan evaluar el efecto vascular generado por el veneno del escorpión *C. margaritatus*. Sin embargo, se han realizado investigaciones con el veneno de escorpiones del género *Tityus*, donde encontraron que el veneno de *Tityus serrulatus*, tiene efectos vasculares como incremento de la presión arterial y de la resistencia vascular periférica con una acción vasoconstrictora directa que afecta el flujo renal (De Sousa *et al.*, 2005). Casos clínicos muestran el aumento de la excreción de catecolaminas, de metabolitos (noradrenalina o norepinefrina) y renina plasmática elevada, siendo además considerable los efectos estimulantes del veneno en el sistema nervioso autónomo (Gueron y Sofer, 1994).

Para otras especies de la familia *Buthidae* se han descrito efectos cardiotoxicos, demostrando que la mayoría de las toxinas tienen un efecto indirecto debido a la liberación de neurotransmisores adrenérgicos y colinérgicos, pero Teixeira y colaboradores en 2001, evidenciaron una acción directa de *T. serrulatus* en corazón aislado de rata, encontraron un aumento en la fuerza contráctil inducido por el veneno debido a que el efecto era directo sobre cardiomiocitos. Para el veneno escorpión con *Androctonus bicolor* con una aplicación directa en el corazón, presenta una caída de la frecuencia cardiaca posiblemente por un efecto directo del veneno independiente de neurotransmisores (Abdel-Rahman *et al.*, 2015).

A nivel vascular se ha encontrado que el efecto del veneno de *Androctonus crassicauda* sobre aorta torácica aislada de conejo, el veneno aumenta la relajación inducida a bajas concentraciones de acetilcolina (ACh) pero en contraste a altas concentraciones de ACh más el veneno, causa vasoconstricción que aumentan en el tejido sin endotelio, lo que indica posiblemente una acción indirecta del veneno sobre el músculo liso al liberar el neurotransmisor de las terminaciones nerviosas adrenérgicas (Tuncer y Onur, 1996)

Efectos del veneno de *C. margaritatus* del Valle del Patía a nivel cardiotóxico y hemodinámico, se han llevado a cabo estudios revisados en la hemeroteca de la Universidad del Cauca, donde se determinan alteraciones provocadas por el veneno total del escorpión *C. margaritatus* en dosis subletales en ratas cepa Wistar, a través de evaluaciones electrocardiográficas, utilizando diferentes dosis, y teniendo como referentes grupo control positivo y negativo (Arenas Belalcazar, 2010). También se ha evaluado la respuesta hemodinámica en rata del veneno total de *C. margaritatus*, en dosis subletales encontrando un efecto hipotensor (Bonilla, 2010).

Finalmente, las propiedades biológicas de las toxinas y sus acciones que aún se desconocen, invitan a desarrollar investigaciones para entender las características filológicas, cardiotóxicas, vasculares y toxinológicas que pueden presentar los venenos de escorpión, haciendo valiosos aportes para diagnóstico, al tratamiento de sus accidentes y el desarrollo de fármacos a partir de toxinas con potencial terapéutico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto vasomotor del veneno total de *C. margaritatus* y su relación con la presión arterial sistémica o los niveles séricos de electrolitos.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar las alteraciones de la Presión Arterial Sistemica causadas por el veneno completo de *C.margaritatus*.
- Evaluar alteraciones en los niveles de electrolitos Sodio, Potasio y Calcio, por el veneno completo de *C. margaritatus*.
- Caracterizar el efecto directo del veneno completo de *C. margaritatus* sobre el tono vascular en anillo aórtico de ratas Wistar.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental con ensayos *in vivo* y *ex vivo* en ratas cepa Wistar. En el sistema *in vivo* se realizaron pruebas séricas cuantificando los niveles de electrolitos Na⁺, K⁺, Ca²⁺) de ratas cepa Wistar, inoculadas por vía intraperitoneal (Vía IP) con dosis sub-letales del veneno completo del escorpión *C. margaritatus* (VCCm) observando el efecto sistémico y la determinación de la presión arterial media (PAM) mediante un método no invasivo. Para los experimentos *ex vivo*, se usó la técnica de baño de órgano aislado para determinar el efecto del VCCm en anillos aórticos.

6.2. Sitio de colecta de individuos y mantenimiento en cautiverio.

Se realizaron 3 colectas en el valle del Patía, vereda guadualitos en el municipio del Patía, Departamento del Cauca, a una altitud de 550 m.s.n.m. Se realizó colecta libre entre las 14:00 y las 18:00 horas (permiso de colecta R 0152 de 02/15/2015 de ANLA, Colombia). Los escorpiones se mantuvieron en terrarios de plástico en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), alimentados con grillos y cucarachas cada 15 días y con agua *ad libitum*, con un tiempo máximo de cautiverio de 7 a 8 meses.

6.3. Obtención del veneno.

El veneno se obtuvo de 80 escorpiones adultos a los cuales se les realizó una extracción cada 25 días durante los meses que permanecieron en cautiverio, el veneno fue extraído por estimulación eléctrica del telson, utilizando un generador de impulsos eléctricos DC Square Wave Stimulator 1999 (824151IS Lafayette instrument company), la técnica fue estandarizada por Guerrero (2002), la cual consiste en introducir el telson del escorpión en un tubo eppendorf, posteriormente, se aplica un impulso eléctrico en el cuarto segmento del abdomen, y de esta manera se recoge gota a gota el veneno (figura. 4) con aspecto lechoso; se limpia el veneno centrifugando a 15.000 rpm a 4°C durante 15 minutos; se liofilizó el sobrenadante en tubos eppendorf de 1,5 ml y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

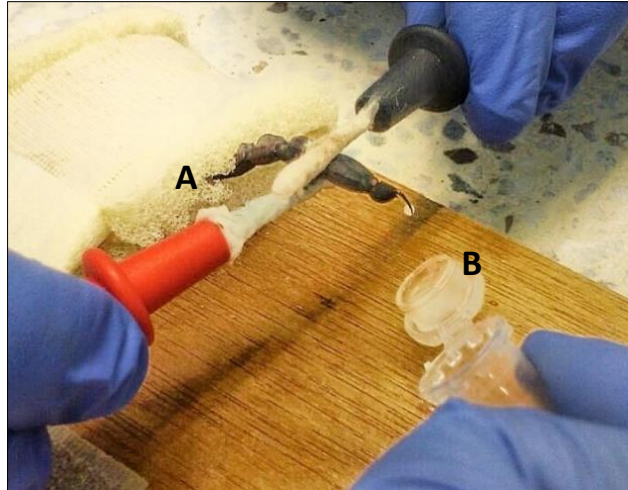


Figura 4. Extracción de veneno de *C. margaritatus* en tubos eppendorf. **A:** electrodos + y – causando el estímulo **B:** gota de veneno. (Fotografía: Mary Bueno, 2018).

6.4. Modelos experimentales

Se utilizaron ratas *Rattus norvegicus* cepa Wistar, machos, de 300 ± 50 g de peso. Criados bajo las siguientes condiciones: en cajas de polipropileno a una temperatura de 22 ± 2 °C, con alimento especial *rodent diet* y agua *ad libitum* en Biotério de la Universidad del Cauca-CIBUC. El uso de los individuos experimentales se realizó siguiendo las normas y requerimientos bioéticos del Ministerio de Salud Nacional como lo estipula la resolución 008430 de 1993. Aprobado el aval por el Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad del Cauca, mediante el acta N° 9 del día 14/12/2016 (ID 4681).

6.5. Medición de la presión arterial (PA)

Se seleccionó al azar un grupo de 5 ratas macho, normotensas, de 3 meses de edad. Cada individuo fue anestesiado con Pentobarbital Sódico (Penthal, Invet, S.A.) dosis 60mg/kg (vía I.P). Una vez comprobada la sedación, se procedió a colocar en la cola del animal un tensiómetro acoplado al transductor piezoeléctrico, conectado a un amplificador de pulsos y un escáner. Los datos del amplificador se enviaron a un equipo de adquisición de datos (MP100 data acquisition System-BIOPAC, figura 5) y analizados con el software Acknowledge 4.1 BIOPAC. Este Software arrojó los datos de presión sistólica y diastólica para hallar la PAM. Los registros se realizaron con la

ayuda de un equipo de tensión arterial no invasivo (IITC six chanel NIBP). Para cada modelo experimental, se le realizaron 7 registros en diferentes tiempos durante 90 minutos; el primer registro fue el control interno (primeros 30'), posteriormente se inoculó el veneno (80% de la DL_{50}) y se realizaron los siguientes 6 registros ($t_1=10'$, $t_2=20'$, $t_3=30'$, $t=40'$, $t=50'$, $t=60'$) cada 10' en los 60 minutos restantes.

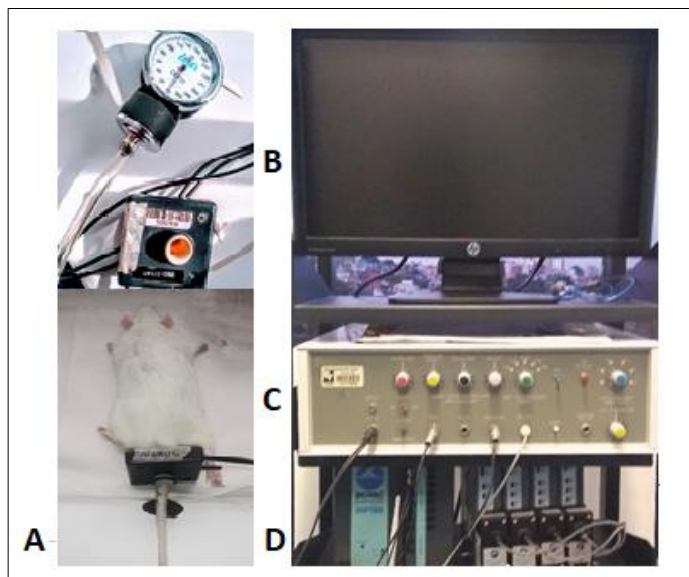


Figura 5. Equipo para medición de presión arterial no invasiva. A: Tensiómetro de cola. B: Computador. C: Amplificador. D: Transductor Piezoeléctrico. (Fotografía: Margarita Romero 2018).

6.6. Niveles de electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{++})

Las ratas fueron distribuidas al azar en 5 grupos experimentales ($n=4$), para cinco repeticiones. Un individuo del grupo fue inyectado, vía IP, con solución salina 0.9% como control y los otros tres (vía IP) con dosis de veneno $DL_{10} = 20\%$, $DL_{20} = 40\%$, $DL_{40} = 80\%$ de la DL_{50} respectivamente. Las dosis se establecieron a partir de la DL_{50} (42,83 mg/k) determinada previamente por Guerrero-Vargas (2002).

Una hora posterior a la inoculación del veneno, cada rata fue sedada con pentobarbital sódico (Penthal, Invet, S.A) en dosis de 60mg/kg vía IP. verificada la sedación (el animal pierde la conciencia y no hay movimientos), se realizó incisión torácica longitudinal media hasta ubicar la vena cava ascendente, de la cual se

extrajo sangre usando un Jelco calibre 20G, la sangre fue almacenada en un tubo Microtainer tapa amarilla con gel separador (microtainer IMPROMINI, tapa amarilla Gel and clot activator 0,5 ml) se dejó reposar por 15 minutos, luego se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm con una temperatura de 15 °C para separar el suero y el contenido celular.

El análisis de los niveles de sodio y potasio a través del método electrodo ion selectivo (indirecto) y calcio mediante el método colorímetro (química líquida), estos datos fueron obtenidos mediante un analizador de analitos ARCHITECT ci 8200 en el Laboratorio Dinámica.

6.7. Obtención del anillo aórtico

Se seleccionaron al azar un grupo experimental (n=11) de ratas macho Wistar, de donde se extrajeron los anillos aórticos. Se preparó la solución de Krebs-Henseleit (pH 7,4) con la siguiente composición (mM): NaCl 118,0, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25,0, glucosa 11,1 a 37 °C con 95% de O₂ y 5% de CO₂. Luego los individuos fueron anestesiados con Tiopental (30 mg/kg, por vía IP.) (Gomez De Segura, 2012), y eutanasiados por contusión cervical, rápidamente se realizó una incisión preesternal en la cavidad torácica, se aisló la aorta torácica y se sumergió en la solución de Krebs-Henseleit a temperatura ambiente, se eliminó la túnica adventicia que es la capa de tejido conectivo periaórtico de los vasos sanguíneos. Posteriormente se seccionaron las aortas en anillos de 3 a 4 mm de longitud; de cada aorta se obtuvieron 5 a 7 anillos, a cada fragmento cortado se le colocaron 2 piezas de alambre de acero triangulares para suspender en la cámara de baño de órganos con 10 ml de solución de Krebs-Henseleit (figura 7).

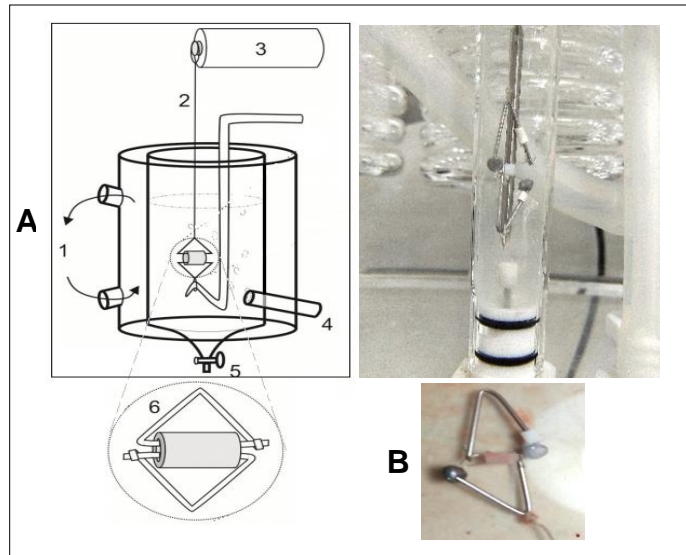


Figura 7. Aorta montada en el baño de órganos. **A:** Cámara de órganos (modificado de Batista-Lima); **1** Circulación de agua destilada (37°C); **2** Hilo; **3** Transductor de fuerza; **4** entrada de oxígeno; **5** Descarte. Fuente: Modificado de Batista-Lima. **B:** Anillo de aorta en alambres de acero triangulares. (Fotografía: Margarita Romero 2018).

6.8. Anillo aórtico

Se realizaron curvas de concentración, usando 6 anillos como mínimo pertenecientes a tres ratas distintas para cada una de las curvas de los diferentes tratamientos vasoactivos. En el primer tratamiento se realizaron curvas de concentración - respuesta con Veneno de *C. margaritatus* en; contracción. En el segundo tratamiento se realizaron curvas del VCCm mas los factores vasoactivos dependientes de endotelio con lo son los reactivos: L-name e indometacina, Seratrodast, Prazocina (en contracción); donde los anillos fueron incubados previamente por 20 minutos con los reactivos antes de realizar la curva de veneno. Por último en el tercer tratamiento se realizaron curvas en: contracción con Cloruro de potasio (KCl), agonista del receptor de tromboxano A₂ (U-46619), Fenilefrina (Fe) y relajación con Carbacol (Cch); donde los anillos fueron incubados previamente con VCCm para evaluar efecto bloqueante del veneno *C. margaritatus*.

6.8.1 Baño de órgano aislado

Para determinar la actividad vasoactiva directa del VCCm se utilizó el sistema de baño de órganos Panlab asociados a AD Instruments que trabajan con los sistemas

de software Powerlab y LABChart y que brindan opciones avanzadas de informes de datos (Panlab / Harvard Apparatus) (figura 6), obteniendo registros de las alteraciones en el diámetro de la luz vascular que promueven contracción (estrechamiento de la luz vascular) o relajamiento (aumento da luz vascular) del anillo aórtico.

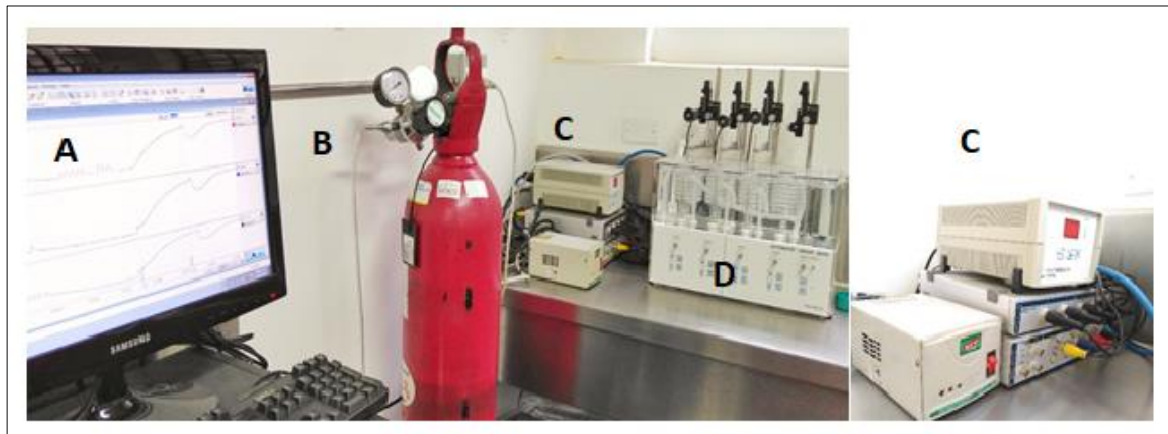


Figura 6. Partes del equipo de baño de órgano aislado. **A:** Computador **B:** 95% O₂, 5% CO₂ **C:** Transductor, amplificador, termostato (37°C) **D:** Baño de órganos y cámara de órganos. (Fotografía: Margarita Romero 2018).

Los anillos fueron sometidos a una tensión basal de 2 g, esta tensión se registró usando un transductor de fuerza isométrica (ML870B60/CV, AD Instruments) conectado a un sistema de adquisición de datos digital (PowerLab™ 8/30, AD Instruments) (figura 6). Después de un periodo de acondicionamiento de los anillos de al menos 60 minutos, se indujeron contracciones control con Cloruro de Potasio (KCl) (40 mM), si el anillo supera los 0,5 g de incremento de tensión, se considera apto para el experimento. Después de lavar el sistema y adicionar nuevamente solución de Krebs-Henseleit se agrega Felinefrina (Fe) (30ul $[3e^{-7}M]$) y transcurridos 10 minutos se agrega Carbacol (Cch) (100ul $[1e^{-3}M]$), para evidenciar que el tejido endotelial, responde a la estimulación vasoconstrictora y vasodilatadora respectivamente; comprobando el estado funcional de cada anillo (figura 8. A) y se repite el procedimiento al trabajar con un nuevo anillo, para posteriormente realizar

cada uno de los diferentes tratamientos con el veneno de *C. margaritatus* (figura 8. B).

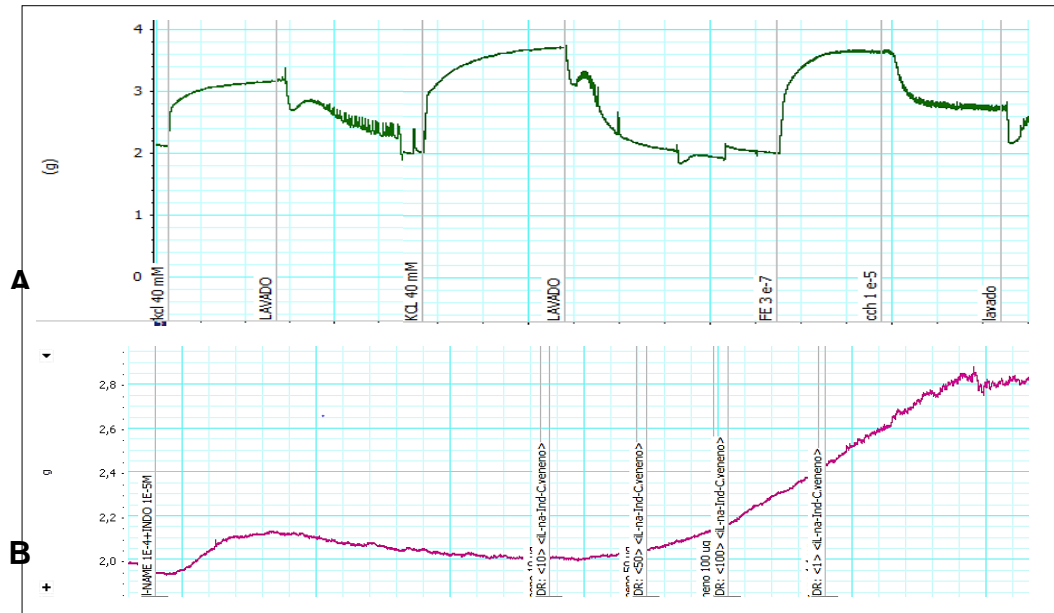


Figura 8. Registro de datos del tratamiento y respuesta del fragmento de aorta en una cámara de órganos. **A:** Proceso de acondicionamiento del anillo para el experimento **B:** Curva de veneno en anillos aórticos previamente incubados por 20 minutos con L-name e Indometacina.

Para determinar el efecto del veneno sobre el tono vascular en aorta de rata, se realizaron curvas de concentración del VCCm exponiendo el anillo aórtico a dosis acumulativas desde 10µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, hasta completar 600µg de veneno en la cámara de órganos, cada dosis se dejó en exposición por un intervalo de 10 minutos antes de adicionar la siguiente dosis. Las curvas de veneno se realizaron en anillos aórticos íntegros (con endotelio), anillos lesionados de endotelio (sin endotelio) y anillos expuestos a los reactivos L-name e Indometacina con el fin de saturar las vías de vasodilatación del endotelio, estos últimos fueron incubados por 20 minutos antes de realizar la curva de veneno y tomar su registro (figura 8. B).

Para precisar si el efecto del veneno sobre el tono vascular en aorta de rata es dependiente o independiente de endotelio, se bloquearon las vías endoteliales

incubando los anillos durante 20' con los reactivos: L-name e Indumetacina + Seratrodast para un tratamiento y L-name e Indumetacina + Prazocina para el otro tratamiento, posteriormente realizó la curva de veneno después de la incubación y se tomó el registro del efecto del veneno en el músculo liso vascular.

Por último se incubaron los anillos con veneno a una concentración de 500µg durante 20', luego se realizaron curvas acumulativas de concentración de los siguientes reactivos: KCl, U-46 619 y Fe para encontrar un efecto del veneno a una respuesta vascular a agonistas contráctiles y vasorelajantes con Carbacol (Cch).

6.9. Análisis estadístico

Para las pruebas *in vivo* y *ex vivo* se realizó un diseño aleatorio, se usó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar normalidad y el test de Levene para homogeneidad de varianzas; los contrastes de hipótesis se realizaron utilizando ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey. El nivel de significancia se estableció como $P < 0,05$. Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism 5.0®.

7. RESULTADOS

7.1.0. Síntomas presentados en los modelos experimentales.

Los síntomas frecuentes durante el proceso experimental de los individuos en este estudio, demostró que el veneno de *C. margaritatus* proyecta su toxicidad principalmente efectos sistémicos como midriasis, exoftalmos, priapismo, ataxia, piloerección, sialorrea y deposiciones líquidas (ver en anexo1).

7.1. Presión arterial (PA)

Los resultados obtenidos de los valores de la PS, PD y PAM se muestran en la tabla 4 expresados como la Media \pm Error estándar, $p < 0.05$, de los valores obtenidos de todos los animales experimentales inoculados con la dosis 80% de la DL₅₀ del VCCm el registro se realizó cada 10 minutos (t1 a t6) post inoculación.

Tabla 4. A. PS, PD, PAM (mmHg) y grupo control, tratados con VCCm en los diferentes tiempos de observación (n=5) a una concentración del 80% de la DL50.

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6	p
PS (mmHg)	103,7 \pm 1,5	111,8 \pm 9,5	104,6 \pm 7,1	99,8 \pm 6,5	105,2 \pm 8,6	108, \pm 6,3	102,8 \pm 8,1	< 0,94
PD (mmHg)	79 \pm 1,0	76,8 \pm 7,6	67,2 \pm 6,2	76 \pm 9	105,2 \pm 8,6	72,8 \pm 6,6	69,2 \pm 6,6	< 0,013*
PAM (mmHg)	87,2 \pm 1,1	86,1 \pm 7,4	67,2 \pm 6,2	78 \pm 6,2	85,7 \pm 8,8	84,5 \pm 6,2	80,4 \pm 6,6	< 0,34

ANOVA * Estadísticamente significativo. Media \pm Error estándar.

En los resultados de la PS, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el control y los registros tomados en los tiempos t1- t6, no obstante, en t1 se observa un leve incremento de la PS con un valor de 118 mmHg, luego desciende manteniéndose estable en t2 a t6 (figura 9. A). En cuanto a la PD, al hacer el análisis de comparación múltiple de Tukey's, se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo t4 (105,2 mm Hg) en comparación con t2 (67,2 mm Hg), t5 (72,8 mm Hg) y t6 (69,2 mm Hg). Sin embargo, no presenta diferencias con respecto al control interno (79 mm Hg). Donde t4 es el mayor aumento de PD que se registra y los tres últimos tiempos disminuyen presentando una oscilación de la PD (figura 9. B).

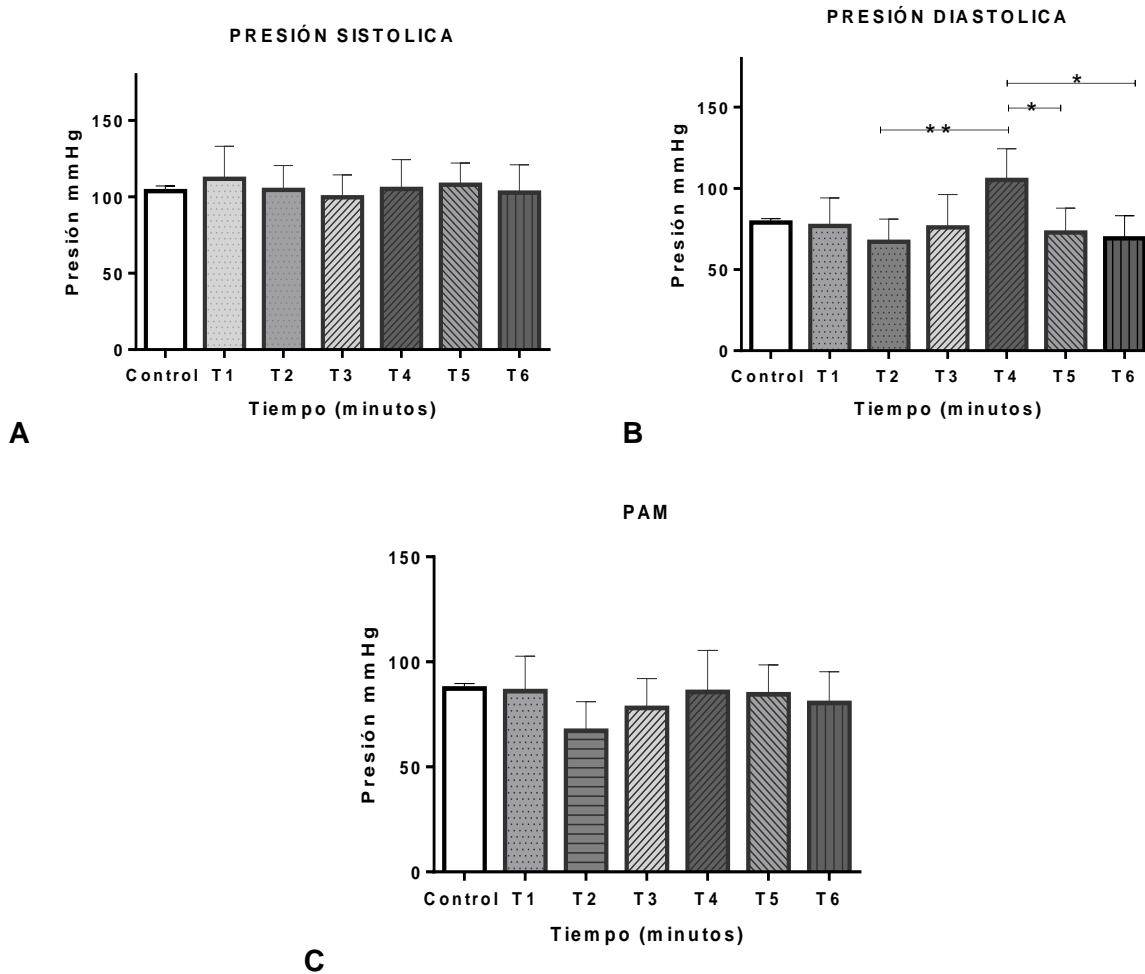


Figura 9. Evaluación de la presión arterial: (A) PS, (B) PD y (C) PAM, del grupo control y cada uno de los grupos tratado con VCCm en los diferentes tiempos de observación (cada 10 min durante 1 hora) (n=5) a una concentración del 80% de la DL₅₀, *P<0,05 **p<0.01

La PAM se calculó $((2PD+PS)/3)$, los resultados reportan que estadísticamente no hay diferencias significativas entre el control y los tiempos t1 a t6, sin embargo se observa una leve oscilación de la PAM, inicialmente disminuye en t2, luego aumenta en t4 y luego tiende a estabilizarse (figura 9. C).

PA presenta un comportamiento oscilatorio (figura 10) aunque estadísticamente no es significativa a excepción de la PD.

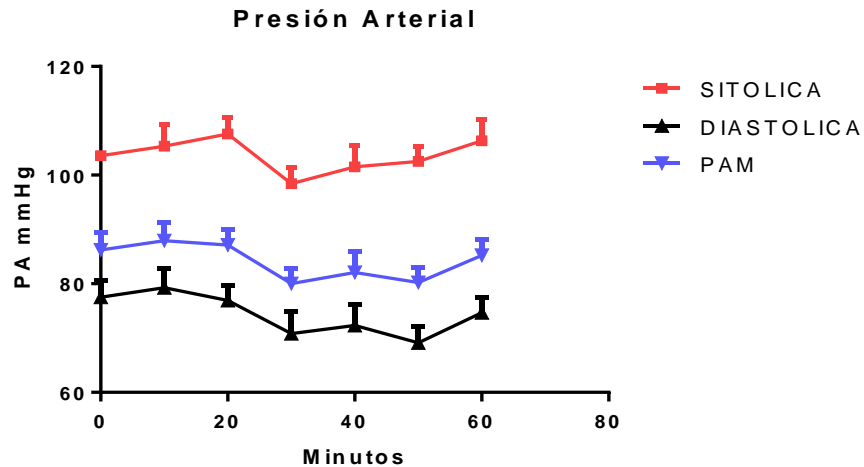


Figura 10. Comportamiento de los valores de las medias de (■) PS, (▲) PD Y (▼) PAM cada 10 minutos durante una hora post inoculación del veneno de *C. margaritatus* (n=5).

7.2. Niveles séricos de electrolitos

Los valores obtenidos de los electrolitos: Na⁺ k⁺ y Ca⁺⁺ se muestran en la tabla 5, expresados como la Media ± Error estándar, p<0.05, de los individuos inoculados con la dosis 20, 40 y 80% de la DL₅₀ del VCCm tras una hora de exposición post inoculación.

Tabla 5. Electrolitos de Na⁺ k⁺ y Ca⁺⁺ (mmol/L) del grupo control y cada uno de los grupos (n=5) tratado con VCCm a diferentes concentraciones del 20, 40 y 80% de la DL₅₀.

	Control	20%	40%	80%	p
Na ⁺ (mmol/L)	139.5 ± 2	140.7±1.48	138.9±1.78	140.4 ±0.63	< 0,84
K ⁺ (mmol/L)	5.1 ± 0.9	5.042 ±0.77	5.7 ± 1.22	6.2 ± 1.33	< 0,86
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	8.74 ± 0.13	8.74 ± 0.14	9 ± 0.15	9.6 ± 0.3	< 0,017*

ANOVA * Estadísticamente significativo. Media ± Error estándar

El análisis estadístico de los resultados al aplicar Anova de una vía se observa que tanto para los niveles séricos de Na⁺ como de K⁺ no se observan diferencias estadísticamente significativas en de los tres tratamientos de veneno con respecto al control (figura 11. A, B), sin embargo, K⁺ tiende a aumentar al incrementar las dosis de veneno (figura 11. B); esto sugiere aumentar el tiempo de exposición de las dosis evaluadas para asegurar que no se genera alteración, de igual manera para Na⁺. En

cuanto al Análisis de comparación múltiple de Tukey's para los electrolitos de Ca^{++} , se observa diferencia estadísticamente significativa entre la dosis del 80% con respecto al control y a las dosis del 20% del VCCm. (figura 11. C).

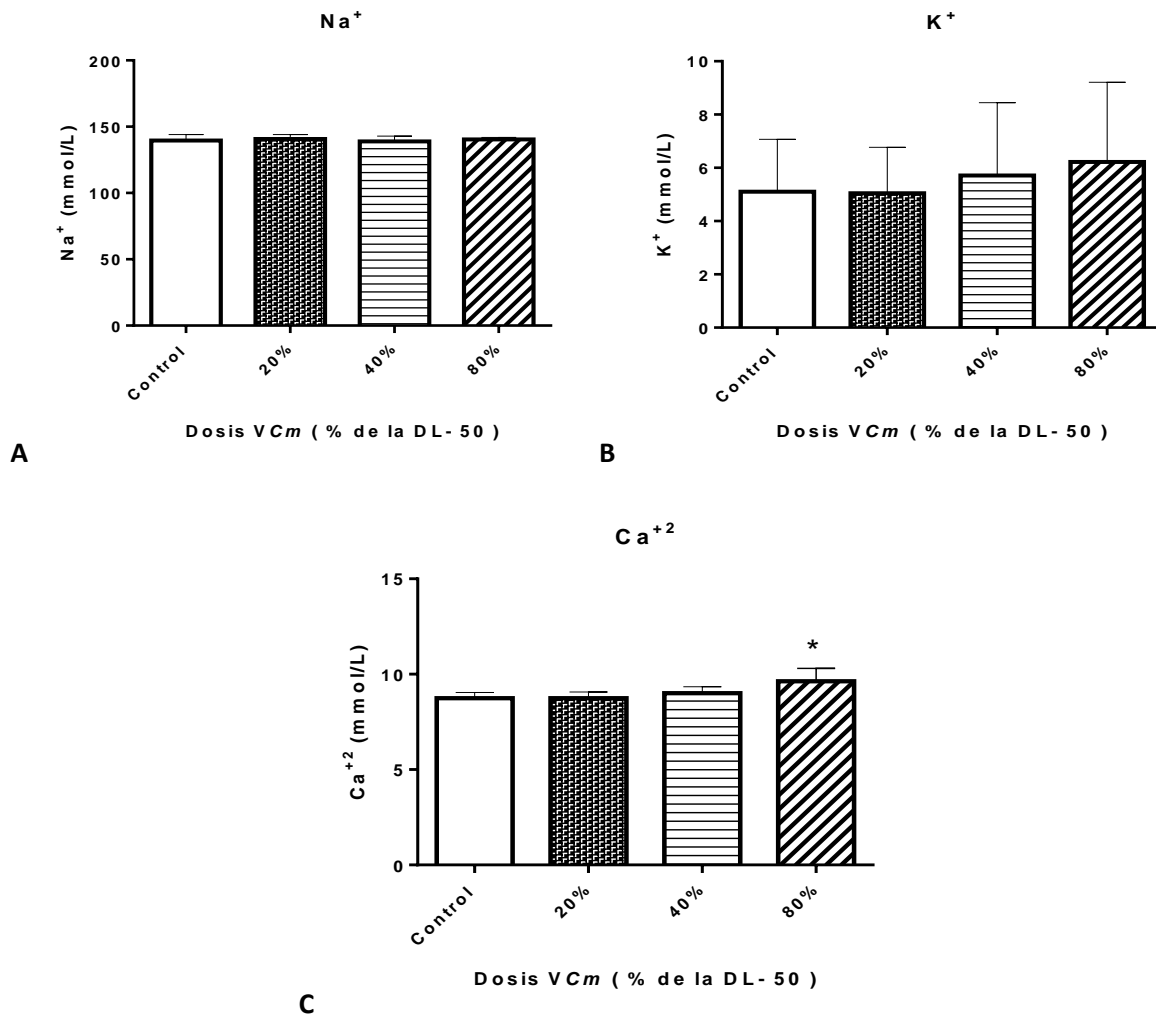


Figura 11. Niveles séricos en suero sanguíneo de Na^+ K^+ y Ca^{++} (mmol/L) del grupo control y cada uno de los grupos ($n=20$) expuestos a tres dosis sub-letales del 20, 40 y 80% de la DL_{50} del VCCm, durante una hora post inoculación. * $p < 0,05$.

7.3. Prueba anillo aórtico

7.3.1. Efecto del veneno sobre el tono vascular.

Las contracciones inducidas por el VCCm sobre el tono basal de la aorta de rata figura 12. En la tabla 6, podemos encontrar cuanto es el porcentaje de contracción del anillo (E_{max}) y cuanto necesito de veneno (μg) para generar una contracción

efectiva (EC50). En el análisis de comparación múltiple de Tukey's los anillos con lesión endotelial y los incubados con L-name e Indometacina presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto a los anillos intactos de endotelio. El veneno causa vasoconstricción a partir de los 100 µg hasta los 600 µg, y a partir de aquí al aumentar la dosis no hay efecto de contracción adicional.

Tabla 6. Valores de contracción (% con KCl) de los anillos aórticos sanos, incubados con L-name e Indometacina y con lesión endotelial, tratados con VCCm.

	Sano	Lesión endotelial	L-name e Indometacina	Significancia
E _{max} (%kcl)	6,7±1,6	43 ± 2,5	35,41 ± 3,5	0,0001***
EC50 (ug)	328 ± 51	262,5 ± 11,39	258,3 ± 30,38	0,0123 **

ANOVA, Media ± Error estándar, **p<0.01 ***p<0.001

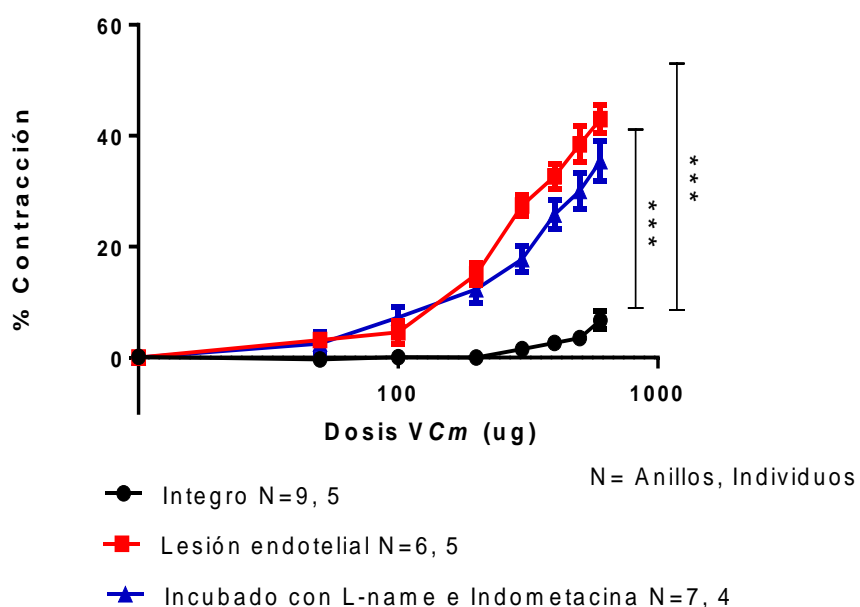


Figura 12. Efecto del VCCm en las curvas acumulativas de concentración-respuesta en anillos aórticos de rata (●) en preparaciones con endotelio presente, (■) con endotelio eliminado y (▲) con endotelio más L-name e Indometacina. ***p<0.001. N= Número de piezas de anillos, número animales experimentales. (n>4).

7.3.2. Efecto del veneno independiente de endotelio sobre el tono vascular

En la tabla 7 se presentan los bloqueantes de los factores vasoactivos dependientes de endotelio. Las contracciones inducidas por el VCCm en la aorta de rata son independientes de endotelio como se muestran en la figura 13. En la tabla 8, podemos encontrar cuanto es el porcentaje de contracción del anillo (Emax) y cuanto necesito de veneno (ug) para generar una contracción efectiva (EC50). Al realizar el análisis de varianza ANOVA de una via y la comparación múltiple de Tukey's se encontró que los anillos incubados con L-name e Indometacina y Seratrodast presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto a los anillos a los anillos incubados con Prazocina. La respuesta contráctil inducida por el veneno fue inhibida por Prazocina.

Tabla 7. Función específica de los factores vasoactivos usados.

REACTIVO	ACTIDAD BLOQUEANTE
L-name	eNOS (enzima que produce Oxido Nitrico)
Indometacina	COX1 y COX2 (prostaglandina-endoperóxido sintasa)
Prazocina	Receptores ALFA 1
Seratrodast	Receptores de Tromboxano A2 (TxA2)

Tabla 8.A. Valores de contracción (% con KCl) de anillos aórticos incubados con L-name e Indometacina, Seratrodast y Prazocina, tratados con VCCm.

	L-name e Indometacina	Prazocina	Seratrodast	Significancia
Emax (%kcl)	35,4 ± 3,5	9,1 ± 3,5	49,69 ± 4,7	< 0,0001 ***
EC50 (ug)	271,4 ± 28,8	430,5 ± 26,4	348,4 ± 43,75	< 0,013**

ANOVA, Media ± Error estándar, **p<0.01 ***p<0.001

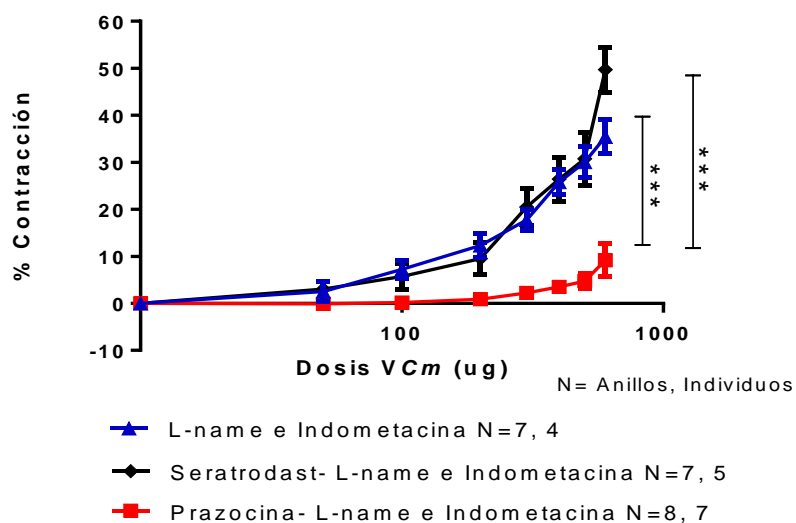


Figura 13. Efecto del VCCm en curvas de concentración-respuesta en anillos aórticos de rata (\blacktriangle) en preparaciones con endotelio, L-name e Indometacina, (\blacklozenge) con endotelio, L-name e Indometacina mas Seratrodast y (\blacksquare) con endotelio con L-name e Indometacina mas Prazocina. *** $p < 0.001$. N= Número de piezas de anillos, número animales experimentales. ($n > 4$).

7.3.3. Efecto VCCm a agonistas contráctiles y vasorelajantes.

Las curvas de contracción de KCl, U46 619, Fe y de relajación con Cch en anillos incubados previamente con veneno (500 μ g). En la tabla 9 encontramos cuanto es el % de contracción del anillo (E_{max}) y cuanto necesito de veneno (ug) para generar una contracción o relajación efectiva (EC_{50}). Al realizar el análisis de varianza ANOVA de una vía, no se encontró diferencias significativas, por lo que el VCCm no tiene efecto sobre la contracción inducida por Kcl, U46 619, Fe figura 14. A, B, C, y en la relajación inducida por Cch dependiente de endotelio figura 14. D. La respuesta contráctil inducida por el veneno no fue inhibida por a agonistas contráctiles y vasorelajantes.

Tabla 9. Valores de contracción (%) de los anillos aórticos en curvas de contracción; **A:** KCl **B:** U46 619 **C:** Fenilefrina y de relajación **D:** Carbacol (Cch) incubados con VCCm.

Fig.	Reactivos	E. max	Significancia E. max	EC50	Significancia EC50
A	KCl	1,96 ± 0,28		5,2 e-8 ± 1, e-8	
	KCl [#]	2,2 ± 0,2 (%kcl)	<0,5	1,538 e-8 ± 3,75e-9 (mM)	<0,1
B	U46 619	156,4 ± 11		5,18 e-8 ± 1,3 e-8	
	U46 619 [#]	129,5 ± 18,8 (%kcl)	<0,3	2,538 e-8 ± 5,75e-9 (Log M)	<0,1
C	Fenilefrina	123,8 ± 7,9		2,6 e-8 ± 8 e-9	
	Fenilefrina [#]	112,7 ± 11,5 (%kcl)	<0,45	8,5 e-8 ± 2,9 e-8 (Log M)	<0,1
D	Carbacol	60,7 ± 1,8		5,067e-7 ± 7,6 e-8	
	Carbacol [#]	53 ± 8,4 (%Fe)	<0,39	1,06 e-6 ± 3,6 e-7 (Log M)	< 0,17

[#]Anillos incubados 20 minutos antes con 500ug VCCm. Media ± Error estándar.

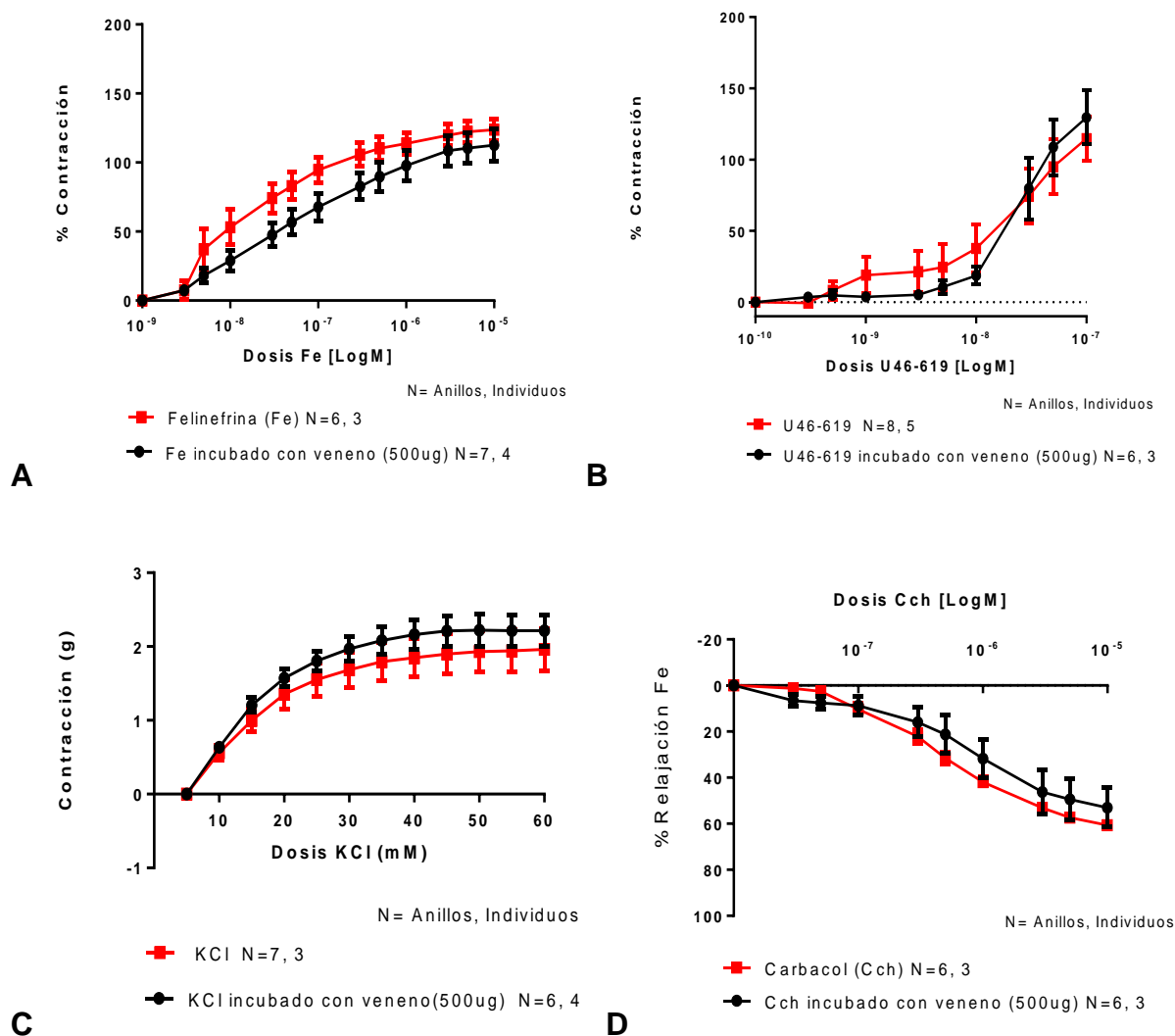


Figura 14. El efecto VCCm en anillos aórticos de rata incubados con 500ug de veneno (durante 20min) en las curvas de concentración-respuesta en contracción; (A) Fenilefrina, (B)

U46 619, (C) KCl y en relajación con (D) Carbacol (Cch), (■) en preparaciones sin veneno, (●) con veneno. $p < 0,01$. N= Número de piezas de anillos, número de individuos experimentales. (n>3)

8. DISCUSIÓN

La presente investigación determinó las alteraciones causadas por el veneno de *C margaritatus* (VVCm) en la presión arterial, así como también la variación de los niveles de electrolitos como Na^+ , K^+ y Ca^{++} presentes en sangre; además, se evaluó el efecto directo del veneno sobre el tono vascular en aorta de rata mediante el sistema de órgano aislado.

En la presión arterial *in vivo* se observaron alteraciones en la PD (figura 9.B), y por otro lado, la PS y PAM no presentan diferencias estadísticamente significativas, aunque se evidencia una tendencia oscilatoria al igual que la PD. El veneno en su dosis máxima (80 %) causó una alteración estadísticamente significativa en el nivel sérico de Ca^{++} (figura 11. B). Los otros dos niveles de electrolitos séricos: Na^+ y K^+ no tuvieron diferencias significativas. En las pruebas *ex vivo*, el veneno tuvo un efecto directo sobre el tono vascular de la arteria, causando vasoconstricción del músculo liso independiente de endotelio, sin embargo, la contracción es mayor en ausencia de este. No se encontró un efecto bloqueante del veneno sobre la respuesta vascular a agonistas contráctiles (KCl, U 46619, Fe) ni vaso-relajantes (Cch).

Se podría inferir que el incremento de la presión arterial diastólica puede deberse a una estimulación generada por las toxinas del veneno sobre el tono vascular de las arterias coronarias causando una vasoconstricción, lo cual disminuye el aporte de oxígeno y nutrientes al tejido cardíaco, que sumado al aumento de los niveles séricos de calcio y liberación de catecolaminas generan problemas en la distensión y retardo en la relajación de las paredes del corazón lo que representa un llenado más lento de las cavidades cardíacas y una presión arterial diastólica más alta (Carrillo-Esper y Contreras C, 2008; De la Serna, 2009).

Se ha encontrado que las alteraciones hemodinámicas causadas por el veneno de escorpión se asocia directamente con el un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas del neuropéptido Y (NPY), ET-1 y la liberación elevada de catecolaminas de los nervios simpáticos lo que produce un aumento del tono vascular y la posterior insuficiencia hemodinámica (D'Suze *et al.*, 2003; Gueron y Sofer, 1994). Adicionalmente, el veneno del escorpión *Androctonus australis hector* reporta una correlación entre la presión arterial y las catecolaminas, asociado a un aumento de la presión sanguínea (124 ± 25 mmHg a 214 ± 34 mmHg) (Nouira *et al.*, 2005). Particularmente el *C. margaritatus* presentan algunas proteínas que causan disfunción en los canales iónicos celulares (Guerrero-Vargas, 2008) que podrían estar afectando la presión arterial.

En esta investigación el comportamiento de los parámetros de la presión arterial es oscilatorio (Figura 10), donde inicialmente tiende a bajar (t2 a t3), luego a subir (t4) y a descender nuevamente (t5 y t6). Tal efecto se ha descrito para otras especies de escorpiones, de las cuales, el veneno provoca un comportamiento oscilatorio de la presión arterial, donde la inoculación del veneno causa hipertensión, hipotensión o ambas (Zayerzadeh *et al.*, 2009; Elatrous *et al.*, 2015). Como sucede con el veneno del escorpión *Maurus palmatus*; que provoca un efecto bifásico, expresando primero una rápida y transitoria respuesta hipotensora, que duró 10 minutos seguida de una respuesta hipertensiva (120 mmHg) que duró hasta una hora (Ettinger *et al.*, 2013), de igual manera el veneno de la especie *Centruroides infamatus* después de los 10 minutos, presenta episodios de elevada presión arterial y frecuencia cardiaca (420 latidos por minuto); posteriormente disminuye la frecuencia cardiaca y la presión arterial (Ledesma, 2013).

Teniendo en cuenta que el veneno de los escorpiones del género *Centruroides* está formado por proteínas de bajo peso molecular (7000 Da), llamadas escorpaminas las cuales llegan rápidamente a la circulación general y presentan una elevada toxicidad, que puede estar asociado con el efecto mencionado anteriormente, ya que estas proteínas tienen una afinidad selectiva por el sistema nervioso central y periférico

(Montoya-Cabrera, 1996). Además que el veneno de los escorpiones pueden liberar mediadores que afectan a los procesos inflamatorios, la activación de plaquetas, el aumento de permeabilidad, óxido nítrico y citoquinas; esto es causado por las toxinas del veneno y sus funciones en la células excitables, que se refleja en el cierre de los canales iónicos que regulan la unión o los cambios en el gradiente de tensión, responsable de la excitación del nervio y el músculo, la secreción hormonal, el control de equilibrio de las sales, el agua y la regulación de la presión arterial, etc. (Petricevich, 2010).

Por lo tanto los cambios oscilatorios anteriores son causados por las escorpaminas actuando a nivel de los canales iónicos de la membrana celular, incrementando la liberación de acetilcolina (células parasimpáticas) y catecolaminas a nivel simpático. Las catecolaminas actúan en las células produciendo la acumulación de Ca^{++} y un aumento en el requerimiento de O_2 , además se ha reportado que las catecolaminas actúan durante 2-3 minutos (Ismail, 1995; Peaston, 2004), por lo que los primeros efectos de hipertensión causados se atribuyen en gran parte a ellas. A su vez, la acetilcolina produce vasodilatación contrarrestando el efecto anterior, fenómeno que se incrementa bajo condiciones de estrés por hiperproducción y potenciación en la acción de este neurotransmisor (Ledesma, 2013).

Sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas para PAM y PS, no obstante es relevante tener en cuenta que el incremento en la PD en relación con la presión arterial sistólica (PAS), es un marcador determinante de la presión arterial (PA) central, puesto que no está distorsionada por la amplificación de la presión. Por lo cual la PD baja puede ser un marcador temprano en el aumento del gasto cardíaco, volumen sistólico y/o rigidez arterial en los adultos jóvenes y un marcador tardío de rigidez ventricular y arterial en los ancianos. Además, una PD elevada es, a cualquier edad, un marcador del aumento de resistencia vascular periférica (típico de la hipertensión arterial en adolescentes y adultos jóvenes) y cuando está gravemente elevada sugiere causas secundarias de hipertensión y urgencia/crisis hipertensiva, especialmente en ancianos. La hipertensión diastólica

muy grave debe considerarse una señal de alarma, tanto para realizar un diagnóstico rápido como para aplicar un tratamiento antihipertensivo agresivo y eficaz. (Franklin, 2007).

En cuanto a la presión arterial está regulada además por la función y estructura del corazón (función inotrópica en la contracción y lusitropica en relajación), el riñón (secreción de renina, retención de líquidos y sodio), los pulmones (secreción de angiotensina II), sistemas vasculares (aterosclerosis, angiotensina, óxido nítrico, etc.), baroreceptores, centros cardiovasculares de la médula cerebral y bioquímica sanguínea (niveles de electrolitos, vasoactivos, etc) (Tresguerres, 2001; Whyton y Hall, 2006).

No obstante, además de catecolaminas, se ha planteado la hipótesis que la toxina del escorpión podría desencadenar la liberación de otros mediadores implicados en la modulación de la función circulatoria (D'Suze *et al.*, 2003). Por lo tanto, para precisar los posibles mecanismos por los cuales el veneno *C.margaritatus* y sus toxinas derivadas están perturbando la presión arterial. Por lo cual es muy importante estudiar primero sus efectos sobre estos diferentes sistemas fisiológicos, que permita conocer el comportamiento que tiene este veneno sobre la presión arterial y su mecanismo fisiopatológico.

Además, el efecto del veneno sobre la concentración de electrolitos muestran que las concentraciones séricas de sodio y de potasio no son estadísticamente significativas, la tendencia a aumentar de los niveles de K^+ sería significativo si el tiempo de exposición superara los 60 minutos, como se reporta en otros estudios; tal es el caso del escorpión *Androctonus bicolor*, donde se evidencia un aumento de los niveles séricos a las 4 horas para Na^+ , a las 2 horas para K^+ y para Ca^{++} a partir de la media hora de exposición al veneno (Al-Asmari *et al.*, 2015). No obstante en los reportes científicos, evidencian que una exposición más prolongada del veneno, causa alteraciones de electrolitos (Nasr Ben *et al.*, 2009; Al-Asmari *et al.*, 2015). Lo cual no fue posible visualizar en este estudio, debido al corto tiempo de exposición del VCCm.

Por otra parte, transcurridos 60 minutos desde la inoculación del VCCm (80%), se generó un aumento en los niveles séricos de Ca^{++} (mediante la técnica colorimétrica química, la cual mide el Ca^{++} sérico libre o ionizado que es cerca del 50% del calcio total sanguíneo), los cuales podrían deberse a una disociación del calcio unido a proteínas y aniones de la sangre, puesto que el calcio sérico juega un papel importante en la función contráctil, o sea la fuerza de contracción del corazón (inotropía) aumentando así la presión de eyección ventricular; además de esto, el calcio juega un papel fundamental en la contracción vascular cuando esta es pertinente, por ejemplo, en cuadros de hipovolemia, hipotensión o redistribución de volumen efectivo corporal en situaciones de huida a cargo del sistema simpático. (Kasper, 2017).

Estudios muestran una variación en los niveles de albúmina sanguínea con la administración del veneno de *T. serrulatus* (Cusinato *et al.*, 2010) lo que podría llegar a alterar la concentración de calcio sérico (Claudia y Gómez, 2010). A su vez, diferentes estudios abordan alteraciones de los electrolitos a los 60 minutos de exposición después de la inoculación de veneno escorpiónico, igualmente, a nivel sérico se reporta en la especie *Androctonus bicolor*, que al inocular su veneno se presenta un aumento en los niveles séricos del calcio (10.3 a 13.44 mg/dl) desde los 30' hasta cumplir la hora de exposición al veneno (Al-Asmari *et al.*, 2015), Lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio; sin embargo, el veneno de *Palamneus gravimanus* reporta una disminución de los niveles séricos de calcio (10.6 inicial a 8.25 después) (More *et al.*, 2004). Por lo tanto las alteraciones de los niveles de calcio varían de una especie a otra, sin embargo dichas alteraciones pueden ser causadas por agentes externos.

En las pruebas *ex vivo* se evidenció que sí existe un efecto directo del veneno sobre la aorta de rata con un efecto vasoconstrictor sobre el tono vascular, encontrando además una contracción más pronunciada en anillos aórticos con lesión endotelial y con bloqueo L-name (bloquea la vía del NO) e Indometacina (bloquea las vías de los prostanoídes) con respecto a los anillos con endotelio íntegro (figura 12). El efecto

directo del veneno se respalda con lo que se ha evidenciado en otras especies como *T. serrulatus* y *A. bicolor*, donde el veneno estimula directamente el sistema cardiovascular (Teixeira *et al.*, 2001; Tuncer y Onur, 1996)

El músculo liso vascular puede tener una vasoconstricción o vasodilatación con asistencia directa del endotelio y sistema autónomo que por medio de moléculas paracrinas y endocrinas (Catecolaminas, endotelina, óxido nítrico, prostaciclina, acetilcolina) estimulan su contracción o relajación (Rojas, 2005). En cuanto a las catecolaminas, estas estimulan receptores específicos como los receptores adrenérgicos alfa y beta (Alfa 1, Alfa 2, Beta 1, etc) del sistema simpático, que desencadenan una amplia gama de reacciones en los diferentes tejidos (Tresguerres, 2001; Lymperopoulos, 2013).

La acetilcolina (Ach), un neurotransmisor presente en abundancia en el sistema nervioso central y como protagonista en el sistema nervioso autónomo parasimpático cumple diferentes funciones sobre sus receptores tipo Muscarínicos presentes no solo en el cerebro y médula, sino también en vasos sanguíneos, corazón, intestinos y otros cumpliendo diversas funciones.(Rothlin, 2003; Whyton y Hall, 2006).

Esta investigación se encontró que la respuesta vasoconstrictora del veneno sobre el tono vascular aumenta en anillos sin endotelio, ya que la respuesta fue incluso más prominente que en anillos aórticos con endotelio intacto, demostrando que endotelio contrarresta el efecto del veneno y el músculo liso vascular contrarrestando el efecto del veneno, tal como se muestra en una esta investigación donde el veneno del escorpión *A. crassicauda* junto con altas concentraciones de Ach genera una vasoconstricción en anillos aórticos de rata, la cual parece ser independiente de endotelio, ya que en anillos sin endotelio la respuesta fue mayor que en los anillos con endotelio, y a bajas concentraciones la Ach más veneno potencian relajación en anillos con el endotelio intacto, posiblemente por la sensibilización aumentada de los receptores muscarínicos M3 o por la secreción paralela de sustancias relajantes que adicionan efecto vasodilatador (Tuncer y Onur, 1996).

En la figura 12 se puede ver como el endotelio integro de alguna manera contrarresta el efecto directo del veneno sobre el musculo liso vascular lo que no sucede en anillos sin endotelio o bloqueado (L-name e Indometacina) lo cual podría deberse a un efecto directo sobre el musculo liso vascular, o efecto puente en tejido no endotelial como la MEC (Matriz Extracelular) (Dominguez, 2015) o terminaciones nerviosas simpáticas (Tuncer y Onur, 1996). En los segmentos aórticos, el L-name e Indometacina más seratrodist no se mostraron afectadas las respuestas contráctiles inducidas por el veneno al aumentar su concentración en comparación con L-name e Indometacina, mientras que la respuesta contractil fue inhibida por la Prazocina (bloquea los receptores alfa 1-adrenérgicos) figura 13, lo que indica una posible contribución del receptor Alfa 1 adrenérgico que antagoniza la vasoconstricción inducida por el veneno sobre el músculo liso vascular.

Los receptores Alfa 1 se encuentra en sitios postsinaptico principalmente en el musculo liso vascular y su acción es la constricción, excepto a nivel gastrointestinal donde producen relajación; su mecanismo de acción es similar a los receptores muscarinicos m1 y m3, en el cual la unión del ligando activa la fosfolipasa C que lleva a la formación del ip3 y el DGA y el aumento de calcio intracelular (Orallo, 1996; Ciencias Fisiológicas, 2003; Berridge, 2009). Paralelamente con el veneno de otro escorpión se evidencia un mecanismo de acción del veneno vía adrenérgica, pero esta vez posiblemente por un efecto indirecto o puente al activar las terminaciones nerviosas adrenérgicas liberando neurotransmisores directamente sobre el musculo liso vascular (Tuncer y Onur, 1996)

En lechos vasculares especialmente a nivel coronario, parte de la vasodilatación mediada por el endotelio puede ser atribuido a un mecanismo del óxido nítrico o un prostanoide, aunque existe un tercer tipo de factor relajante dependiente de endotelio, que se asocia con un aumento de la conductancia de potasio y con hiperpolarización secundaria del músculo subyacente, mediante un efecto final que consiste en la disminución del calcio intracelular (Rojas, 2005). En contraste al bloquear los canales de potasio tal como pasa en las células betas pancreáticos, en

este caso al ser bloqueados por el veneno, este bloqueo produce una despolarización de la membrana y la apertura de los canales de calcio con una entrada masiva de este a la célula. Este aumento de calcio intracelular podría condicionar a dos situaciones a nivel vascular: por un lado se podría producir una contracción de la célula muscular lisa por la vía calcio-calmodulina; que para esta investigación es la vía efectiva de vasoconstricción del veneno ya que este presenta toxinas que generan inhibición de los canales de K^+ . Por otro lado se podría generar la precipitación vesicular a nivel de las terminaciones nerviosas simpáticas que rodean los vasos sanguíneos con una consecuente liberación de agentes adrenérgicos sobre el musculo liso vascular (Berridge, 2009; Martín, 2012) lo cual se podría evaluar en un estudio posterior para tener certeza de la acción de las terminaciones nerviosas.

Teniendo en cuenta lo anterior y que el veneno de *C. margaritatus* se caracteriza por presentar una margatoxina conocida como MgTx2, donde el 50% de estas toxinas tienen actividad sobre canales de potasio de la familia de las α -KTx (toxina del canal de potasio alpha-KTx 2.2) (Guerrero-Vargas, 2008; Dueñas-Cuellar, 2014) y es homóloga con toxinas descritas en otros venenos escorpiónicos, como la Margatoxina (MgTx) que es un péptido con 39 residuos de aminoácidos (masa molecular de 4178 Da) que generan inhibición en los canales de K^+ voltaje dependiente. Se puede inferir que las toxinas del veneno como la MgTx al ser un inhibidor de los canales de K, participan en la regulación y mantenimiento del potencial de membrana en las células del musculo liso, ya que podrían estar condicionando el aumento de calcio intracelular como se mencionó anteriormente y por ende causar alteraciones en el musculo liso como se evidencia en este trabajo, desencadenando la contracción vascular. Asociado a los canales de K^+ sensibles a la MgTx localizados en el músculo liso vascular (Novakovic *et al.*, 2006).

Estos resultados son aspectos importantes a tener cuenta en el proceso de toxicidad vascular mediado por el VCCm ya que pueden aportar al desarrollo de estudios en la línea de la toxinología, con el fin de esclarecer el mecanismo de acción y la

especificidad de estas toxinas escorpiónicas, así como el posible desarrollo de nuevos sueros antiescorpiónicos que neutralicen eficazmente las toxinas de especies locales y contribuir al mejoramiento del tratamiento clínico causado por el accidente escorpionico. Así mismo en cuanto a sintomatología, este trabajo contribuye al mejoramiento del monitoreo de la presión arterial y afecciones cardiovasculares; igualmente es un aporte adicional a patologías relacionadas a canales iónicos.

9. CONCLUSIONES

- La Evaluación del efecto vasomotor del veneno total de *C. margaritatus* está relacionada con la presión arterial sistémica y con uno de los niveles séricos de electrolitos (Ca^{++}).
- Las alteraciones de la Presión Arterial Sistemica causadas por el veneno completo de *C.margaritatus*, afectó principalmente la PD, puesto que el incremento de la presión arterial diastólica puede deberse a una estimulación generada por las toxinas del veneno del escorpión que podrían desencadenar la liberación de otros mediadores implicados en la modulación de la función circulatoria.
- La evaluación de las alteraciones en los niveles de electrolitos Sodio, Potasio y Calcio, por el VCCm, generó aumento de los niveles séricos del ión Ca^{++} . Mientras que los valores de los iones de Na^+ y K^+ no fueron significativamente afectados. El aumento en los niveles séricos de Ca^{++} que podrían deberse a una disociación del calcio unido a proteínas y aniones de la sangre.
- Cuando se caracterizó el efecto directo del veneno completo de *C. margaritatus* sobre el tono vascular en anillo aórtico de ratas Wistar, se evidencio el efecto directo del VCCm sobre el tejido vascular, causando una vasoconstricción y parte de esa respuesta contráctil es inhibida por el endotelio.

- La Prazocina tiene un efecto antagonista en la vasoconstricción inducida por el veneno sobre el músculo liso vascular, indicando una contribución de los receptores Alfa 1 adrenérgico en esta respuesta contractil.

10.RECOMENDACIONES

- Se recomienda complementar con estudios en sistemas *in-vivo* con el fin de mejorar la comprensión de los efectos sobre la presión arterial y los niveles séricos de electrolitos, permitiendo relacionar la sintomatología con las variables sistémicas en respuesta a esas alteraciones.
- Con base a los datos obtenidos en el estudio y a las diferentes investigaciones, sería importante investigar más cuidadosamente las respuestas fisiológicas *in vitro* o *in vivo* del veneno fraccionado, y hacer un estudio exhaustivo de su selectividad con métodos electrofisiológicos.
- Se recomienda la utilización de L-name e Indumetacina saturan algunas vías endoteliales y permiten evidenciar el efecto del veneno directamente sobre el músculo, a su vez, Setratrodast y Prazocina indican la posible vía de acción del veneno.

11. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

- El emplear sustancias bloqueadoras, y dilatadoras sobre el musculo liso que permitirá esclarecer los mecanismos de acción de los efectos generados con el veneno sobre el tono vascular en aorta de rata como acetilcolina y epicantequina que actúa sobre el musculo liso.
- Incrementar el tiempo de exposición del *VCCm* al evaluar alteraciones en los niveles séricos de Na^+ , K^+ para asegurar que el veneno no genera alteración en estos.
- Aumentar el tamaño de muestra para estudios posteriores para darle robustez a los datos obtenidos.
- Hacer una re-lectura de los niveles séricos de electrolitos, para evitar falsos positivos y datos extremos.
- El veneno de escorpión contiene compuestos con propiedades terapéuticas aún inexploradas, así que el desarrollo de estudios en esta línea de investigación, como este trabajo, permitan esclarecer los mecanismos relacionados con ciertas fisiopatologías y contribuir al desarrollo de tratamientos o monitoreos de la presión arterial, alteraciones vasculares y cardiacas. y ser el punto de partida para una investigación que permita detectar posibles moléculas que servirán en aplicaciones farmacológicas y biotecnológicas para que en un futuro los organismos de salud implementen un mejor manejo del accidente escorpiónico.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-rahman, M.A., Ayed, A.S., Abdel-mottaleb, Y., 2015. The Egyptian German Society for Zoology Cardiac disorders and mode of action of the Egyptian scorpion venom *Androctonus bicolor* on isolated toad ' s heart. *J. Basic Appl. Zool.* 72, 137–144. doi:10.1016/j.jobaz.2015.09.003
- Al-Asmari, A., Khan, H.A., Manthiri, R.A., 2015. Effect of *Androctonus bicolor* scorpion venom on serum electrolytes in rats: A 24-h time-course study. *Hum. Exp. Toxicol.* 35, 293–296. doi:10.1177/0960327115584688
- ANMAT, A.N. de M. alimentos y T.M., 2015. PRAZOSINA [WWW Document]. URL <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/p042.htm> (accessed 7.20.18).
- Arenas Belalcazar, C., 2010. Determinacion de las alteraciones electrocardiograficas causadas por el veneno del escorpion *Centruroides margaritatus*, en ratas *Rattus norvegicus* cepa Wistar. Universidad del Cauca.
- Armas, L., Luna, D., Flórez, E., 2012. Composición del género *Centruroides* Marx, 1890 (scorpiones: *buthidae*) en Colombia, con la descripción de una nueva especie. *Boletín la Soc. Entomológica Aragon.* 50, 105–114.
- Arronte, C.Q.C., 2013. BIOQUÍMICA CLÍNICA ESPECIALIZADA MANUAL DE PRÁCTICAS. *Rev. Medica la Univ. Veracruzana* 13, 7–11.
- Barona, J., Otero, R., Núñez, V., 2004. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia : capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica* 24, 42–49.
- Base de datos PubChem, 2018. Centro Nacional de Información Biotecnológica. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2449> (accessed 8.19.18).
- Berridge, M.J., 2009. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793, 933–940. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.005
- Bolivar-G, W. et al., 2015. Picadura de escorpiones (Escorpiotoxicosis) en el Valle del Cauca. *Cart. la Salud* 17.
- Borges, A., Miranda, R., Patiño, H.A., 2011. Los Escorpiones y el escorpionismo en Panamá 48.
- Carrillo-Esper, R., Contreras C, A.N., 2008. Artemisa. *Rev. la Asoc. Mex. Med.* XXII, 163–173.
- Chicharro, J., Mojares, L., 2008. FUNDAMENTOS DE LA FISILOGIA DEL EJERCICIO, in: *Fisiologia Clinica Del Ejercicio*. pp. 1–31.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 2008b. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Trop.* doi:10.1016/j.actatropica.2008.05.021
- Ciencias Fisiológicas, 2003. Sistema Nervioso Autónomo [WWW Document]. URL <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/nguias/sna.htm> (accessed 9.2.18).
- Claudia, D., Gómez, M., 2010. Hipercalcemia e hipocalcemia. *Soc. Colomb. Endocrinol.* 45–52.
- Coloccini, R., 2003. Endotelina : ¿ una nueva frontera en Hipertensión Arterial ?
- Coranguez Reyes, C., 2010. Presión arterial media (PAM).
- Cupo, P., Figueiredo, A.B., Filho, A.P., Pintya, A.O., Tavares, G.A., Caligaris, F.,

- Marin-Neto, J.A., Hering, S.E., Simões, M. V., 2007. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. *Int. J. Cardiol.* 116, 98–106. doi:10.1016/j.ijcard.2006.02.015
- Cusinato, D.A.C., Souza, A.M., Vasconcelos, F., Guimarães, L.F.L., Leite, F.P., Gregório, Z.M.O., Giglio, J.R., Arantes, E.C., 2010. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 56, 1477–1486. doi:10.1016/j.toxicon.2010.09.003
- D'Suze, G., Moncada, S., González, C., Sevcik, C., Aguilar, V., Alagón, A., 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 367–375. doi:10.1016/S0041-0101(02)00331-8
- De la Serna, F., 2009. DISFUNCIÓN DIASTÓLICA . Aspectos fisiopatológicos 208–233.
- De Sousa, R.A., Falcão Do Nascimento, N.R., Ferreira Barbosa, P.S., Kerntopf, M.R., Abreu Lessa, L.M., De Sousa, C.M., Martins, R.D., Sousa, D.F., Rodrigues De Queiroz, M.G., Toyama, M.H., Fonteles, M.C., Costa Martins, A.M., Azul Monteiro, H.S., 2005. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 46, 271–276. doi:10.1016/j.toxicon.2005.04.013
- Dominguez, M.A., 2015. Papel de los canales de K⁺ del músculo liso vascular en el control del tono y el remodelado arterial. *Enfermería Y La Adm. Citostática*. doi:10.1214/07-AOS515
- Duboscq, C., 2017. Endotelio vascular. *Hematología* 21, 19–30.
- Dueñas-Cuellar, R., 2014. Identificação e caracterização de peptídeos bioativos presentes na peçonha do escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) 111.
- Elatrous, S., Ouanes-Besbes, L., Ben Sik-Ali, H., Hamouda, Z., Benabdallah, S., Tilouche, N., Jalloul, F., Fkih-Hassen, M., Dachraoui, F., Ouanes, I., Abroug, F., 2015. Study of severe scorpion envenoming following subcutaneous venom injection into dogs: Hemodynamic and concentration/effect analysis. *Toxicon* 104, 1–6. doi:10.1016/j.toxicon.2015.07.003
- Erdogan, A., Schaefer, C.A., Schaefer, M., Luedders, D.W., Stockhausen, F., Abdallah, Y., Schaefer, C., Most, A.K., Tillmanns, H., Piper, H.M., Kuhlmann, C.R.W., 2005. Margatoxin inhibits VEGF-induced hyperpolarization, proliferation and nitric oxide production of human endothelial cells. *J. Vasc. Res.* 42, 368–376. doi:10.1159/000087159
- Ettinger, K., Cohen, G., Momic, T., Lazarovici, P., 2013. The effects of a chactoid scorpion venom and its purified toxins on rat blood pressure and mast cells histamine release. *Toxins (Basel)*. 5, 1332–1342. doi:10.3390/toxins5081332
- Flores, S.M., Segura, T.J., 2005. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *New.Medigraphic.Com* 6, 315–326.
- Franklin, S.S., 2007. Importancia de la presión arterial diastólica en relación con la edad. *Hipertensión* 24, 172–175. doi:10.1016/S1889-1837(07)71692-6
- Galíndez-Cerón, J.D., 2014. Determinación del efecto nefrotóxico en riñón aislado de rata Wistar y citotoxicidad en células MDCK, inducidos por el veneno de escorpión *Centruroides margaritatus* (GERVAIS, 1841) 81.
- García, C., Calderón-Aranda, E.S., Anguiano, G.A.V., Becerril, B., Possani, L.D.,


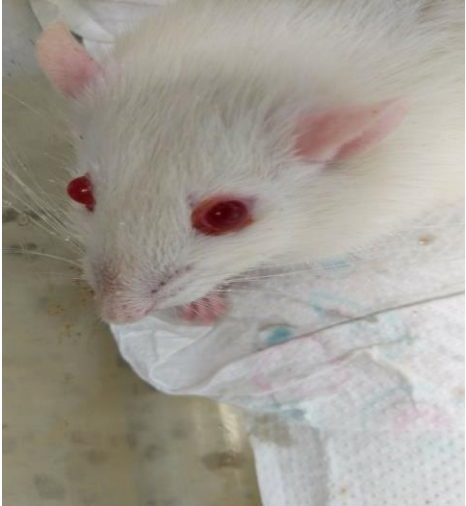
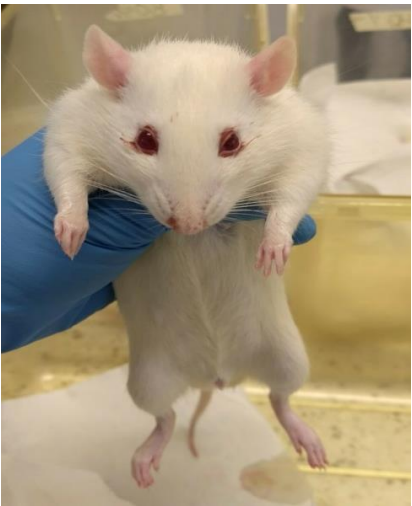
2003. Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 41, 417–427. doi:10.1016/S0041-0101(02)00337-9
- García-Calvo, M., Leonard, R.J., Novick, J., Stevens, S.P., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., 1993. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J. Biol. Chem.* 268, 18866–18874.
- Jiménez, B., 2015. Electrolitos [WWW Document]. Onmeda.es Para tu Salud. URL https://www.onmeda.es/exploracion_tratamiento/4447-print.html (accessed 3.12.18).
- Gómez, J., Patiño, R.O., Cadavid, A.D., Patricia, M., Sandino, V., 2002. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *Medunab* 159–165.
- Gómez, J.P., Patiño, R.O., Cadavid, A.D., Patricia, M., Sandino, V., 2002. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *Medunab* 159–165.
- Gomez De Segura, I., 2012. Métodos de analgesia y eutanasia 1–34.
- Gueron, M., Sofer, S., 1994. The role of the intensivist in the treatment of the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 32, 1027–1029. doi:10.1016/0041-0101(94)90385-9
- Guerrero-Vargas, J.A., 2008. Análise Proteômica Parcial da Peçonha do Escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus* 1–15.
- Guerrero-vargas, J.A., 2002. Aislamiento, Purificación y Evaluación de Neurotoxinas del Escorpión *Centruroides margaritatus* (Buthidae) del municipio de el Patía, departamento del Cauca, Colombia.
- Guerrero-vargas, J.A., Rodríguez, J., Ayerbe, S., Flórez, E., 2013. Scorpionism and Dangerous Species of Colombia. *Toxinology* 1–24. doi:10.1007/978-94-007-6647-1
- Guzman, Carrizosa, Vergara, Jimenez, 2004. Líquidos y electrolitos en cirugía, fisiopatología celular y bioquímica, Primera. ed.
- Gwee, M.C.E., Nirthanan, S., Khoo, H.E., Gopalakrishnakone, P., Kini, R.M., Cheah, L.S., 2002. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 795–801. doi:10.1046/j.1440-1681.2002.03726.x
- Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2018. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública [WWW Document]. Boletín epidemiológico. URL www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemiologico.aspx
- Kasper, D.L., 2017. Medicina interna de HARRISON, The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Khattabi, A., Soulaymani-Bencheikh, R., Achour, S., Salmi, L.R., 2011. Classification of clinical consequences of scorpion stings: Consensus development. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 364–369. doi:10.1016/j.trstmh.2011.03.007
- Kierszenbaum, A.L., 2011. Histología y biología celular, introducción a la anatomía patológica, Segunda. ed. Elsevier.

- Ledesma, A.L., 2013. Efectos curativos y preventivos de antioxidantes (α - tocoferol y quercetina) en los signos y síntomas cardiovasculares presentados en la intoxicación por el veneno de *Centruroides infamatus*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Lymperopoulos, A., 2013. Physiology and pharmacology of the cardiovascular adrenergic system. *Front. Physiol.* 4 SEP. doi:10.3389/fphys.2013.00240
- Marinkelle CJ, S.H., 1965. Toxicological and clinical studies on *Centruroides margaritatus* (Gervais), a common scorpion in western Colombia. *J. Med. Entomol.* 2, 195–199.
- Marinko, M., Jankovic, G., Nenezic, D., Milojevic, P., Stojanovic, I., Kanjuh, V., Novakovic, A., 2018. Epicatechin induced relaxation of isolated human saphenous vein: Roles of K⁺ and Ca²⁺ channels. *Phyther. Res.* 32, 267–275. doi:10.1002/ptr.5969
- Martín, F.P., 2012. Canales de potasio en el músculo liso vascular humano: ácido araquidónico como factor hiperpolarizante dependiente de endotelio 140.
- Montoya-Cabrera, M., 1996. El Alacranismo. *Gac. Médica Mex.* 132, 645–648. doi:10.1016/j.pbi.2008.06.002
- More, S.S., Kiran, K.M., Gadag, J.R., 2004. Dose-dependent serum biochemical alterations in Wistar albino rats after *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) envenomation. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 15, 263–275.
- Nasr Ben, H., Serria, H., Chaker, S., Riadh, B., Zouheir, S., Kamel, J., Tarek, R., Khaled, Z., 2009. Some biological effects of scorpion envenomation in late pregnant rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 573–580. doi:10.1016/j.etp.2008.12.004
- Nouira, S., Elatrous, S., Besbes, L., Boukef, R., Devaux, C., Aubrey, N., Elayeb, M., Abroug, F., 2005. Neurohormonal activation in severe scorpion envenomation: Correlation with hemodynamics and circulating toxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 111–116. doi:10.1016/j.taap.2005.01.017
- Novakovic, A., Gojkovic-Bukarica, L., Peric, M., Nezcic, D., Djukanovic, B., Markovic-Lipkovski, J., Heinle, H., 2006. The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery. *J. Pharmacol. Sci.* 101, 85–90. doi:10.1254/jphs.FP0050863
- OMS, 2007. La OMS prevé aumentar el acceso al tratamiento para las víctimas de la rabia o de mordeduras de serpiente.
- Orallo, F., 1996. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* 69, 153–171.
- Panlab Harvard Apparatus, n.d. Baño de organos compacto [WWW Document]. URL <https://www.panlab.com/es/productos/bano-de-organos-compacto-basic-research-panlab> (accessed 8.1.18).
- Petricevich, V.L., 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators Inflamm.* 2010. doi:10.1155/2010/903295
- Puerta Garcia, A., Mora E, I., 2014. Artrópodos y enfermedades. *Med.* 11, 3152–3159. doi:10.1016/S0304-5412(14)70751-6
- Ramírez, J., Palacios, M., Gutiérrez, Oscar, 2007. Implementación de la técnica en órgano aislado vascular como herramienta para la validación de plantas medicinales : Estudio del efecto vasodilatador de la *Salvia scutellarioides*. *Colombi Médica* 38, 28–33.

- Rein, J.O., 2012. Taxonomical updates in The Scorpion Files for Buthidae (2008) Taxa Status Distribution Comments. The Scorpion Files.
- Rinaldi, G., De la Serna, F., 2015. Regulación de la presión arterial. *Indian Heart J.* 5, 1–19.
- Rivera, C., Flores, L., Pantigoso, C., Escobar, E., 2010. Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de *Centruroides margaritatus*. *Rev. peru. biol* 17, 129–132.
- Rodríguez-Vargas, A.L., Rodríguez-Buitrago, J., Díaz, G.J., 2012. Comportamiento general de los accidentes provocados por animales venenosos en Colombia, 2006-2010. *Rev. salud pública.* 14, 1001–1009.
- Rojas, M.E., 2005. Elendotelio: 25 años despues. *Med* 13, 45–61.
- Roodt, A.R., 2015. Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 49, 55–71. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(19990605)39:3<371::AID-NEU4>3.0.CO;2-E
- Rothlin, R.P., 2003. Colinérgicos y Anticolinérgicos. *REDEVET* 14, 6–9.
- Saldarriaga, M.M., Otero, R., 2000. Los Escorpiones: Aspectos Ecológicos, Biológicos y Toxinológicos. *Medunab.*
- Sitprija, V., Sitprija, S., 2012. Renal effects and injury induced by animal toxins. *Toxicon* 60, 943–953. doi:10.1016/j.toxicon.2012.06.012
- SIVIGILA, S. de V. en S.P., 2018. Boletín epidemiológico [WWW Document]. Colecc. Boletín Com. Estratégico en Salud - CES.
- Teixeira, A.L., Fontoura, B.F., Freire-Maia, L., Machado, C.R.S., Camargos, E.R.S., Teixeira, M.M., 2001a. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon* 39, 703–709. doi:10.1016/S0041-0101(00)00200-2
- Teruel, R., Melic, A., 2015. Orden Scorpiones. *Rev. IDE@ - SEA* 18, 1–17.
- Tresguerres, J., 2001. Anatomía y Fisiología del Cuerpo humano, in: Barcelona. pp. 226–412. doi:10.1007/978-3-642-10470-1_18
- Tuncer, M., Onur, R., 1996. Effects of *Androctonus crassicauda* scorpion venom on endothelium-dependent and -independent vascular responses of rabbit aorta. *Gen. Pharmacol.* 27, 519–523. doi:10.1016/0306-3623(95)02031-4
- Whyton, A.C., HALL, J., 2006. TRATADO DE FISILOGIA MEDICA, 11th ed. Elsevier.
- Zayerzadeh, E., Koohi, M., Zare, M.A., Purkabireh, M., Kassaaian, S., Rabbani, S., Sotoudeh, A.M., Boroumand, M., Sadeghian, S., 2009. Cardiopulmonary complications induced by Iranian *Mesobuthus eupeus* scorpion venom in anesthetized rabbits. *Electr. Eng.* 1, 14.
- Zlotkin, E., Teitelbaumt, Z., Roachat, H., Miranda, F., Zlotkin, H., 1979. THE INSECT TOXIN FROM THE VENOM OF THE SCORPION *ANDROCTONUS MAURETANICUS MAURETANICUS*: PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND SPECIFICITY IN THE past we have shown that the toxicity of 9.

ANEXO 1

SINTOMAS

			PRIAPISMO
			PILOERECCIÓN INCORDINACIÓN
			SIALORREA EXOFTALMOS MIDRIASIS

ANEXO 2

Protocolo de disección y transporte de arterias

Materiales

- Bisturí
- Tijeras para disección
- Pinza para disección con garra
- Pinza para disección sin garra
- Caja de Petri
- Tubo falcon de 15 ml
- Tubos Eppendorf

Soluciones

1. Solución de Krebs (anexo 4)

Procedimiento

1. Recibir el tejido recién extraído de la rata
2. Con ayuda de las tijeras de disección, retirar el mayor número de ramas arteriales posibles o tejido adventicio.
3. Cortar el tejido aprox. 5 cm de vaso sanguíneo sumergido en solución de Krebs a 4°C para órgano aislado.
4. Llevar el tejido colectado hasta el microscopio del laboratorio.
5. Retirar cuidadosamente el tejido graso de todo el material colectado
6. Tomar el tejido almacenado en el tubo Falcon y conservarlo a 4 °C en solución de KREBS para el trabajo en órgano aislado (máximo 12 horas de conservación)

Anexo 3

Montaje en el equipo

- Cortar el segmento colectado en anillos de 3-4 mm
- Con precaución el gancho de acero inoxidable fijo a la base y pasarlo por la luz del anillo
- Tomar el gancho con el hilo y pasarlo por la luz del anillo en sentido contrario al anterior
- Tensar levemente el hilo contra el extremo distal de la base del gancho fijo
- Y montar en el baño de órganos, procurando no aumentar la tensión en el anillo

- Enrollar el hilo en el transductor
- Iniciar con el proceso de acondicionamiento del anillo arterial para el experimento.

Antes de iniciar el experimento se debe verificar:

- Temperatura: 37°C
- Oxigenación del medio
- pH 7,4 ± 0,05

Anexo 4

Preparación de la solución de Krebs-Henseleit

2. Preparación de solución salina concentrada 20X (solución stock)

Sustancia	Cantidad	Unidades
Agua destilada	1	l
NaCl	137.4	g
KCl	8	g
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,8	g
NaH ₂ PO ₄	2,8	g
Almacenar a 4 °C máximo por dos meses		

Se requiere para la solución de trabajo tan solo 1X de la solución stock (50 ml de solución stock en 1 litro de solución; debe prepararse diariamente)

3. Preparación de la solución de trabajo

Sustancia	Cantidad	Unidades
Solución stock	50	ml
Agua destilada	900	ml
CaCl ₂	0,28	g
NaHCO ₃	2,1	g
Glucosa monohidratada	2	g
Aforar a 1 litro y conservar a 4 °C hasta su uso		

Antes de su uso, burbujear vigorosamente con gas carbógeno por aprox. 30 minutos hasta obtener un pH de 7,4.

El contenido iónico final en la solución (en mili equivalentes/litro) es: Na⁺, 143,5; K⁺, 5,4; Ca²⁺, 5,1; Mg²⁺, 2,4; Cl⁻, 128; H₂PO₄⁻, 1,2; HCO₃⁻, 24,9; SO₄²⁻, 2,4; glucosa, 10.

Anexo 5

A partir de la solución madre del agonista (50 mM)/sustancia de trabajo, preparar las diluciones (en relación 1:10 preferiblemente).tomar la alícuota correspondiente de la solución de trabajo de acuerdo a la concentración final esperada en un baño de órg

Trabajo (Log M)	Alicuota (ul)	Final baño (Log M)	
1,00E-07	100	1,00E-09	1 nM
1,00E-06	40	5,00E-09	5 nM
1,00E-06	50	1,00E-08	10 nM
1,00E-05	40	5,00E-08	50 nM
1,00E-05	50	1,00E-07	100 nM
1,00E-04	40	5,00E-07	500 nM
1,00E-04	50	1,00E-06	1 µM
1,00E-03	40	5,00E-06	5 µM
1,00E-03	50	1,00E-05	10 µM
1,00E-02	40	5,00E-05	50 µM
1,00E-02	50	1,00E-04	100 µM
1,00E-01	40	5,00E-04	500 µM
1,00E-01	50	1,00E-03	1 mM

anos de 10 ml.