

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL VENENO DEL
ESCORPIÓN *Tityus pachyurus* (BUTHIDAE) EN LINFOCITOS HUMANOS
CULTIVADOS IN VITRO MEDIANTE LAS PRUEBAS DE ÍNDICE MITÓTICO,
VIABILIDAD CELULAR Y APOPTOSIS.**

**BEATRIZ ELENA SARMIENTO CERTUCHE
DIANA MARCELA TORRES CUELLAR**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL VENENO DEL
ESCORPIÓN *Tityus pachyurus* (BUTHIDAE) EN LINFOCITOS HUMANOS
CULTIVADOS IN VITRO MEDIANTE LAS PRUEBAS DE ÍNDICE MITÓTICO,
VIABILIDAD CELULAR Y APOPTOSIS.**

**BEATRIZ ELENA SARMIENTO CERTUCHE
DIANA MARCELA TORRES CUELLAR**

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

**Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL
Director**

**Mg. JIMMY ALEXANDER GUERRERO
Asesor**

**Bióloga. CLAUDIA TRUJILLO
Asesora**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010**

Nota de aceptación

Directos Mg.

Silvio M. Carvajal

Jurado Ph.D

Nohelia Cajas

Jurado Mg.

Nilza Velasco

Lugar y fecha de sustentación: 08 de septiembre de 2010

A nuestros padres y hermanos
Familia, Compañeros y amigos

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darnos la inteligencia y sabiduría para llevar a cabo cada una de las metas propuestas, y haber puesto en el camino a personas maravillosas que hicieron posible cada meta cumplida.

A nuestros padres Hipólito Torres, Olga Cuellar, Héctor Sarmiento y Esperanza Certuche por ser los responsables de nuestra formación tanto personal como académica; por su constante apoyo y alegría en cada momento.

A nuestros hermanos William Torres, Julio Cesar Torres y Jazmín Sarmiento, por su compañía y cariño.

Al Mg. Silvio Carvajal, por su dedicación, exigencia y paciencia a lo largo de nuestra formación, gracias por ser más que un maestro un amigo.

A la Mg. Luz Stella Hoyos, por su apoyo y por ser ejemplo del profesional exitoso que algún día esperamos ser.

A Mg. Jimmy Guerrero y a la Bióloga Claudia Trujillo, por sus aportes científicos y metodológicos para el desarrollo de este estudio, por su amistad y apoyo.

Al Mg. José Beltrán y al Dr. Santiago Ayerbe, por brindarnos confianza y apoyo absoluto en todo momento.

Al grupo de investigación en Toxicología Genética y Citogenética, por su colaboración en el desarrollo de este estudio, en especial a las Biólogas Diana Saavedra y Ingrid Reyes por su colaboración y amistad.

Al grupo de investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) y al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) por su colaboración en nuestro estudio, y por acogernos de la mejor manera posible.

A Manuel Alejandro Benachi, por ser participe del estudio. Gracias por su disponibilidad y amistad incondicional.

A nuestros amigos Jennifer Tovar, Ángela Pantoja, Cesar Bravo, Andrés González, Tatiana Arcos y John García por su amistad incondicional y compartir momentos inolvidables.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. ANTECEDENTES	19
4. MARCO TEÓRICO	24
4.1. GENERALIDADES DE LOS ESCORPIONES	24
4.2. VENENO ESCOPIÓNICO, ACTIVIDAD Y SUS COMPONENTES	25
4.3. VENENO DE TITYUS PACHYURUS	27
4.4. CICLO DE DIVISIÓN CELULAR	27
4.5. MUERTE CELULAR	28
4.6. APOPTOSIS	29
4.6.1. Fases de la apoptosis	31
4.6.2. Fase inductora	31
4.6.3. Fase efectora	31
4.6.4. Fase de degradación	32
4.7. ESTUDIO “ <i>IN VITRO</i> ”	33
4.8. LINFOCITOS Y CÉLULAS MONONUCLEARES AISLADAS DE SANGRE PERIFÉRICA COMO MODELOS PARA EVALUACION CITOTÓXICA DEL VENENO	34
4.9. ENSAYOS PARA DETERMINAR LA CITOTOXICIDAD DEL VENENO	35

4.9.1.	Índice Mitótico	35
4.9.2.	Viabilidad Celular	36
4.10.	TÉCNICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE APOPTOSIS Y NECROSIS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EMPLEANDO NARANJA DE ACRIDINA Y BROMURO DE ETIDIO (NA/BE).	36
5.	HIPOTESIS	39
6.	OBJETIVO GENERAL	40
6.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
7.	METODOLOGÍA	41
7.1.	TIPO DE ESTUDIO	41
7.2.	VARIABLES	41
7.3.	MANTENIMIENTO DE LOS ESCORPIONES	42
7.4.	EXTRACCIÓN DEL VENENO	42
7.5.	CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTÉICA , ESTERILIZACIÓN Y DILUCIÓN DEL VENENO	43
7.6.	TRATAMIENTOS	43
7.7.	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	44
7.8.	ENSAYO CITOTÓXICO MEDIANTE ÍNDICE MITÓTICO (IM)	44
7.8.1.	Cultivo	44
7.8.2.	Tratamiento	45
7.8.3.	Cosecha	45
7.9.	CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE H ₂ O ₂	46
7.10.	ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR	46

7.10.1.	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	46
7.10.2.	Cultivo celular	47
7.10.3.	Tratamiento	47
7.10.4.	Lavado	47
7.11.	ENSAYO DE APOPTOSIS	48
7.11.1.	Tinción con Naranja de acridina/ Bromuro de etidio (NA/BE)	48
7.12	DISEÑO EXPERIMENTAL	49
7.13	IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE IM	50
7.14.	IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR	51
7.15.	IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE EL ENSAYO DE APOPTOSIS	51
7.16.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
8.	RESULTADOS	54
8.1.	SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE VENENO	54
8.2.	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	55
8.2.1.	Ensayo de índice mitótico (IM)	55
8.2.2	Ensayo de viabilidad celular (VC)	57
8.2.3.	Ensayo de apoptosis	60
9.	DISCUSIÓN	67
9.1.	CITOTOXICIDAD DEL VENENO	67
9.1.1	Efecto dosis – respuesta del veneno de <i>T. pachyurus</i>	67

9.1.2.	Efecto citotóxico del veneno sobre el índice mitótico (IM)	68
9.1.3.	Efecto citotóxico del veneno sobre la viabilidad celular	69
9.1.4.	Efecto apoptótico inducido por el veneno	72
9.1.5.	Efecto necrótico inducido por el veneno	79
10.	CONCLUSIONES	81
11.	RECOMENDACIONES	82
12.	BIBLIOGRAFIA	83

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Efecto del veneno del escorpión <i>T. pachyurus</i> sobre el Porcentaje promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica. <i>n= 4 -7</i>	56
Tabla 2: Efecto del veneno del escorpión <i>T. pachyurus</i> sobre el porcentaje promedio de viabilidad celular en células mononucleares aisladas de sangre periférica. <i>n= 6 – 10</i>	59
Tabla 3: Efecto del veneno del escorpión <i>T. pachyurus</i> sobre el Porcentaje promedio de células viables, apoptóticas y necróticas en células mononucleares aisladas de sangre periférica. <i>n= 7 – 1.</i>	63

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Morfología de los escorpiones.	25
Figura 2: Mecanismos de muerte celular.	29
Figura 3: Vía interna y externa de la apoptosis.	30
Figura 4: Diferenciación de células apoptóticas y necróticas.	38
Figura 5: Terrario de cada escorpión.	42
Figura 6: Protocolo experimental para ensayo de índice mitótico.	50
Figura 7: Protocolo experimental para ensayo de viabilidad celular con azul de trypan.	51
Figura 8: Protocolo experimental para ensayo de apoptosis con microscopia de fluorescencia (NA/BE).	52
Figura 9: Efecto del veneno del escorpión <i>T. pachyurus</i> sobre el porcentaje promedio de IM en linfocitos humanos cultivados <i>in vitro</i> .	54
Figura 10: Efecto del veneno del escorpión <i>T. pachyurus</i> sobre el porcentaje promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica.	56
Figura 11: Efecto del veneno del escorpión <i>T. pachyurus</i> sobre el Porcentaje promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica.	57
Figura 12: Efecto del veneno del escorpión <i>T. pachyurus</i> sobre el porcentaje promedio de viabilidad celular en células mononucleares aisladas de sangre periférica.	59
Figura 13: Efecto del veneno del escorpión <i>T. pachyurus</i> sobre el porcentaje promedio de viabilidad celular en células mononucleares aisladas de sangre periférica.	60

- Figura 14:** Coloración y morfología de células viables, apoptóticas y necróticas teñidas con (NA/BE). 61
- Figura 15:** Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de células viables, apoptóticas y necróticas en células mononucleares aisladas de sangre periférica. 64
- Figura 16:** Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de células apoptóticas en células mononucleares aisladas de sangre periférica. 65
- Figura 17:** Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de células viables en células mononucleares aisladas de sangre periférica. 66
- Figura 18:** Proceso apoptótico mediado por el Ca^{+2} involucrado en la interacción retículo endoplasmático - mitocondria. 77

INTRODUCCIÓN

Colombia, a nivel biológico se caracteriza por ser un país de gran biodiversidad, atributo que le confiere ser hábitat de diferentes y múltiples especies a nivel de fauna y flora, siendo los escorpiones parte de esta mega diversidad. *T.pachyurus*, es una de las especies representativas de uno de los géneros de escorpiones altamente venenosos, reportados dentro de los cuatro géneros de la familia Buthidae, como los de mayor importancia médica a nivel mundial (Lucas and Meier, 1995; Otero et al., 1998), debido al potencial tóxico del veneno, el cual ha causado efectos nocivos en mamíferos y puede llegar a ser mortal para el ser humano (Charry, 2006). *T.pachyurus* se encuentra distribuido en Colombia, entre los 100 y 1300 metros de altitud, en los departamentos de Boyacá, Caldas, Cundinamarca, Huila, Antioquia y Tolima, principalmente en el valle medio y alto del Magdalena (Florez, 2001).

El veneno de los escorpiones es de tipo neurotóxico y está constituido por una mezcla de péptidos de bajo peso molecular, que reconocen los canales iónicos de las terminales presinápticas de los nervios del sistema nervioso autónomo, originando despolarización, liberación de acetilcolina (incluyendo la placa neuromuscular) y de catecolaminas (Rimsza et al., 1980). También se ha descrito que el veneno de los escorpiones del género *Tityus* tiene una actividad cardiotoxica y pancreatotóxica intrínseca (Rimsza et al., 1980), y además en las manifestaciones clínicas se observa hiperexcitabilidad, hipertermia, disnea, taquicardia, arritmias, hipertensión o hipotensión, sudoración profusa, ataxia, parálisis, insuficiencia cardiaca y alteraciones metabólicas, entre otras patologías (Murillo et al., 1999; Otero et al., 1998; Simard and Watt, 1990), desconociéndose información sobre el efecto citotóxico y apoptótico del veneno del escorpión *T.pachyurus*.

Por lo anterior, el desarrollo de este estudio tiene particular interés de identificar los posibles efectos citotóxicos y apoptóticos del veneno del escorpión *T. pachyurus*, en linfocitos y células mononucleares aisladas de sangre periférica cultivadas “*in vitro*”, mediante las pruebas de índice mitótico (IM), viabilidad

celular con azul de tripan y apoptosis mediante microscopia de fluorescencia con naranja de acridina/ bromuro de etidio (NA/BE); y así, ampliar y generar nuevo conocimiento sobre la actividad biológica del veneno de los escorpiones existentes en Colombia, con posible aplicabilidad de las toxinas, principalmente en terapia carcinogénica y farmacológica.

Las sustancias comúnmente usadas para el tratamiento contra el cáncer, tienen como mecanismo de acción inducir apoptosis (Zhang and Cui, 2007), bloquear el ciclo celular (Goeptar et al., 1995) y disminuir la viabilidad celular de las células tumorales (Puttonen et al., 2008). Bioactividad que caracteriza el alto potencial citotóxico de las drogas anti cancerígenas; por lo tanto se espera, que el veneno de *T. pachyurus* induzca un efecto citotóxico similar al de dichas drogas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se conoce, la mayoría de las drogas anti cancerígenas son citotóxicas, que, al producir daño celular, inducen a la célula a morir por apoptosis, disminuyendo el número de células tumorales. En esta investigación al evaluarse el efecto citotóxico del veneno de *T. pachyurus* en linfocitos humanos de sangre periférica, y su efecto inductor de apoptosis para las células mononucleares aisladas de sangre periférica humana cultivados “*in vitro*”, fue evidente el potencial citotóxico y apoptótico del veneno total, efectos biológicos que caracterizan a las drogas anti cancerígenas.

El veneno escorpiónico, al ser secreciones apócrinas, compuesto de péptidos de bajo peso molecular, que ejercen acción sobre canales iónicos dependientes de voltaje (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻), causan un incremento en la excitabilidad celular mediante la liberación de neurotransmisores (Otero et al., 2004). Esto refleja la actividad biológica desencadenada por el veneno; y de allí, identificar y caracterizar los componentes activos del mismo, en pro de una aplicación biotecnológica.

A nivel mundial, se han venido realizando estudios epidemiológicos y biotecnológico, para neutralizar y/o solucionar los efectos adversos del envenenamiento escorpiónico. Entre las múltiples investigaciones que se han llevado a cabo bajo la premisa de conocer la actividad y aplicación biológica del veneno de los escorpiones, en los últimos años ha surgido un particular interés respecto del potencial citotóxico de los componentes activos del veneno, con posible efecto terapéutico contra el cáncer. Bajo la perspectiva de encontrar en los venenos escorpiónicos, toxinas que puedan inhibir la alta proliferación de las células tumorales, hoy en día se han reportado estudios, en los cuales se corrobora el potencial citotóxico del veneno escorpiónico, mediante la inducción de apoptosis en líneas celulares tumorales. Entre estos estudios se pueden destacar: el veneno del escorpión *Heterometrus bengalensis* Koch, en la India, que induce actividad antiproliferativa y apoptogénica en líneas celulares tumorales (Das Gupta et al., 2007). El potencial terapéutico de la clorotóxina aislada del escorpión Chino

Buthus martensii Karsch para gliomas humanos (Fu et al., 2007), donde se evidencia el potencial citotóxico, apoptótico y la especificidad de la toxina sobre células tumorales. Betancourt y colaboradores (2009) determinaron, mediante ensayos “*in vitro*”, la actividad citotóxica del veneno crudo del escorpión *Rhopalurus junceus* sobre líneas celulares de mieloma murino (P3-X63) y de próstata de rata, encontrándose inhibición del crecimiento en las líneas celulares.

Con la intención de ampliar el conocimiento que se tiene hasta el momento sobre las toxinas de escorpiones, de las que se conocen sólo los efectos fisiológicos que desencadenan en un organismo, pero poco sobre las alteraciones que pueda inducir el veneno en el material celular y genético, se propuso la evaluación del veneno de *T.pachyurus*, mediante las pruebas de índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis, se quiere generar nueva información científica al respecto y plantear el posible potencial terapéutico del veneno del escorpión *T. pachyurus* como tratamiento contra enfermedades como el cáncer, que hoy en día es una de las patologías que afectan gran parte de la población mundial, reportando altas tasas de incidencia y mortalidad (Murillo and Gamboa, 2006).

Para tal fin, con la ejecución de este proyecto se pretende responder los siguientes interrogantes: ¿La exposición de linfocitos humanos cultivados *in vitro*, al veneno de *T.pachyurus* induce efecto citotóxico que se refleje en una alteración del índice mitótico?, ¿el veneno de *T. pachyurus* tiene efecto citotóxico que contribuya a una disminución de la viabilidad de las células mononucleares aisladas de sangre periférica cultivadas “*in vitro*”?, ¿al tener el veneno de *T. pachyurus* efecto citotóxico, será capaz de promover la muerte de las células mononucleares aisladas de sangre periférica cultivadas “*in vitro*” por apoptosis y/o necrosis?

2. JUSTIFICACIÓN

“Las toxinas producidas por diversos organismos, han llamado desde hace mucho tiempo la atención de los investigadores por sus propiedades terapéuticas. Entre los más estudiados se encuentran las serpientes, escorpiones y diversos organismos marinos” (Betancourt et al., 2009). Bajo esta perspectiva, la realización de este estudio fue importante, al hacer evidente el efecto citotóxico y apoptótico inducido por el veneno del escorpión *T.pachyurus*, aportando así, conocimiento importante a la comunidad científica sobre la actividad biológica del veneno, para la cual no existen reportes en las actuales investigaciones.

Los pocos estudios que se reportan a nivel mundial, de los efectos citotóxicos de los venenos de escorpiones, bajo parámetros como Índice Mitótico, Viabilidad Celular y Apoptosis; demuestran el gran potencial biológico que pueden ofrecer las toxinas de origen animal, como posible tratamiento o cura para un sin número de enfermedades degenerativas para la salud humana como lo es el cáncer; tal como lo evidencian los estudios de Das Gupta y colaboradores (2007), Fu y colaboradores (2007) y Betancourt y colaboradores (2009).

En Colombia, no se cuenta con estudios de venenos escorpiónicos que evidencien daño citotóxico e inducción de apoptosis a nivel de células normales y menos en líneas celulares tumorales; lo cual se establece como un vacío en las actuales investigaciones, suscitando este hecho la relevancia del desarrollo de ésta investigación, como punto de partida para la posible aplicabilidad biotecnológica y terapia contra enfermedades como el cáncer; gracias al fraccionamiento y reconocimiento de cada una de las toxinas que componen el veneno, para su posterior selección, y aplicabilidad con fines anti cancerígenos en futuros estudios.

Muchas de las drogas anti cancerígenas tienen como objetivo, causar daño a nivel de membrana o directamente en el ADN para disminuir la densidad de células tumorales. Al estudiar la acción biológica del veneno del escorpión *T.pachyurus*, y evidenciar el potencial citotóxico y apoptótico en linfocitos

humanos cultivados “*in vitro*”, y bajo el contexto de que las sustancias que se usan como terapia contra el cáncer, tienen como efecto biológico bloquear el ciclo celular, inducir apoptosis y con ello, disminuir la viabilidad de las células; justifican esta investigación, y permitirá ver si el veneno del escorpión *T.pachyurus* es fuente de moléculas con uso biotecnológico y terapéutico, en los tratamientos de enfermedades degenerativas como el cáncer, esperando que la apoptosis se convierta en una nueva estrategia de intervención terapéutica (Roos and Kaina, 2006)

La evaluación de la actividad citotóxica del veneno sobre linfocitos de sangre periférica, se llevó a cabo mediante ensayos “*in vitro*”, permitiendo controlar variables externas y factores de confusión (consumo de alcohol, cigarrillo y la dieta) que pueden interferir en los resultados, y así, garantizar que los efectos esperados sean consecuencia directa de la acción del veneno del escorpión *T.pachyurus*. De igual manera, al tomar las pruebas de viabilidad celular y apoptosis como parámetro de daño citotóxico, se emplearon las células mononucleares aisladas de sangre periférica como blanco, debido a que son células que han sido ampliamente utilizadas para determinar las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis (Kerr et al., 1995; Yurtcu et al., 2003).

Para el desarrollo de la investigación se tomó como parámetro de evaluación citotóxica la Apoptosis, que al ser un biomarcador de respuesta expresado en múltiples sistemas celulares, y modulado tanto por factores externos como internos, sirve como punto de control molecular y como indicador sensible y temprano de estrés químico agudo y crónico (Sweet et al., 1999). Bajo dicha premisa, radica la importancia del uso de éste biomarcador mediante la técnica de Microscopia de Fluorescencia, en la determinación de la actividad biológica del veneno del escorpión *T.pachyurus*, lo que permitió cuantificar y cualificar el daño encontrado; ya que al fundamentarse en patrones morfológicos celulares, que permiten visualizar y diferenciar de manera real, fácil y rápida los estadios apoptóticos y necróticos de las células.

3. ANTECEDENTES

El alto índice de accidentalidad causado por picaduras de escorpiones, ha despertado el interés de la comunidad científica en áreas como la biología, toxinología, toxicología, bioquímica y medicina clínica, para identificar los componentes del veneno que son responsables, no solo del efecto tóxico y patológico, sino también el efecto farmacológico de los mismos. Lo anterior ha desencadenado la realización de estudios, que buscan conocer y entender de forma clara, la mezcla compleja de componentes que constituyen el veneno de los escorpiones.

En el siglo XX se comienzan a realizar diversos trabajos con un mayor rigor científico que los que se realizaban a principios del siglo XIX, siendo estudios innovadores, mas detallados y tal vez, con resultados mas contundentes acerca de los componentes químicos, bioquímicos y moleculares del veneno, de sus propiedades y efectos, del mecanismo de acción, e incluso, el empleo de métodos químicos de separación de las fracciones proteicas tóxicas, y su evaluación sobre tejidos celulares específicos.

En el 2004 se determinó la toxicidad y las características inmunoquímicas del veneno del escorpión *Tityus pachyurus*, y su neutralización por tres antivenenos antiescorpión, producidos en Latinoamérica: Alacramyn® del Instituto Bioclón de México; el suero antiescorpiónico del Instituto Butantán de São Paulo Brasil, y el suero antiescorpiónico del Centro de Biotecnología de la Universidad Central de Venezuela Caracas. Donde el escorpión produjo $0,68 \pm 0,20$ mg de veneno por estimulación manual, presentando una dosis letal 50% (DL50) en ratones de 4,8 mg/kg (91,3 mg/ratón de 18-20 g), desencadenando signos de envenenamiento tales como: sialorrea, dificultad respiratoria, sudoración generalizada, ataxia, alteraciones del comportamiento e hiperglicemia. Para los antivenenos de México y Brasil, la dosis efectiva 50% neutralizante del efecto letal, fue de 330 y 292 mg de veneno por ml de antiveneno, respectivamente; mientras que el antiveneno de Venezuela no neutralizó este efecto (Barona et al., 2004).

En el 2006 por medio de cromatografía líquida de alta resolución, se separaron al menos 57 fracciones del veneno del *T. pachyurus*, con la determinación de la secuencia completa de aminoácidos para 3 péptidos. Experimentos electrofisiológicos realizados en células Sf9 sobre canales iónicos, mostraron la presencia del péptido Tpa 1, como potente bloqueador de canales K^+ , y Tpa 2 como bloqueador de canales de Na^+ en cultivos celulares del tipo F-11 y TE671; evidenciando así la caracterización bioquímica del veneno de la especie de estudio (Barona et al., 2006).

En el año 2007, se dan a conocer las características clínicas y los efectos histopatológicos del envenenamiento por los escorpiones de la especie *Tityus pachyurus* presente en Colombia, en un modelo experimental que incluye el estudio de los aspectos biológicos, ecológicos, clínicos y de daño estructural a órganos blanco, mediante el desarrollo de un protocolo de estudio histopatológico como aproximación al Análisis de la actividad biológica de este veneno (Rodríguez, 2008).

Siendo los estudios anteriormente mencionados, los únicos reportados en la literatura científica hasta la fecha, para la especie de estudio *T. pachyurus*.

En relación a la búsqueda de factores con efecto anti-cáncer presentes en los venenos de escorpiones, se viene realizando desde el año 2003, cuando Omran y colaboradores, determinaron el efecto citotóxico y apoptótico inducido por el veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus*, sobre las líneas celulares eucarióticas 293T y C2C12; siendo evidente una alta reducción de la supervivencia celular, daño a nivel del núcleo, lisis de organelas celulares y muerte celular por apoptosis (Omran, 2003). Desde entonces se ha reportado actividad citotóxica y apoptótica de venenos procedentes de diferentes especies de escorpiones. En ese mismo año, Meki y colaboradores realizaron un estudio caso-control en Egipto, para la determinación de la disregulación de apoptosis en niños con envenenamiento escorpiónico, en el cual, a través de los marcadores apoptóticos Fas y Bcl-2, demostraron que el envenenamiento escorpiónico puede incrementar la apoptosis, mediante un aumento del sistema de regulación o activación FAS y un descenso en el sistema de regulación o activación de Bcl-2,

evidenciando las posibles moléculas y rutas de apoptosis que activa los venenos de escorpiones, y en esa medida establecer regímenes terapéuticos con toxinas de origen animal (Meki et al., 2003).

Posteriormente, en un estudio realizado mediante ensayos “*in vivo*” e “*in vitro*” con una fracción tóxica (Clorotoxina: toxina neurotóxica), aislada del veneno del escorpión chino *Mesobuthus*, sobre gliomas humanos (SHG-44), comprobó el efecto bloqueador de la toxina específica para canales de Cl⁻, y la inhibición del crecimiento de las células glioma en relación dosis-dependiente. Sugiriendo que la clorotoxina puede ser vista como herramienta útil, para combatir la progresión tumoral, lo cual evidencia el potencial terapéutico de la toxina escorpiónica para los gliomas humanos y su especificidad ya que la apoptosis inducida en células tumorales y no en células normales se da a consecuencia de la expresión de un receptor de membrana (MMP-2) (Fu et al., 2007).

En el año 2007 se estudió la actividad citotóxica del veneno del escorpión *Heterometrus bengalensis* (escorpión negro de la India), induciendo actividad antiproliferativa y apoptótica sobre las líneas celulares de leucemia humana U937 y K562, encontrándose que las concentraciones de veneno evaluadas bloquearon el ciclo celular en la fase G1, inhibieron el crecimiento celular, y el efecto apoptótico de las células en estadio temprano y tardío fue evidente (Das Gupta et al., 2007).

Un estudio realizado en el 2008 por Zare Mirakabadi y colaboradores, cuantificaron y cualificaron la caracterización de la actividad biológica y farmacológica de la fracción activa del ICD-85 (combinación de 3 péptidos, entre los 10000 y 30000 Da, derivado de los venenos de la serpiente *Agkistrodon halys*, y del escorpión amarillo *Hemiscorpius lepturus*) sobre la línea celular de cáncer de seno MDA-MB-231, mediante la evaluación del efecto citotóxico inducido por el ICD-85, comprobándose que la fracción activa del ICD-85, a altas y bajas concentraciones, induce un daño citotóxico directo sobre la línea celular tumoral, ocasionando daños a nivel de membrana que inducen apoptosis, inhibiendo así su crecimiento celular (Zare Mirakabadi et al., 2008).

En Cuba en el año 2009, Betancourt y colaboradores en ensayos “*in vitro*” determinaron la actividad citotóxica del veneno crudo del escorpión *Rophalurus junceus*, sobre las líneas celulares de mieloma murino (P3-X63) y de próstata de rata (Dunning); teniendo en cuenta la cinética de crecimiento y el ensayo de daño metabólico, concluyeron que el veneno inhibió el crecimiento en la línea celular de mieloma entre un 72,3 y 66,7%, respecto al grupo control en las concentraciones de 1 y 10 mg/mL respectivamente; y a una concentración de 100 ug/mL se redujo el crecimiento celular en un 45,7% en la línea celular de próstata de rata (Betancourt et al., 2009). Actualmente las toxinas aisladas de este escorpión son la base del medicamento “Escozul” para el tratamiento contra diferentes patologías neoplásicas.

En un trabajo semejante a esta investigación, se estudio el efecto citotóxico y apoptótico de la fracción toxica “bengalin” aislada del escorpión *Heterometrus bengalensis* Koch, sobre líneas celulares de leucemia; siendo evidente el bloqueo del ciclo celular, la inhibición de la viabilidad celular y la apoptosis desencadenada por vía mitocondrial en ensayos “*in vitro*” (Gupta et al., 2009).

A la fecha, existen estudios en su mayoría a nivel “*in vitro*”, que demuestran y comprueban la actividad tóxica, citotóxica y apoptótica del veneno de diferentes especies de escorpiones; incluso estudios recientes llevados a cabo con toxinas escorpiónicas aisladas, demuestran que estas tienen efecto sobre la proliferación, viabilidad y muerte celular apoptótica, correlacionándola así, con la actividad antitumoral de los compuestos que hoy en día se utilizan en el tratamiento contra el cáncer. Un estudio “*in vivo*” realizado en el departamento del Cauca, logró determinar el efecto citotóxico y genotóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* en eritrocitos de sangre periférica de ratones, en el cual se sugiere la presencia de compuestos citotóxicos en el veneno capaz de bloquear el ciclo normal de división celular e inducción de apoptosis (Dueñas Cuellar, 2010). No obstante, hasta el momento no se ha evaluado por lo menos en Colombia, el efecto citotóxico del veneno crudo de *T. pachyurus* bajo los parámetros de índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis, o de haberse realizado un estudio semejante, aún no se encuentra reportado en la literatura. Razón por la cual, los resultados aquí obtenidos, constituyen el primer reporte de la actividad biológica

citotóxica del veneno crudo de *T. pachyurus*, asociado con el ciclo de división, viabilidad y muerte celular apoptótica.

Al ser evidente la actividad citotóxica de los venenos de escorpiones, y especialmente sobre líneas celulares tumorales; da pie para pensar que el veneno de *T. pachyurus* al responder con un efecto citotóxico que altere el ciclo de división celular, disminuya la viabilidad de las células e induzca apoptosis como respuesta biológica al daño citotóxico, pueda a futuro ser objeto de estudio para la evaluación de su posible efecto antitumoral sobre líneas celulares específicas

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES DE LOS ESCORPIONES.

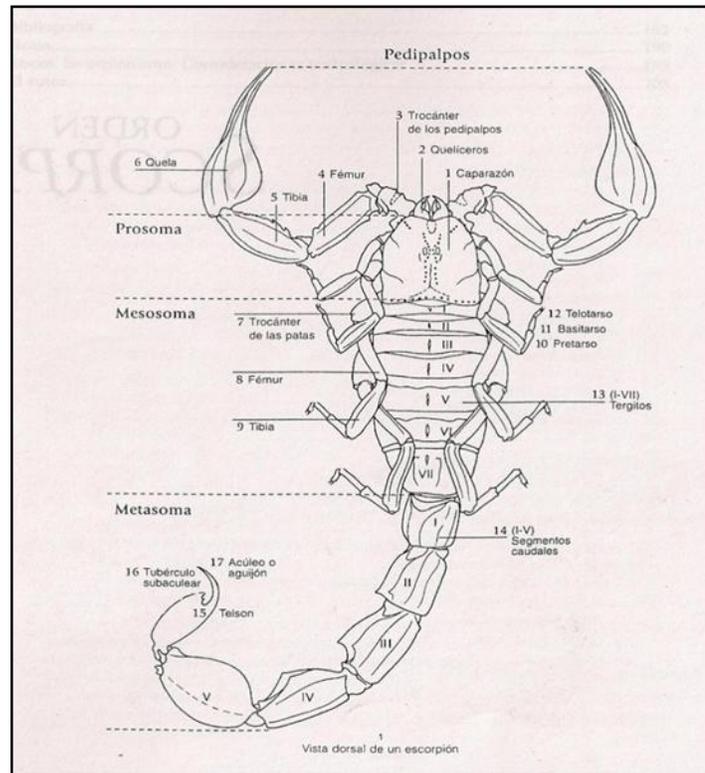
Los escorpiones son quizás los artrópodos venenosos más antiguos, que han sobrevivido a las transformaciones geoclimáticas sin sufrir muchos cambios, al menos fenotípicamente; éstos presentan semejanza con sus ancestros, pero con grandes modificaciones en las estructuras locomotrices y respiratorias (Valderrama et al., 1998). Distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, hasta 50° de latitud norte y sur. En altitud pueden llegar a encontrarse hasta los 5.000 msnm; viven en sabanas, desiertos y principalmente en bosques (Lucas and Meier, 1999).

Sistemáticamente, los escorpiones pertenecen al Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, clase Arachnida, orden Scorpionida, con 22 familias y aproximadamente 1.500 especies distribuidas en todo el mundo (Brownell and Polis, 2001; Lourenço et al., 2003). En Colombia, se encuentran 4 familias con un total de 55 especies: Buthidae (4 géneros, 36 especies), Chactidae (3 géneros, 16 especies), Diplocentridae (1 género, 2 especies) y Liochelidae (antes Ischnuridae: 1 género, 1 especie) (Florez, 2000; Otero et al., 2004). La familia Buthidae, incluye a los escorpiones de mayor toxicidad e importancia médica, *Tityus* (29 sp.), *Centruroides* (2 sp.), *Ananteris* (4 sp.), y *Rhopalurus* (1 sp.) (Otero et al., 2004).

Morfológicamente, el cuerpo del escorpión está dividido en dos regiones: cefalotórax (prosoma) y abdomen. El abdomen se encuentra diferenciado en dos regiones: mesosoma y metasoma. El cefalotórax está dorsalmente cubierto por el caparazón, en el cual se encuentran los ojos medios, los laterales y se articulan 4 pares de patas. En frente del cefalotórax están situados los quelíceros que le sirven para la alimentación y acicalamiento; los pedipalpos que le sirven para la inmovilización de la presa, percepción sensorial, cortejo y apareamiento (Lucas, 1992; Lucas and Da Silva, 1992). La cola está formada por 5 segmentos, y una dilatación terminal que contiene a las 2 glándulas venenosas, conectadas a un

aguijón con un pequeño orificio (telson), por medio del cual el veneno es inyectado (Hjelle, 1990; Lucas and Da Silva, 1992).

Figura 1. Morfología de los escorpiones.



Fuente: Guía para identificar escorpiones de Venezuela (González-Sponga, 1996).

Estos animales son nocturnos, se alimentan de gran variedad de insectos incluyendo cucarachas, grillos y mariposas, y también de algunos vertebrados como lagartos y pequeños roedores. La gran mayoría viven bajo trozos de madera, piedras o bajo la corteza de los árboles; siendo los de hábitos domiciliarios los más peligrosos (Bioclon, 1997; Lucas and Da Silva, 1992), con reproducción sexual y fecundación interna.

4.2 VENENO ESCORPIÓNICO, ACTIVIDAD Y SUS COMPONENTES.

Los venenos de los escorpiones son secreciones apócrinas, compuestas por péptidos de bajo peso molecular, que ejercen acción sobre los canales iónicos dependientes de voltaje (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^-), causando un aumento en la excitabilidad celular, y liberando neurotransmisores (catecolaminas y acetilcolina). Así, el envenenamiento sistémico escorpiónico, está caracterizado por manifestaciones cardiovasculares, pulmonares y neurológicas, poniendo la vida en alto riesgo, particularmente en niños menores de 11 años, debido a complicaciones como: disfunción del miocardio, shock, síndrome de dolor respiratorio agudo (ARDS), edema pulmonar y edema cerebral, entre otras patologías (Becerril et al., 1997; Céard et al., 1992; Couto et al., 1992; Cupo et al., 1994; Hering SE and De Azevedo-Marques, 1992; Ismail, 1995; Otero et al., 1998; Saldarriaga Córdoba and Otero Patiño, 2000).

El contacto físico entre los seres humanos y los escorpiones, resulta en las picaduras de éstos animales al hombre, fenómeno que se conoce como escorpionismo. El accidente escorpiónico se presenta en todos los continentes, pero en ciertas regiones tropicales y subtropicales del mundo, constituye un verdadero problema de salud pública (Dehesa-Davila and Possani, 1994; Rezende et al., 1998). En países como Brasil ocurren entre 8.000 y 21.000 casos por año, en Túnez 40.000 y en México de 200.000 a 250.000, con 0,05-0,27% de muertes por año, en la mayoría niños (Cardona et al., 2002; Dehesa-Davila and Possani, 1994; Rezende et al., 1998; Santalucia et al., 2004). Sin embargo, la vigilancia epidemiológica, la educación comunitaria y la seroterapia oportuna, han sido determinantes para los bajos índices de mortalidad en esos países. En Colombia, la información disponible hasta el momento, demuestra que las especies *T. pachyurus*, y *C. gracilis* en el Tolima y el valle del alto y medio Magdalena, *T. asthenes*, *T. fuehrmanni* y *C. gracilis*, en subregiones de Antioquia y en otras regiones de Colombia que hacen parte de su distribución geográfica, son las especies que pueden llegar a causar envenenamiento moderado a grave y muertes en niños (Otero et al., 2004; Otero et al., 1998).

En Colombia no existe un programa de vigilancia epidemiológica para accidentes escorpiónicos, y solo se conocen cuatro o cinco estudios con enfoque clínico-epidemiológico de este problema en el país (Marinkelle and Stahnke, 1965); lo cual resulta deficiente para el gran número de personas que son picadas al año por escorpiones en los diferentes departamentos de Colombia, siendo evidente, que a nivel nacional el estudio de los venenos de escorpiones se ha centrado más en un enfoque clínico y epidemiológico, rezagando un poco la actividad biológica del mismo.

4.3 VENENO DE TITYUS PACHYURUS.

El veneno de *Tityus pachyurus* tiene una concentración de proteínas de 0,53 mg/mL y contiene proteínas desde menos de 14 kd hasta 97 kd. Este veneno está compuesto por péptidos de bajo peso molecular, que actúan sobre canales iónicos dependientes de voltaje como lo son Na⁺ y K⁺. Estas actúan en membranas excitables, ocasionando una permeabilidad iónica de las mismas (Barona et al., 2006). La sintomatología que presentan las personas picadas por esta especie son: dolor en el sitio de la picadura, taquicardia, vómito, sudoración generalizada, dolor abdominal, deshidratación, taquipnea, hipertensión, entre otras.

4.4 CICLO DE DIVISIÓN CELULAR.

El ciclo celular es fundamental para la reproducción de los organismos. Su función no se limita únicamente a originar nuevas células, sino que asegura que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada, gracias a la existencia de puntos de chequeo que pueden frenar el ciclo ante un error en el mismo. Dicha regulación es catalizada por proteínas específicas como cinasas, ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (cdc). Un ciclo celular típico se caracteriza por realizarse en dos fases: la interfase que se divide en tres fases: G1, S y G2 y la mitosis que se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. Durante el transcurso de estas fases, la célula acumula la energía (ATP) necesaria para el proceso de división y el incremento de tamaño celular; se hace evidente la replicación del ADN nuclear; y finalmente, la célula se prepara para ingresar a Mitosis; evento con el cual culmina el ciclo celular. El

final de la mitosis da cabida a un nuevo ciclo en G1 o puede que la célula entre en fase Go que corresponde a un estado de reposo especial característico de algunas células, en el cual puede permanecer por días, meses y a veces años, dependiendo del tipo celular (Houtgraaf et al., 2006).

En la cotidianidad, el ser humano modula e interactúa con agentes endógenos (ROS: especies reactivas de oxígeno como productos del metabolismo) y exógenos respectivamente; que de alguna u otra manera pueden afectar el buen o mal funcionamiento del organismo. Factores exógenos, ya sea de carácter físicos (radiación ultravioleta y radiaciones ionizantes), biológicos (virus) y químicos, o bien factores endógenos, los cuales, al interactuar con el ADN y generar lesiones, desencadenan así la activación de los puntos de chequeo del ciclo celular en sus fases de G1, S, G2 y mitosis; tiempo en el cual, la célula puede reparar dichos daños y así continuar de manera normal el ciclo celular; cuando dichas lesiones son tan graves, que no vale la pena reparar simplemente se tiene como mecanismo de acción la eliminación por muerte celular programada “apoptosis” de las células. Las lesiones pueden ser mal reparadas, y a consecuencia de ello, la célula continúa con el proceso de división celular pero con daño acumulado en el genoma. Con base a lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que la homeostasis tisular depende de un buen proceso de regulación de división celular y de la apoptosis como mecanismo preventivo de daño en el genoma. De esta manera, si existe un desequilibrio de la homeostasis a consecuencia de un descontrol en el ciclo celular que permita la generación de células con daño no reparado, o de un proceso de apoptosis defectuoso que no pueda eliminar las células dañadas, se suscita el desarrollo de procesos neoplásicos y mal funcionamiento y desarrollo del organismo como tal (Bernstein et al., 2002; Houtgraaf et al., 2006).

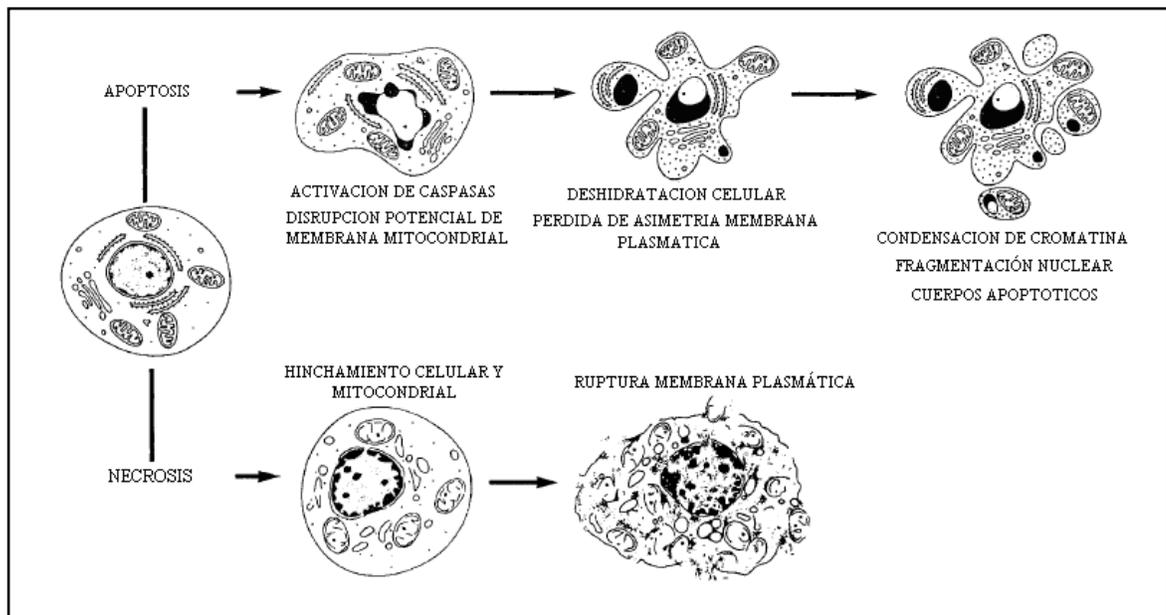
4.5 MUERTE CELULAR.

La muerte celular es un suceso que puede llevarse a cabo bien por mecanismos **apoptóticos o por necróticos**, siendo la necrosis un proceso de muerte celular que acontece cuando una célula sufre un daño riguroso y, a causa de ello, pierde la integridad de su membrana, conllevando así a la muerte por lisis. Bajo este

mecanismo de muerte celular, se libera todo el contenido de la célula al exterior, lo que es posible evidenciar en estudios “*in vivo*” como inflamaciones en el tejido dérmico. A diferencia, la muerte celular por apoptosis, que es una muerte fisiológica que sucede de manera normal en el organismo, estableciéndose como mecanismo de defensa de la célula ante daños irreparables o lesiones graves que no justifican el gasto en exceso de energía por parte de la célula en repararlos.

Para que se desencadene la muerte celular por apoptosis, se hace necesaria la activación de una serie de rutas, que induce que la célula no pierda la integridad de su membrana y finalmente sea fagocitada, para lo cual no existe manifestación de este tipo de muerte en estudios *in vivo* (Alfaro et al., 2000).

Figura 2. Mecanismos de muerte celular



Fuente: Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). (Darzynkiewicz et al., 1997).

Teniendo en cuenta los dos mecanismos de muerte celular que se presentan en un organismo (ver figura 2), se hace evidente que el proceso necrótico, al incluir

liberación de todo su material celular, contribuye de manera indirecta a posibles afecciones en las células que circundan a la célula en proceso de muerte por este mecanismo. Bajo la perspectiva de establecer a la muerte celular, como evidencia de daño citotóxico con posible terapia contra el cáncer, se hace evidente que el mecanismo que más se ajusta a esta finalidad, sería la muerte celular programada o “apoptosis”.

4.6 APOPTOSIS.

El concepto de muerte celular programada, con el término de apoptosis, fue introducido entre los años de 1960 y 1980, basándose en la significancia biológica y morfológica (Kerr et al., 1972; Klion and Schaffer, 1996; Lockshin, 1969; Wyllie et al., 1980) evidenciando así, la expresión de elementos que inducen y controlan las trayectorias de señalización de muerte celular, evento que está presente en todas las células, como proceso heterogéneo que varía según el tipo de célula y el estado del ciclo en el que se encuentra.

Figura3. Vía interna y externa de la apoptosis.

de las rutas de apoptosis mejor definidas (Enari et al., 1998). De igual manera, existe también la inducción de apoptosis vía mitocondrial, mediante la intervención de la macromolécula BCL- 2, la cual es activada por presencia de quiebres de cadena doble en el ADN que son irreparables, conllevando directamente a la célula a apoptosis (Fig. 3) (Roos and Kaina, 2006).

4.6.1 Fases de la apoptosis. Las células que son eliminadas del organismo por apoptosis, atraviesan tres fases: inductora, efectora y degradación, para éxito del proceso (Lozano et al.).

4.6.2 Fase inductora. Se inicia con una inducción dependiente del estímulo de muerte y seguida por la fase de transducción de señales correspondiente. El estímulo inductor es muy variado incluyendo agentes químicos y físicos, activadores fisiológicos asociados a terapias y toxinas, también puede iniciarse por unión de Fas a su ligando. En cualquier caso, se entra en una ruta de transducción de señales activada tras el daño que el estímulo produce en las macromoléculas biológicas, o por acción sobre receptores específicos (CD95/Fas/TNF-R) (Lozano et al.).

4.6.3 Fase efectora. La célula está programada para morir, activándose las enzimas proteolíticas encargadas del proceso, denominadas *caspasas*. Este punto aparece claramente modulado por la familia de proteínas BCL-2, las cuales regulan la fase efectora de la apoptosis. La proteína BCL-2 se encuentra asociada a membranas intracelulares, (mitocondria, retículo endoplasmático y envoltura nuclear). En realidad BCL-2 es un gran grupo de proteínas que dimerizan unas con otras determinando la supervivencia o la muerte; el dímero BCL-2/Bcl-x inhibe la apoptosis mientras que el dímero BCL-2/Bax la favorece (Lozano et al.).

4.6.4 Fase de degradación. Las células muertas son reconocidas y fagocitadas por los macrófagos. La muerte celular se produce después de grandes alteraciones nucleares, de la membrana plasmática y de las mitocondrias. En el núcleo se degrada el ADN y se hace visible condensaciones de cromatina nuclear

formándose aglomeraciones que se desplazan hacia la superficie de la membrana nuclear (Lozano et al.).

Es bien conocido que una multitud de agentes tóxicos inducen apoptosis (etanol, radiación ionizante, especies reactivas de oxígeno y drogas quimioterapéuticas).

La exposición a un xenobiótico (factor externo) y el estrés que éste genera, pueden inducir inestabilidad genética; que de no ser reparada apropiadamente, pueden estar relacionadas con un proceso apoptótico. Bajo éste parámetro, se ha categorizado a esta forma de suicidio celular, como un atractivo biomarcador de respuesta que es expresado en múltiples sistemas celulares, y modulado tanto por factores externos como internos; sirve como punto de control molecular, es un indicador sensible y temprano de estrés químico agudo y crónico, que puede manifestar pérdidas de función y estructura en la salud de un organismo (Sweet et al., 1999).

El enfatizar apoptosis como un biomarcador de respuesta a daño citotóxico, se fundamenta en que ciertos químicos que inducen resistencia a la apoptosis, pueden tender a acelerar genéticamente el daño celular (Bayly et al., 1997; James et al., 1998), y promover el desarrollo de células tumorales (Wright et al., 1994); por lo tanto se puede considerar que los químicos que induzcan muerte celular programada, pueden inhibir el desarrollo de procesos tumorales. Aceptando dicha hipótesis, se establece que la apoptosis asegura que las células mutadas y no funcionales no proliferen (James et al., 1998). Así, se ha argumentado que la apoptosis es un biomarcador de efecto citotóxico, y que un incremento o disminución de la apoptosis puede ser un predictor para el surgimiento de enfermedades neurodegenerativas, hematológicas, daño celular y cáncer, por nombrar algunas (Ibuki and Goto, 2004; Narayanan et al., 2001; Trosko, 1995) y la inducción de apoptosis controlada, funciona como mecanismo de defensa contra algunas de ellas como el cáncer.

Los ensayos que detectan eventos apoptóticos son apropiados como biomarcadores de respuesta, ya que ellos monitorean cualitativa y

cuantitativamente el estrés celular inducido por xenobióticos, y la toxicidad en múltiples tejidos. De ésta manera el ensayo de apoptosis, bajo la detección de las características anteriormente mencionadas en estudios “*in vivo*” e “*in vitro*”, se categoriza como fácil, rápido y relativamente económico. Siendo destacable el ensayo de apoptosis en estudios “*in vitro*”, ya que provee datos efectivos de dosis-respuesta, y es bien aplicable en células sanguíneas para determinar los efectos de xenobióticos, para lo cual no se requiere eutanasia animal, proporcionando clara evidencia de las propiedades del tóxico para disminuir funciones fisiológicas, inmunes y de supervivencia celular (Sweet et al., 1999).

4.7 ESTUDIO “*IN VITRO*”.

Este tipo de ensayo posee varias ventajas, en cuanto a garantizar el control interno de las variables, la rapidez con la que se obtienen los resultados y, la facilidad para reproducirlos; permite determinar de manera clara y concreta la cuantificación del daño inducido por el factor exógeno de estudio, se evita el sacrificio de animales y, en ciertas ocasiones, los resultados de estudios “*in vitro*”, concuerdan con los resultados obtenidos en ensayos “*in vivo*”, lo cual permite que los resultados observados en los ensayos “*in vitro*” puedan ser extrapolables a ensayos “*in vivo*” e inclusive al humano (Hassan et al., 2007).

Bajo condiciones normales en el organismo, la fase final de la apoptosis se caracteriza por la eliminación de las células apoptóticas, mediante el mecanismo biológico conocido como fagocitosis. Macrófagos o células vecinas fagocitan a las células apoptóticas, para evitar así inflamación de tejidos adyacentes. Bajo esta premisa, el estudio “*in vitro*” para la evaluación del biomarcador de respuesta apoptosis, es el ideal ya que permite la fácil y rápida detección de células apoptóticas, por lo que, bajo las condiciones estrictas del protocolo y el tiempo de incubación, existe una menor probabilidad de que dichas células apoptóticas sean fagocitadas por células vecinas (Häcker, 2000).

Es importante mencionar que los linfocitos y las células del sistema inmune en general, requieren de señales extrínsecas para mantener la supervivencia de las

células “*in vivo*”, por lo cual se podría inferir que el efecto citotóxico encontrado en el estudio “*in vitro*”, se debe, en mayor parte, a la respuesta de las células ante la falta de señalización requerida para la supervivencia, y no ante al efecto del agente en este estudio (veneno de *T. Pachyurus*). Por ello, lo que mantiene viables a los linfocitos, aun estando bajo las condiciones de un *ensayo “ in vitro”* es la actividad de citoquinas y la expresión de la proteína Bcl-x_L que expresa este tipo celular; debido justamente a la función anti apoptótica que desempeñan estas moléculas proteicas, garantizando la supervivencia de las células aún estando en condiciones precarias de energía (ATP) e incluso de un bajo porcentaje de proliferación celular (Rathmell and Thompson, 2002). Por lo tanto, bajo las condiciones en que se desarrollo la investigación, le dan confiabilidad y contundencia a los resultados aquí obtenidos.

4.8 LINFOCITOS Y CÉLULAS MONONUCLEARES AISLADAS DE SANGRE PERIFÉRICA COMO MODELOS PARA EVALUACIÓN CITOTÓXICA DEL VENENO.

La utilización de linfocitos humanos como modelo para evaluación citotóxica se debe principalmente a la alta sensibilidad de este tipo celular, lo que permite representar de manera contundente y cuantificable los cambios que se hacen evidentes en función del nivel de exposición a un xenobiótico. De esta manera, los linfocitos son un modelo útil y confiable para la predicción de efectos agudos inducidos por un agente tóxico en condiciones “*in vitro*”, a tal punto de que proponen a este tipo de ensayo como modelo apropiado en la evaluación y producción de drogas (Hassan et al., 2007).

Las células mononucleares aisladas de sangre periférica, para la evaluación del biomarcador de apoptosis, se escogen como modelo fundamentalmente, porque este tipo celular es más sensible a un estímulo apoptótico en comparación con células polimorfo nucleares (Baskic et al., 2006; Rathmell and Thompson, 2002). Con el uso de la alta sensibilidad de este tipo celular, se está evitando al máximo la interpretación de falsos negativos.

4.9 ENSAYOS PARA DETERMINAR LA CITOTOXICIDAD DEL VENENO.

Las pruebas citotóxicas fueron diseñadas para identificar los daños ocasionados en la célula, especialmente en el huso acromático, por agentes químicos, físicos o biológicos. “La citotoxicidad celular, constituye uno de los mecanismos efectores de determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunitario, que consiste en la capacidad para interactuar con otras células y destruirlas” (Lozano et al.). Con base a éste principio biológico, es como se establecen los ensayos citotóxicos como pruebas estándar aptas y eficientes para evaluar la respuesta de las células ante el efecto de algún xenobiótico. Existen diferentes parámetros para medir la citotoxicidad de cualquier sustancia; siendo los más relevantes y útiles: índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis.

4.9.1 Índice Mitótico. El índice mitótico (IM) suministra información importante acerca de sustancias que tienen actividad citotóxica o “citostática”, que es capaz de bloquear el ciclo de división celular, indicando que la célula y su material genético están sufriendo daño y, que a su vez, está tratando de repararlo para impedir que éste continúe y se desencadene una patología (Fenech et al., 1999).

La prueba de IM se ha establecido como un biomarcador de citotoxicidad, y es actualmente muy utilizado, debido a que permite reconocer aquellos xenobióticos con actividad antimitótica, es decir, que inhiben el ensamblaje de las fibras del huso. Por tal razón, las células que son tratadas con un compuesto inhibidor que priva la formación del huso, genera que los cromosomas se acumulen en la fase de metafase del ciclo celular. De allí que drogas como colcemid y colchicina, son empleados para acumular células en metafase y así facilitar los estudios citogenéticos.

El IM está definido como: número de células que se encuentran en mitosis en relación al número total de células analizadas; por lo tanto, la aplicación de la prueba de IM para evaluar alguna sustancia que posiblemente tenga algún efecto bloqueador pre mitótico, disminuirá el IM de las células considerablemente respecto al grupo control. Se establece relación dosis-efecto, cuando el IM disminuye a medida que se incrementa la concentración de la sustancia a evaluar.

Debido a que el IM representa el número de células en mitosis; y teniendo en cuenta que éste es mayor en células tumorales que en células normales (sanas); ésta prueba puede ser de gran utilidad en la evaluación de compuestos que tengan actividad antitumoral (Ikeda et al., 2000).

4.9.2 Viabilidad Celular (VC). La prueba de viabilidad celular evidencia daños a nivel de membrana en la célula, cuando se encuentra expuesta a un agente citotóxico.

Es así como ésta prueba, indica la resistencia que tiene la célula para sobrellevar o resistir el daño ocasionado por el agente citostático. Se establece que cambios en la viabilidad celular están relacionados con alteraciones dañinas en la membrana celular, que al sufrir un daño muy fuerte, ésta pierde la habilidad de controlar el flujo de iones tanto al interior como exterior de la membrana, volviéndose más susceptible de morir. Bajo dicha perspectiva, el parámetro de evaluación de viabilidad celular confirma la probabilidad que tiene una población celular de reparar un daño y/o sobrevivir con él.

4.10 TÉCNICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE APOPTOSIS Y NECROSIS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EMPLEANDO NARANJA DE ACRIDINA Y BROMURO DE ETIDIO (NA/NB).

La realización de la técnica implica principalmente el uso de dos tipos de fluorocromos: naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE), colorantes sintéticos que son moléculas químicas ampliamente usadas para el marcaje de ácidos nucleicos, debido a la afinidad que tienen éstos respecto al ADN y/o ARN.

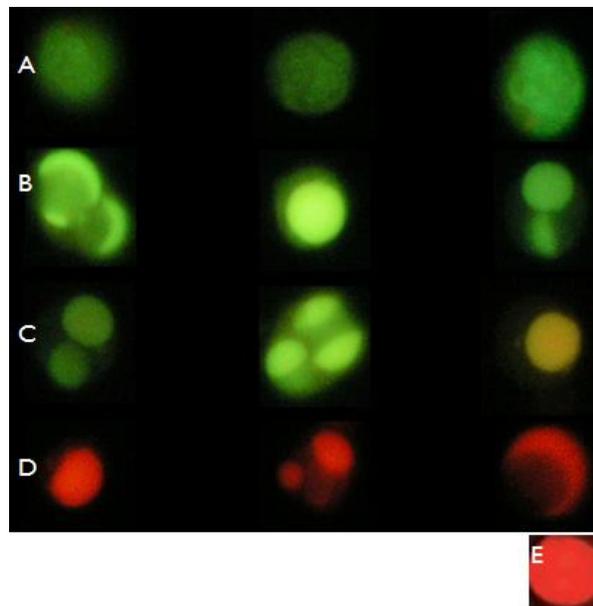
Dichos fluorocromos absorben una determinada longitud de onda y, en respuesta, emiten otra completamente diferente. “Para la técnica en particular, el fluorocromo en el ADN se excita a 480 nm, y emite a 510 nm; y para el ARN el fluorocromo se excita a 440 nm/470 nm y emite a 650 nm”. (Trujillo, 2009).

La cuantificación de las células apoptóticas mediante el uso de esta técnica, se basa en dos características biológicas principales que son: la permeabilidad de la membrana y los aspectos morfológicos de la misma. Bajo el principio de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, los colorantes, en las células apoptóticas, se comportan de la siguiente manera: el naranja de acridina, al ser un fluorocromo que colorea al material celular, tiñe la doble cadena de ADN, al intercalarse entre las bases púricas y pirimidínicas de éste, ya que tiene aproximadamente las mismas dimensiones de las bases nitrogenadas (Klugs and Cummings, 1999). El naranja de acridina detecta y diferencia las células viables de las no viables, ya que, si la célula es viable, emite fluorescencia de color verde homogéneo (se ha intercalado el colorante con la cadena doble de ADN), y si la célula no es viable emite fluorescencia de color rojo (por intercalación del colorante con hebras sencillas de ADN o desnaturalizadas). El bromuro de etidio penetra únicamente en células no viables a consecuencia de un daño en la membrana celular, emitiendo así fluorescencia naranja o roja (intercalación del colorante con el ADN).

Bajo el parámetro de los aspectos morfológicos de las células, se tiene en cuenta los estamentos propuestos por Baskic y colaboradores (2006). Los criterios se fundamentan en la forma (condensación de la cromatina- núcleos teñidos) y coloración de las células (emisión de fluorescencia), permitiendo establecer e identificar cuatro tipos de células así: las **células viables**, son aquellas que presenten un tamaño normal y coloración verde homogénea (figura 1a). Las **células en apoptosis temprana**, son aquellas que aún conservan las membranas intactas, pero ya el ADN ha empezado a sufrir un daño y manifestar ciertas hendiduras, condensación de cromatina visible en pequeños parches de color verde brillante, lo que se le ha dado como nombre “célula viable apoptótica” (figura 1b). Es importante hacer mención que las células que están en apoptosis temprana manifiestan una gran variedad de cambios morfológicos, que, para poder clasificarlas, se debe tener en cuenta una gran variedad de criterios tales como: estructura celular totalmente esférica, disminución de tamaño, presencia de *blebs* (pequeñas invaginaciones esféricas que surgen de la membrana celular), y células cuya coloración del núcleo es amarillo/naranja lo que indica el paso de la célula de apoptosis temprana a apoptosis tardía (figura 1c). Las **células en**

apoptosis tardía, presentan en el núcleo una coloración roja/naranja con condensación o fragmentación de cromatina, evidenciándose los cuerpos apoptóticos (figura 1d). Finalmente las **células necróticas**, en las cuales el núcleo presenta una coloración uniforme roja/naranja con una estructura celular organizada y de gran tamaño (figura 1e).

Figura 4. Diferenciación de células apoptóticas y necróticas.



Fuente: Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in humanleukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide (Cardona et al., 2002).

Al evaluar la apoptosis como biomarcador de respuesta citotóxica, siendo monitor cualitativo y cuantitativo de estrés y toxicidad inducida por agentes xenobioticos, se está demostrando que la célula no solamente asegura el transcurso normal de división celular, sino que impide que un daño en el material genético se acumule, traspase y mantenga dando Origen a mutaciones.

5. HIPÓTESIS

Si el veneno de *Tityus pachyurus* tiene efecto citotóxico, se espera que el índice mitótico (IM) en las células tratadas con las distintas concentraciones del veneno de *T.pachyurus*, disminuya significativamente respecto al IM de las células del control negativo (células no tratadas); de lo contrario, el IM de las células tratadas será igual o incluso mayor que el de las células no tratadas.

Si el veneno de *Tityus pachyurus*, tiene efecto citotóxico que reduzca la viabilidad celular de las células mononucleares de sangre periférica cultivadas *in vitro*, se espera que el porcentaje de viabilidad celular disminuya significativamente en las células tratadas con las concentraciones del veneno de *T.pachyurus*, en relación a las del grupo control; de lo contrario, el porcentaje de viabilidad celular será igual o incluso mayor.

Si el veneno de *Tityus pachyurus* tiene efecto citotóxico, se espera que la proporción de células apoptóticas y /o necróticas, sea mayor en las células tratadas con las concentraciones de veneno (alta, media y baja) que en las células no tratadas; y que en las células tratadas con las diferentes concentraciones de veneno, la proporción de células apoptóticas sea mayor que las necróticas.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto citotóxico del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* (BUTHIDAE) en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Determinar el efecto citotóxico del veneno del escorpión *T.pachyurus*, en linfocitos humanos de sangre periférica cultivados "*in vitro*", mediante la prueba de índice mitótico.

Evaluar el efecto citotóxico del veneno del escorpión *T. pachyurus*, en células mononucleares aisladas de sangre periférica cultivados "*in vitro*", mediante la prueba de viabilidad celular.

Identificar si el efecto citotóxico del veneno del escorpión *T. pachyurus*, en células mononucleares aisladas de sangre periférica cultivados "*in vitro*", es por inducción de apoptosis y/o necrosis mediante microscopia de fluorescencia con naranja de acridina y bromuro de etidio.

7. METODOLOGÍA

7.1 TIPO DE ESTUDIO.

El estudio es de tipo experimental “*in vitro*” con diseño de bloques completos aleatorizados; cada bloque representa a cada experimento, y cada experimento incluye todos los tratamientos por duplicado. El registro de la variable dependiente se hizo posteriormente al tratamiento. Una vez cuantificado el veneno del escorpión *T.pachyurus*, se realizó un pre ensayo de citotoxicidad mediante índice mitótico en linfocitos de sangre periférica. En primer lugar se evaluaron 8 concentraciones del veneno y los respectivos controles: positivo mitomicina C (MMC) y negativo solución salina (NaCl), el cual se repitió 3 veces hasta la determinación de las 3 concentraciones experimentales del veneno (alta, media y baja). Una vez establecidas las concentraciones experimentales del veneno (alta, media y baja), se evaluaron mediante 3 pruebas de índice mitótico y, luego mediante 5 pruebas de viabilidad celular con azul de trypan, y finalmente 5 pruebas para la determinación del efecto citotóxico del veneno por apoptosis y/o necrosis mediante microscopia de fluorescencia con naranja de acridina y bromuro de etidio (NA/BE); siendo estos últimos llevados a cabo con células mononucleares aisladas de sangre periférica humana. Cada prueba contó con un control positivo (MMC para índice mitótico y H₂O₂ para viabilidad celular y apoptosis), un control negativo (NaCl), y su respectiva réplica, para cada experimento.

7.2 VARIABLES.

Surgen cuatro variables en el estudio: la variable independiente, que es la concentración de veneno, categorizada como concentración alta, concentración media y concentración baja y los respectivos controles (positivo y negativo); y tres variables dependientes que son el índice mitótico, el porcentaje de viabilidad celular y el porcentaje de células apoptóticas, respectivamente. Cada una de las variables son de naturaleza cuantitativa continua, se miden a escala de razón y pueden resumirse en todas las estadísticas existentes.

7.3. MANTENIMIENTO DE LOS ESCORPIONES.

Los escorpiones de la especie *T. pachyurus*, colectados en el departamento del Huila, se mantuvieron en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Del Cauca (CIBUC), en terrarios de plástico individuales con suministro de agua permanente mediante un algodón húmedo, y alimentación con insectos, cada 15 días. La temperatura y humedad promedio es de 20 °C y 70% respectivamente.

Figura 5. Terrario de cada escorpión.



7.4 EXTRACCIÓN DEL VENENO.

El veneno se obtuvo de un total de 10 ejemplares de *T. pachyurus*, por estimulación eléctrica, empleando corriente directa de 30 V utilizando un estimulador (Lafayette instruments). Con pinzas se tomó al animal por la cola, y se inmovilizó manualmente con un inmovilizador de escorpiones. En los segmentos cerca al telson, se le proporcionaron 5 impulsos eléctricos de manera

consecutiva; las gotas se colectan en el tubo eppendorf (Gibco lc1010). El veneno se liofilizó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

7.5 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTÉICA, ESTERILIZACIÓN Y DILUCIÓN DEL VENENO.

Se tomó el veneno colectado en los tubos eppendorf (Gibco lc1010) y se aforaron a 1200 µl con agua Milli-Q, paulatinamente, luego se llevaron al vortex (Fisher) hasta que el veneno se disolvió completamente en el agua; cuando el veneno estuvo completamente disuelto, se centrifugó (Labne mod. Z233MK-2) a 15000 rpm, por 15 minutos a 15 °C. Se retiró el sobrenadante con micropipeta y se depositó en nuevos eppendorf limpios. La cuantificación protéica del veneno se hizo por el método de Biuret, 1967 con modificaciones. Se utilizaron tubos de 15 ml (Fisher 14-959-49a) para preparar la mezcla. Inicialmente se adicionó como patrón de calibración albúmina bobina (BSA), agregando volúmenes de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100 µl a cada tubo; luego agua Milli-Q en volúmenes de 1500, 1490, 1480, 1470, 1460, 1450, 1440, 1430, 1420, 1410 y 1400 µl respectivamente y, por último el reactivo de Biuret 1500 µl a cada tubo para un volumen total de 3000 µl. De igual manera, en dos tubos de 15 ml se adicionaron 50 µl de veneno a cada uno, luego 1450 µl de agua Milli-Q y por último 1500 µl de Biuret, para obtener un volumen final de 3000 µl en cada tubo. Se dio vortex y se dejaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyó en el espectrofotómetro (Thermo mod. Genesys 10 UV) a 540 nm. Con los datos obtenidos se realizó una curva de calibración (*PEARSON*) y se tomó la ecuación de la curva ($Y = mx + b$) despejando la variable, y obteniendo así los datos de concentración de proteínas del veneno. Finalmente se hicieron alícuotas de 2mg, se liofilizó y almacenó a -20°C hasta su uso.

Una vez determinada la concentración proteica, se preparó una solución madre de 2 mg/mL, disuelto en NaCl al 0.9%. Después de haberlo diluido, el veneno fue esterilizado con un miliporo de 0.22 µm, y finalmente se prepararon las alícuotas de veneno con cada una de las concentraciones a evaluadas ($3,6 \times 10^{-2}$ mg/mL, $2,4 \times 10^{-2}$ mg/mL, $1,8 \times 10^{-2}$ mg/mL, $1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL, 6×10^{-3} mg/mL, 6×10^{-4} mg/mL, 6×10^{-5} mg/mL, 6×10^{-6} mg/mL, 6×10^{-7} mg/mL, 6×10^{-8} mg/mL y 6×10^{-9} mg/mL)

7.6 TRATAMIENTOS.

Para las tres pruebas de citotoxicidad, los tratamientos fueron los siguientes: El control negativo fue solución NaCl al 0.9 %, que también de uso como solvente del veneno. Para las concentraciones experimentales de veneno, se realizó un primer ensayo de índice mitótico evaluándose 8 concentraciones de veneno, posteriormente se redujeron a 4 y finalmente las 3 concentraciones de veneno experimentales: alta, media y baja, las cuales se evaluaron en las dos pruebas siguientes de viabilidad celular y apoptosis; dichas concentraciones se escogieron bajo los criterios que se enuncian más adelante en el numeral 8.1. El control positivo utilizado para la prueba de índice mitótico fue MMC (SIGMA M- 4287), cuyo efecto mutagénico y clastogénico ha sido identificado en células de mamífero, al igual que en linfocitos de sangre humana cultivados “*in vitro*” e “*in vivo*” (Goeptar et al., 1995; Sehlmeier et al., 1996). Para los ensayos de viabilidad celular y apoptosis, el compuesto utilizado como control positivo fue el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), ya que es considerado un potente agente oxidante que induce apoptosis en linfocitos humanos (Marini et al., 1996) y puede alterar la viabilidad celular (Lee et al., 2005). La concentración escogida fue aquella que indujo mayor porcentaje de células apoptóticas, en comparación con el control negativo, mediante la identificación con microscopia de fluorescencia con naranja de acridina y bromuro de etidio (NA/BE). Finalmente se evaluaron dos concentraciones de H_2O_2 , para tener un parámetro de comparación de porcentaje de células apoptóticas y necróticas.

7.7 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.

Las muestras de sangre fueron extraídas por venipunción con vacutainer heparinizados, bajo las mejores condiciones de asepsia por personal capacitado, la muestra se tomó en horas de la mañana y en ayuno. El donante escogido cumplió a cabalidad los criterios de: edad adulta, género masculino y saludable, no consumo de bebidas alcohólicas y/o cigarrillo, persona no expuesta ocupacionalmente a sustancias químicas y que no haya estado sometida a algún tipo de tratamiento médico prolongado en el momento del desarrollo del estudio.

7.8 ENSAYO CITOTÓXICO MEDIANTE ÍNDICE MITÓTICO (IM).

7.8.1 Cultivo. Se realizaron cultivos de 5 ml, cada uno con 0.5 ml de sangre total, 4.5 ml de medio *RPMI- 1640* (Sigma R8758), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco # 200-6140), 1% de L-glutamina (Gibco # 320-5039) y 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (*Gibco # 600-514*), y finalmente 2% de fitohemaglutinina (Sigma L8754-56). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C (Incubadora Memmert typ- BM 800) hasta el tiempo de la cosecha.

7.8.2 Tratamiento. 24 horas después de realizada la siembra, los cultivos se trataron con 0.1 ml de NaCl a una concentración final en el medio de 0.018% (control negativo), 0.1 ml de MMC (control positivo) a una concentración final en el medio de 0.05 µg/ml, y 0.1 ml de las diferentes concentraciones de veneno, a las concentraciones finales de: $3,6 \times 10^{-2}$ mg/mL, $2,4 \times 10^{-2}$ mg/mL, $1,8 \times 10^{-2}$ mg/mL, $1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL, 6×10^{-3} mg/mL, 6×10^{-4} mg/mL, 6×10^{-5} mg/mL, 6×10^{-6} mg/mL, 6×10^{-7} mg/mL, 6×10^{-8} mg/mL y 6×10^{-9} mg/mL

7.8.3 Cosecha. 46 horas después de realizada la siembra, los cultivos se trataron con Colcemide (Gibco 600-5145) a una concentración final de 0.1 µg/ml, y dos horas más tarde se centrifugaron (*Sorvall Deutont mod. T600B*) a 800 – 1000 rpm por 8 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió con cuidado el botón celular, se agregaron a cada cultivo 6 ml de solución hipotónica (*KCL 0.075 M*) y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a cada uno de los cultivos se le agregó 2 ml de fijador carnoy (metanol *Fisher A 4524* y ácido acético *Fisher A 385212* en proporción 3:1); se dejaron aproximadamente 1 minuto como prefijación y posteriormente se centrifugaron. Se retiró el sobrenadante y se fijaron tres veces más, cada cultivo, con 5 ml de carnoy, centrifugando y descartando el sobrenadante después de cada fijación (Lavados). Para la primera fijación, la suspensión celular se llevó a refrigeración en nevera (*Lab –Line Mod. 3551*) por un periodo de 20 minutos y continuando con posteriores fijaciones.

Posteriormente se realizó el goteo de la suspensión celular resultante de la última fijación, sobre placas limpias y bien frías. Una vez la suspensión celular estaba sobre las placas, estas se llevaron a un plato caliente entre 40 y 45 °C por 6

minutos para su secado. Pasados tres días, se realizó la tinción del extendido celular utilizando solución de Giemsa al 6% (*SIGMA 9641*). Luego se procedió a la observación y lectura de placas en microscopio de luz (*NIKON Y-S2-T2*) bajo el objetivo de 40 x (Hoyos et al., 2002).

Finalmente, se calculó el índice mitótico así:

$$IM = \frac{\text{No. de células en mitosis}}{\text{No. total de células analizadas}} \times 100$$

7.9 CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE H₂O₂.

Para la selección de la concentración óptima de H₂O₂ (Carlo Erba 412072005), que se empleó como control positivo en los ensayos de viabilidad celular y apoptosis, para establecer el efecto citotóxico del veneno, se realizó con base al dato reportado por Marini y colaboradores (1996) a una concentración de 50 μM, la cual ya ha sido estandarizada y corroborada por las investigaciones de Trujillo (2009) y Coronel (2008), para los ensayos correspondientes, y una adicional de 2 μM de H₂O₂.

7.10 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.

El ensayo de viabilidad celular se llevó a cabo de la siguiente manera:

7.10.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica. En cámara de flujo laminar (Flo-w 120v), se preparó una mezcla de sangre y PBS (Sigma P3813) estéril, en un relación 1:1 (10 ml de sangre y 10 ml de PBS) en tubos de poliestireno estériles de 50 ml (Falcon) (Fenech et al., 1999). Cuidadosamente fue transferida a otro tubo de 50 ml (Falcon) que contenía 20 ml de histopaque (Sigma

1077-1). Este tubo se centrifugó a 2600 rpm por 30 minutos (Sorvall Deutont mod. T600B). Con pipeta pasteur (Fisher13-678-6C), se retiró las células mononucleares (linfocitos y monocitos) ubicada entre el plasma sanguíneo y el histopaque; estas fueron transferidas a otro tubo de 50 ml estéril (Falcon), y se lavaron con 20 ml de PBS (Sigma P3813) a un periodo de centrifugación de 1300 rpm por 13 minutos (Sorvall Deutont mod. T600B), descartando el sobrenadante. Se realizaron dos lavados más bajo las mismas condiciones de centrifugación, pero adicionando 15 y 10 ml de PBS respectivamente (Sigma P3813). Seguido a esto, del precipitado celular que se obtuvo del último lavado, se tomó 20 μ l y se mezclaron con 20 μ l de azul de trypan (Sigma T 6146). De esta última mezcla, se tomaron 10 μ l y se llevaron al hemocitómetro para el conteo de viabilidad celular pre- tratamiento. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular, considerado aceptable a partir del 95% (Gomes et al 2007). Finalmente, al conocer el número de células vivas (incoloras), se logró ajustar el volumen requerido de suspensión celular para sembrar una densidad de 3×10^5 células/ml.

7.10.2 Cultivo celular. En tubos eppendorf de 2 ml (*GIBCO LC1010*) se depositó un volumen de 200 μ l de precipitado celular (densidad de 3×10^5 células/ml) en 290 μ l de medio RPMI 1640 suplementado (ver cultivo celular en numeral 6.5.1) y un volumen 10 μ l de PHA (Sigma L8754-56) (concentración final en el medio 2%), esto, para completar un volumen total de 500 μ l por cada microcultivo.

Posteriormente, los microcultivos se llevaron a incubación a 37°C hasta el tiempo de lavado.

7.10.3 Tratamiento. 24 horas después de realizada la siembra, los microcultivos se centrifugaron a 1200 rpm, por 5 minutos, e inmediatamente después a 1600 rpm por 2 minutos en microcentrifuga (Centrifuge 5415D para eppendorf); Posteriormente, en cámara de flujo laminar (*FLO-W 120v*) se les retiró, a cada microcultivo, 400 μ l del sobrenadante, luego se les agregó 380 μ l de medio RPMI 1640 (Sigma R8758) con L-glutamina a una concentración final del 1% (Gibco # 320-5039) sin suero bovino fetal. Cada microcultivo fue tratado con 10 μ l de las concentraciones de veneno: $3,6 \times 10^{-2}$ mg/mL, $1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL y 6×10^{-3} mg/mL, como control positivo se trató con H_2O_2 a concentraciones de 50 μ M y 100 μ M,

equivalentes a una concentración final en el medio de 1 μM y 2 μM respectivamente, y como control negativo NaCl. Finalmente, los microcultivos se llevaron a incubación a 37°C, por 24 horas más.

7.10.4 Lavado. Transcurrido el tiempo de efecto del tratamiento, los microcultivos fueron centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos e inmediatamente después a 1600 rpm por 2 minutos en microcentrifuga (Centrifuge 5415D para eppendorf); luego se descartó el sobrenadante, y se adicionó a cada microcultivo 400 μl de PBS (Sigma P3813) y se centrifugaron nuevamente bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, después del último lavado a los microcultivos se les adicionó 2000 μl de medio simple; de los cuales para determinar la viabilidad celular post- tratamiento, se tomaron 10 μl de la suspensión celular y se mezclaron con 10 μl de azul de trypan al 0.01% (Sigma T 6146); de la mezcla anterior se tomaron 10 μl y se llevaron al hemocitómetro para el conteo celular.

En total, se contaron 100 células en microscopio de luz (Nikon y-s2-t2) bajo el objetivo de 40x, incluyendo las células vivas (incoloras) y las células muertas (coloreadas de azul) tanto para la viabilidad celular pre y post tratamiento (Plewa et al., 2004). Finalmente, el porcentaje de viabilidad celular fue calculado mediante la siguiente fórmula matemática:

$$\% \text{ células viables} = \frac{\text{células viables}}{\text{células no viables} + \text{células viables}} \times 100$$

7.11 ENSAYO DE APOPTOSIS.

De la suspensión celular, de la cual se tomó para la lectura de viabilidad celular post tratamiento, se tomaron las células para la lectura de apoptosis. El procedimiento de tinción celular fue el siguiente:

7.11.1 Tinción con Naranja de acridina/ Bromuro de etidio (NA/BE). Sobre un portaobjetos limpio, se depositó 1 µl de mezcla de Naranja de acridina/ Bromuro de etidio (preparado a partir de 1.25 µl de NA a 1000 µg/ml con 1.25 µl de BE a la misma concentración, y diluyendo ambos colorantes en 22.5 µl de PBS (SIGMA P3813)), posteriormente, sobre la mezcla anterior, se adicionaron 25 µl de suspensión celular (densidad de 1×10^5 células/ml), e inmediatamente se llevó la placa al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400 con filtro BA515, filtro de excitación de 450-490 nm, lámpara de mercurio de 100 W, objetivo de 40x plan Fluor) para la observación de las células, cuya clasificación se realizó de acuerdo con los parámetros establecidos por Baskic y colaboradores (2006); donde se tuvo en cuenta el estado morfológico de la cromatina y su emisión de fluorescencia, de la siguiente manera: **células viables**, aquellas cuya cromatina fue verde homogénea (VH) y de tamaño normal con membrana intacta. **Células en apoptosis temprana**, aquellas que conservaron el color verde de las células viables y su membrana celular intacta pero tenían el núcleo con cromatina lobulada (VL). **Células en apoptosis tardía**, aquellas con cromatina anaranjada y fragmentada (NF). **Células necróticas**, aquellas con núcleo anaranjado o rojo y cromatina homogénea (NH), debido a la alta degradación de la membrana que permite una fácil permeabilidad para el bromuro de etidio (Baskic et al., 2006).

Cabe aclarar que, para el registro de células apoptóticas, también se incluyeron las células que presentaron cromatina de color verde-amarillo o amarillo naranja, visualizadas así debido a que el bromuro de etidio, únicamente marca las células no viables de color naranja, debido a que penetra a través de la membrana, permitiendo así la identificación de una célula que pasa de apoptosis temprana a una apoptosis tardía.

El porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas, se calculó mediante las siguientes formulas matemáticas:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{VH}{VH + VL + NH + NF} \times 100$$

$$\% \text{ células apoptóticas} = \frac{VL + NF}{VH + VL + NH + NF} \times 100$$

$$\% \text{ células necróticas} = \frac{NH}{VH + VL + NH + NF} \times 100$$

7.12 DISEÑO EXPERIMENTAL

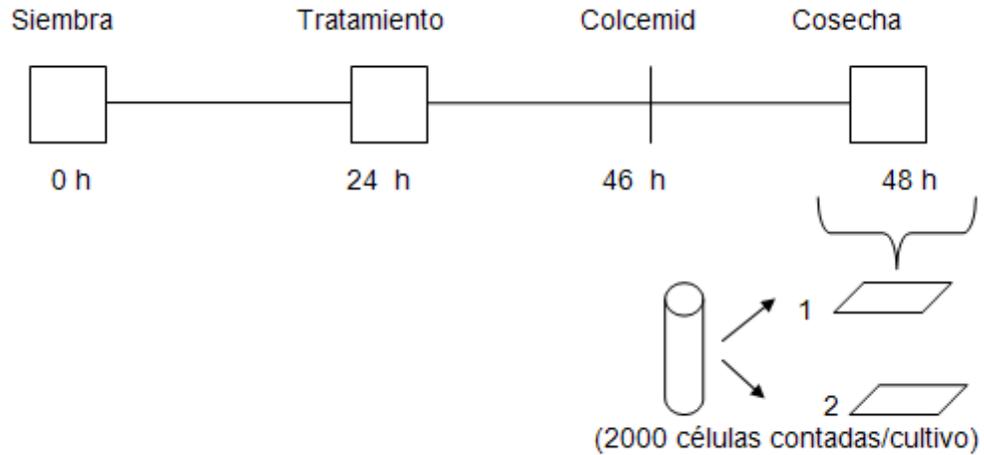
A continuación se ilustra el diseño experimental de cada una de las pruebas de citotoxicidad realizadas, en las cuales el tamaño de la muestra equivale al número total de cultivos sembrados en cada ensayo, incluyendo las respectivas repeticiones, que fueron en total: 3 para índice mitótico, 5 para viabilidad celular y 5 para apoptosis. La unidad experimental es cada cultivo y la unidad de muestreo es igual al número de células contadas en cada uno de ellos.

7.13 IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE IM.

En el primer ensayo de citotoxicidad se establecieron 20 cultivos, en el segundo ensayo se sembraron 14 cultivos y en el último ensayo un total de 10 cultivos; en cada uno de ellos se aleatorizaron los tratamientos con su respectiva réplica. De cada cultivo se gotearon 2 placas para un total de 4 placas por tratamiento y, por cada cultivo, se contaron 2000 células (1000 células por placa, 4000 células por tratamiento). Los resultados se expresaron en términos de porcentaje.

El protocolo realizado en el ensayo se ilustra a continuación:

Figura 6. Protocolo experimental para ensayo de índice mitótico



7.14 IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR.

Para la prueba de viabilidad celular se sembraron 10 microcultivos, 2 por cada tratamiento. De cada cultivo se montó una placa, se registraron 100 células por placa (200 por tratamiento). Los resultados se expresaron en términos de porcentaje.

El protocolo realizado en el ensayo se ilustra en la figura 7.

7.15 IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE EL ENSAYO DE APOPTOSIS.

Los microcultivos sembrados fueron los mismos del procedimiento anterior, la tinción se realizó con la misma suspensión celular. Se montó una placa por cultivo,

se contaron 200 células por cultivo (400 células por tratamiento). Los resultados se expresaron en términos de porcentaje.

El protocolo realizado en el ensayo se ilustra en la figura 8.

Figura 7. Protocolo experimental para ensayo de viabilidad celular con azul de trypan.

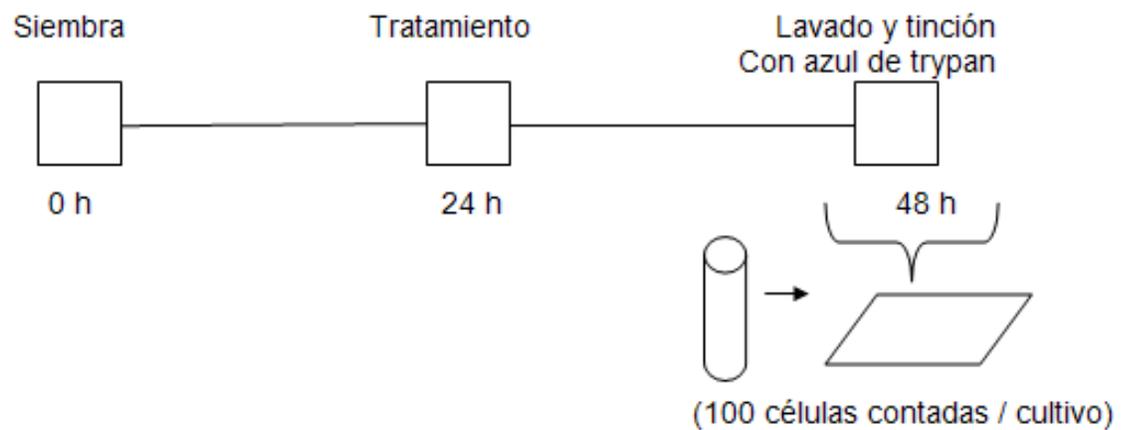
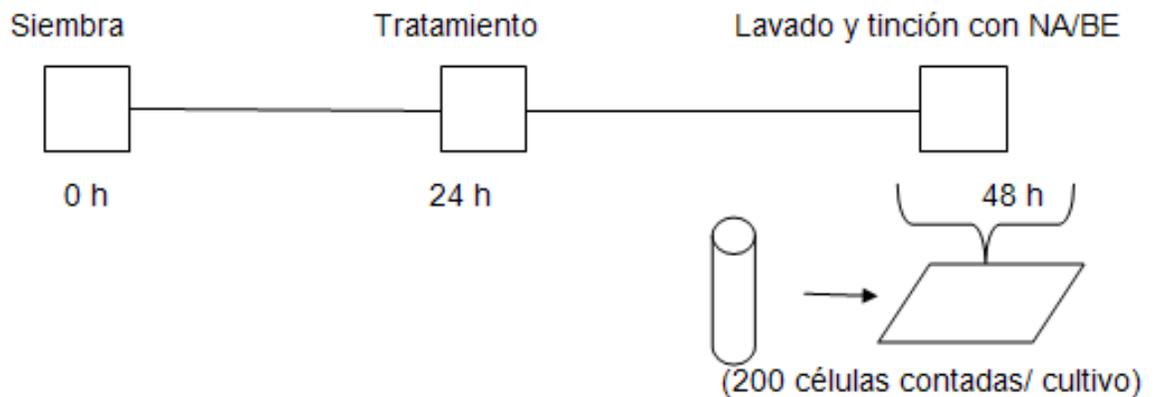


Figura 8. Protocolo experimental para ensayo de apoptosis con microscopía de fluorescencia (NA/BE).



7.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos de Índice Mitótico (%) se acomodan a la distribución normal (*Kolmogorov-Smirnov*: $p= 0,2$) y las varianzas de las muestras que se comparan son homogéneas (*Levene*: $p= 0,1$); sin embargo, por el pequeño tamaño de la muestra ($n=6$) se hizo un análisis con prueba no paramétrica *Kruskal Wallis*, complementada con prueba *U de Mann whitney* para la comparación por parejas.

Los datos de viabilidad celular (%) y apoptosis (%) se acomodan a la distribución normal (*Kolmogorov-Smirnov*: $p= 0,2$) y las varianzas de las muestras que se comparan son heterogéneas (*Levene*: $p < 0,001$). Por lo tanto el análisis se hizo con prueba paramétrica, *análisis de varianza* (Anova), complementada con prueba de comparaciones múltiples para varianzas no homogéneas *T3 de Dunnet*.

Además, se identificó el tipo de asociación entre las concentraciones del veneno en valor codificado en orden ascendente, y cada uno de los biomarcadores del estudio (índice mitótico (IM), viabilidad celular (VC) y apoptosis), mediante análisis de curva de mejor ajuste.

Los códigos empleados fueron: 1: control negativo; 2: concentración baja de veneno (6×10^{-4} mg/mL); 3: concentración media de veneno ($1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL); 4: concentración alta de veneno ($3,6 \times 10^{-2}$ mg/mL).

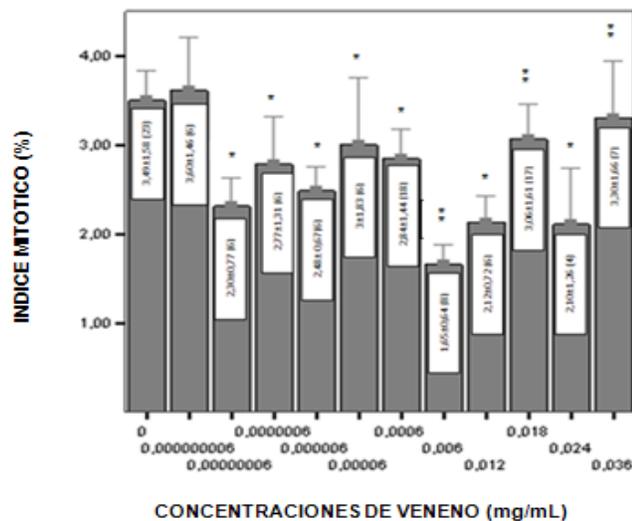
8. RESULTADOS

8.1 SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE VENENO.

La identificación de las tres concentraciones de veneno utilizadas en los ensayos de citotoxicidad, se determinaron de la siguiente manera: se hicieron varios experimentos que en total comprendieron 11 concentraciones de veneno: $3,6 \times 10^{-2}$ mg/mL, $2,4 \times 10^{-2}$ mg/mL, $1,8 \times 10^{-2}$ mg/mL, $1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL, 6×10^{-3} mg/mL, 6×10^{-4} mg/mL, 6×10^{-5} mg/mL, 6×10^{-6} mg/mL, 6×10^{-7} mg/mL, 6×10^{-8} mg/mL y 6×10^{-9} mg/mL.

En la figura 9 se reportan los promedios de IM correspondientes a cada una de las concentraciones con su desviación estándar y el número de repeticiones. Entre los promedios de las diferentes concentraciones de veneno no se identificó diferencia significativa estadísticamente ($p = 0,11$). Tampoco se determinó relación dosis-efecto negativa ni positiva; es decir, que el IM varía aleatoriamente al aumentar la concentración.

Figura 9. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de IM en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.



* Concentraciones de veneno que difieren significativamente respecto del control negativo.

** Concentraciones de veneno seleccionadas en el estudio.

En consecuencia, la selección de las tres concentraciones experimentales para la determinación del efecto citotóxico, no se hizo con base al criterio tradicional (**Concentración alta:** Disminuya el IM hasta un 20% respecto al control negativo, **Concentración media:** Disminuya el IM en un 50% respecto al control negativo, y **Concentración baja:** IM semejante al control negativo). Simplemente se escogieron con base en la diferencia significativa respecto del control negativo, independientemente de la relación dosis-efecto, siendo las concentraciones experimentales las siguientes 6×10^{-4} mg/mL, $1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL y $3,6 \times 10^{-2}$ mg/mL (Ver figura 9).

8.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.

8.2.1 Ensayo de índice mitótico (IM). En la tabla 1 se registran los promedios de IM obtenidos en n repeticiones, junto con sus medidas de variabilidad, de cada uno de los tratamientos (control negativo, control positivo y concentraciones de veneno), las cuales fueron empleadas en los ensayos de viabilidad celular y apoptosis.

Tabla 1. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el Porcentaje promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica. $n= 4 -7$

Tratamientos (mg/ml)	Promedio de IM (%) \pm Error Estándar (n)
0,000 (control negativo)	4,71 \pm 0,20 (6)
0,0006	2,69 \pm 0,16(7)*
0,012	3,53 \pm 0,40(5)*
0,036	4,50 \pm 0,51 (4)
0,00005 MMC (control positivo)	1,35 \pm 0,16 (5)
$p < 0,001$	

n = Tamaño de muestra (repeticiones). 2000 células analizadas por repetición.

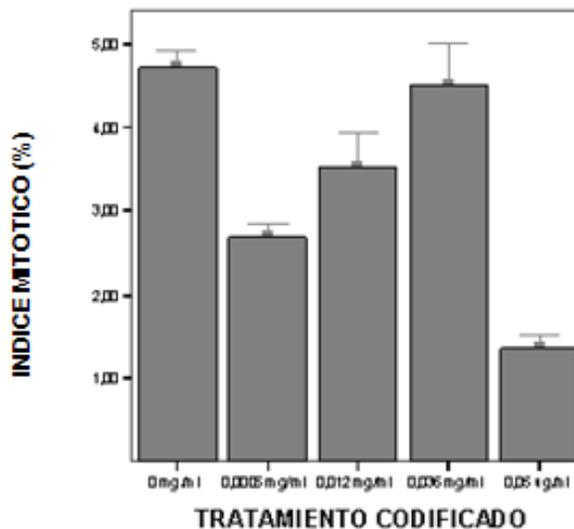
* Concentraciones de veneno para las cuales el IM difiere significativamente respecto al control negativo, determinado mediante la prueba de comparaciones por parejas *U de Mann Whitney*.

p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis*.

Mediante prueba de comparaciones por parejas, se logró establecer lo siguiente:

Las concentraciones de veneno cuyo promedio de IM difieren significativamente ($p = 0,003$ y $p = 0,02$) del IM del control negativo (NaCl) fueron la concentración baja de 6×10^{-4} mg/mL, con un IM de $2,69\% \pm 0,16\%$ y, la concentración media de $1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL con un IM de $3,53\% \pm 0,40\%$ respectivamente; Por lo tanto, se puede afirmar que el veneno de *T. pachyurus* a estas concentraciones tiene efecto citotóxico. La concentración baja de veneno al reducir el IM casi a la mitad del IM reportado para el control negativo, hace evidente un marcado efecto citotóxico a dicha concentración. (Ver figura 10).

Figura 10. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica.



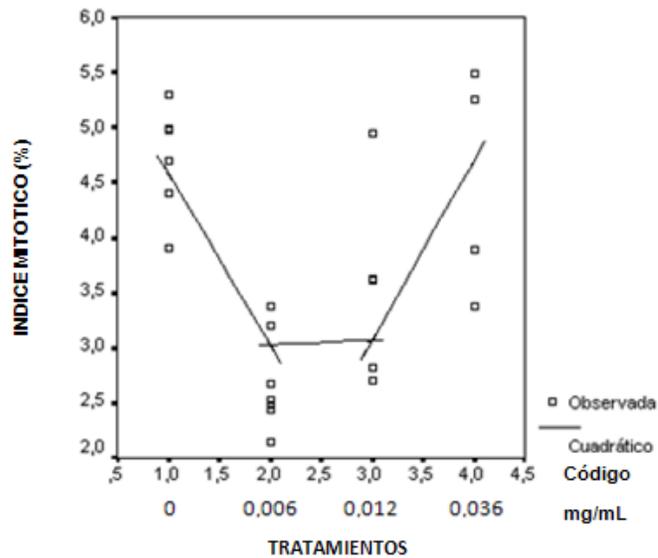
La concentración alta ($3,6 \times 10^{-2}$ mg/mL) no difiere significativamente ($p = 0,83$), del control negativo pero si del control positivo ($p = 0,014$) y, en consecuencia, se puede concluir que, a esta concentración, el veneno de *T. pachyurus* no tiene efecto citotóxico (ver figura 10).

Evidenciándose así que a menor concentración mayor toxicidad; efecto dosis-respuesta inverso al esperado.

En la figura 11 se presenta la curva de mejor ajuste, significativa estadísticamente ($p = 0,000$), que describe la relación entre la concentración del veneno (codificado) y los porcentajes de IM.

La relación es de tipo cuadrática y se describe mediante la ecuación: $IM (\%) = 7,71 - 3,93(\text{concentración codificada}) + 0,79(\text{concentración codificada})^2$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,556$, indicando que la variabilidad del IM depende en un 55,6 % de la variabilidad en la concentración codificada de veneno.

Figura 11. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el Porcentaje promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica.



8.2.2 Ensayo de viabilidad celular. En la tabla 2 se registran los porcentajes promedio de viabilidad celular, obtenidos en n repeticiones, junto con las medidas

de variabilidad, de cada uno de los tratamientos (control negativo, control positivo y concentraciones de veneno).

Tabla 2. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de viabilidad celular en células mononucleares aisladas de sangre periférica. $n= 6 - 10$

Tratamientos (mg/ml)	Promedio de células viables (%) \pm Error Estándar (n)
Viabilidad pre- Tratamiento	98,2 \pm 0,32 (9)
Viabilidad post -tratamiento	
0,000 (control negativo)	96,66 \pm 0,56 (10)
0,0006	62,86 \pm 1,54 (10) * +
0,012	83,13 \pm 0,74 (10) *
0,036	87,74 \pm 0,45 (10) *
1 uM H ₂ O ₂ (control positivo)	55,74 \pm 1,69 (10)
2 uM H ₂ O ₂ (control positivo)	44,16 \pm 1,83 (6)
$p < 0,001$	

n = Tamaño de muestra (repeticiones). 100 células analizadas por repetición.

* Concentraciones de veneno para las cuales la VC difiere significativamente respecto al control negativo, determinado mediante la prueba de comparaciones múltiples *T3 de Dunnet*.

+ Concentración de veneno que no difiere significativamente respecto al control positivo (1uM H₂O₂).

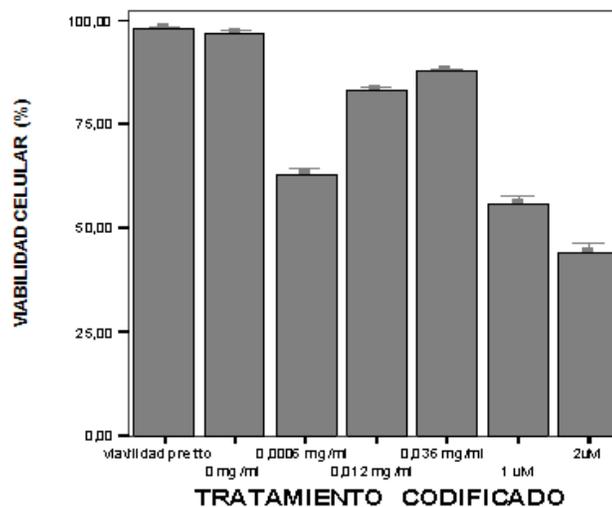
p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba paramétrica ANOVA.

La viabilidad celular (%), en las pruebas sin tratamiento (viabilidad pre-tratamiento), es alta, con un promedio de 98,2% \pm 0,32%. Esto está dentro de lo esperado, corroborando que las células en condiciones normales (sin tratamiento), crecen sin restricciones.

Mediante prueba de comparaciones múltiples, se identificó diferencia significativa ($p= 0,000$), entre el promedio de VC (%) de cada concentración de veneno (mg/mL) respecto al control negativo. De igual manera, se identificó una diferencia significativa respecto del control positivo (1 uM de H₂O₂), excepto para la concentración baja de veneno 6×10^{-4} mg/mL ($p= 0,10$). En consecuencia, se puede afirmar que el veneno de *T. pachyurus*, a las concentraciones aquí evaluadas reducen significativamente la VC (%), respecto del control negativo, siendo la mas citotóxica, la concentración baja de veneno (6×10^{-4} mg/mL) y la menos citotóxica la concentración alta, contrario a lo esperado. Además, el veneno de *T. pachyurus*, a la concentración baja (6×10^{-4} mg/mL), es tan citotóxico como el control positivo (1uM H₂O₂), del cual no difiere significativamente ($p= 0,10$) (ver figura 12).

En esta investigación, el control positivo (H₂O₂), se aplicó a dos concentraciones: 1uM y 2uM. La concentración alta de 2uM H₂O₂, es muy citotóxica, superando incluso significativamente el efecto citotóxico de la concentración baja de veneno (ver figura 12).

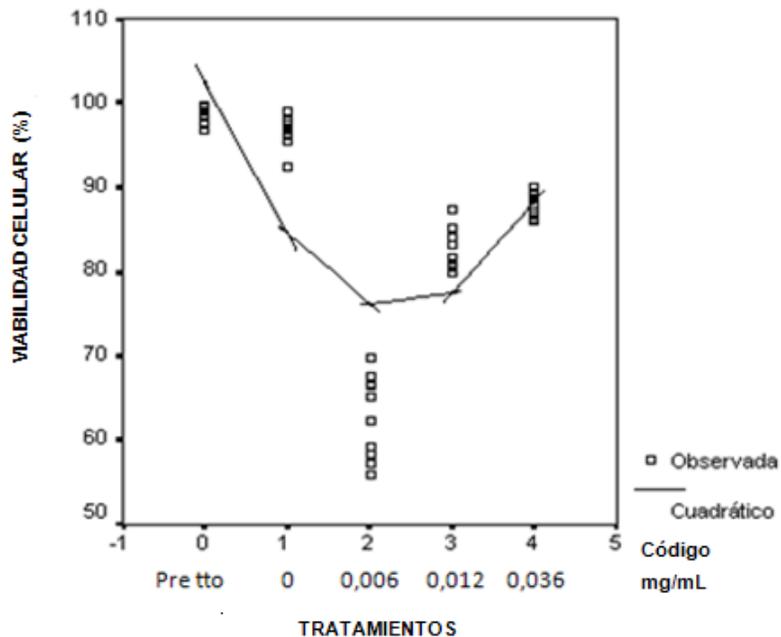
Figura 12. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de viabilidad celular en células mononucleares aisladas de sangre periférica.



En la figura 13 se presenta la curva de mejor ajuste, significativa estadísticamente ($p = 0,000$), que describe la relación entre la concentración del veneno (codificado) y los porcentajes de VC.

La relación es de tipo cuadrática y se describe mediante la ecuación: $VC (\%) = 102,46 - 22,73 (\text{concentración codificada}) + 4,80 (\text{concentración codificada})^2$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,508$, Indicando que la variabilidad de la VC depende en un 50,8 % de la variabilidad en la concentración de veneno codificado.

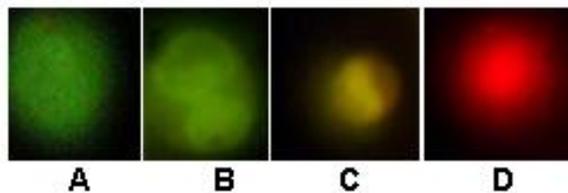
Figura 13. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de viabilidad celular en células mononucleares aisladas de sangre periférica.



8.2.3 Ensayo de apoptosis. La coloración y morfología de las células observadas en el microscopio de fluorescencia (objetivo 100x), mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio (NA/BE), se muestran en la figura 14. Las cuales

fueron escogidas siguiendo los parámetros establecidos por Baskic y colaboradores (2006), donde el estado morfológico de la cromatina y su emisión de fluorescencia permitieron la identificación de células viables, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas.

Figura 14. Coloración y morfología de células viables, apoptóticas y necróticas teñidas con (NA/BE).



A) Célula viable, B) célula apoptótica temprana, C) célula apoptótica tardía, D) célula necrótica

En la tabla 3 se registran los porcentajes promedio de células apoptóticas, necróticas y viables, obtenidos en n repeticiones, junto con las medidas de variabilidad de cada uno de los tratamientos (control negativo, control positivo y concentraciones de veneno).

Mediante la prueba de comparaciones múltiples se hizo evidente lo siguiente: para el porcentaje de células apoptóticas, existe diferencia significativa estadísticamente ($p = 0,000$) entre las concentraciones. La concentración baja de veneno (6×10^{-4} mg/mL), con un promedio de células apoptóticas de $54,94\% \pm 1,07\%$, es la que induce un mayor porcentaje de apoptosis.

Tabla 3. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el Porcentaje promedio de células viables, apoptóticas y necróticas en células mononucleares aisladas de sangre periférica. $n= 7 - 14$

Tratamientos (mg/ml)	Células	Promedio de células (%) \pm Error Estándar (n)
0,000 (control negativo)	Viables	58,16 \pm 1,03 (14)
0,0006		30,42 \pm 0,83(10) ^{* +}
0,012		42,40 \pm 1,27(10) [*]
0,0360		47,31 \pm 3,63 (10)
1 uM H ₂ O ₂ (control positivo)		28,86 \pm 0,69 (10) [*]
2 uM H ₂ O ₂ (control positivo)		17,44 \pm 0,73 (7) [*]
$p < 0,001$		
0,000 (control negativo)	Apoptóticas	29,60 \pm 1,18 (14)
0,0006		54,94 \pm 1,07 (10) ^{* +}
0,012		43,49 \pm 1,10 (10) [*]
0,0360		42,26 \pm 3,78 (10)
1 uM H ₂ O ₂ (control positivo)		57,30 \pm 1,09 (10) [*]
2 uM H ₂ O ₂ (control positivo)		57,17 \pm 2,84 (7) ⁺
$p < 0,001$		
0,000 (control negativo)	Necróticas	12,23 \pm 0,79 (14)
0,0006		14,59 \pm 0,46 (10)
0,012		14,10 \pm 0,55 (10)
0,0360		11,12 \pm 1,86 (10)
1 uM H ₂ O ₂ (control positivo)		13,17 \pm 1,64 (10)
2 uM H ₂ O ₂ (control positivo)		29,67 \pm 2,63 (7) [*]
$p < 0,001$		

n = Tamaño de muestra (repeticiones). 200 células analizadas por repetición.

* Concentraciones que difieren significativamente respecto al control negativo, calculado mediante prueba de comparaciones múltiples *T3 de Dunnet*

+ Concentraciones que no difiere significativamente respecto al control positivo (1 uM H₂O₂).

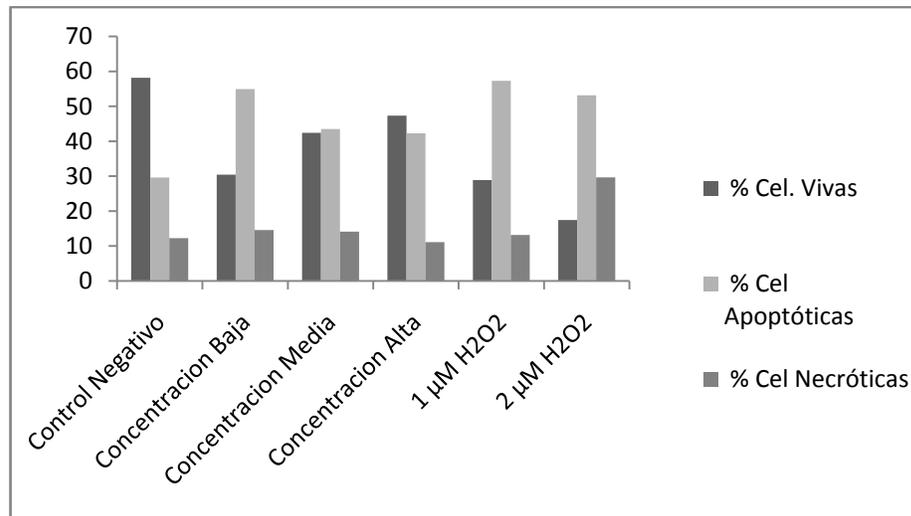
p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba paramétrica ANOVA.

Al analizar las diferencias estadísticas en el % de células apoptóticas que presentan las concentraciones de veneno respecto al control positivo (1uM H₂O₂), se hizo evidente que la única concentración de veneno que no presenta diferencia significativa estadísticamente ($p = 0,83$), es la concentración baja lo cual permite inferir que la apoptosis inducida por el veneno de *T. pachyurus* a la concentración baja (6×10^{-4} mg/mL), es similar a la inducida por el peróxido de hidrogeno a una concentración de 1uM H₂O₂; sustancia modelo de inducción de apoptosis (ver figura 15).

La concentración media de veneno de $1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL, difiere significativamente ($p = 0,000$) respecto al control negativo y de igual manera difiere ($p = 0,000$) del control positivo 1uM H₂O₂, y la concentración alta de $3,6 \times 10^{-2}$ mg/mL, no presenta diferencia significativa ($p = 0.1$) respecto al control negativo. Evidenciándose que el efecto apoptótico, a la concentración media, no es tan drástico como la concentración baja y a la concentración alta, definitivamente no hay efecto apoptótico (ver figura 15).

Para el porcentaje de células necróticas se identificó que no existe diferencia significativa ($p = 1$) entre las concentraciones de veneno de *T. pachyurus* respecto al control negativo y positivo (1uM H₂O₂). Se identificó diferencia significativa ($p = 0,004$) entre las concentraciones de veneno y el control positivo a la concentración de 2uM H₂O₂, a la que le corresponde un promedio de células necróticas de $29,67\% \pm 2,63\%$ (ver figura 16). La concentración de peróxido de hidrogeno a la concentración de 2uM, induce una mayor proporción de muerte celular por necrosis (ver figura 15).

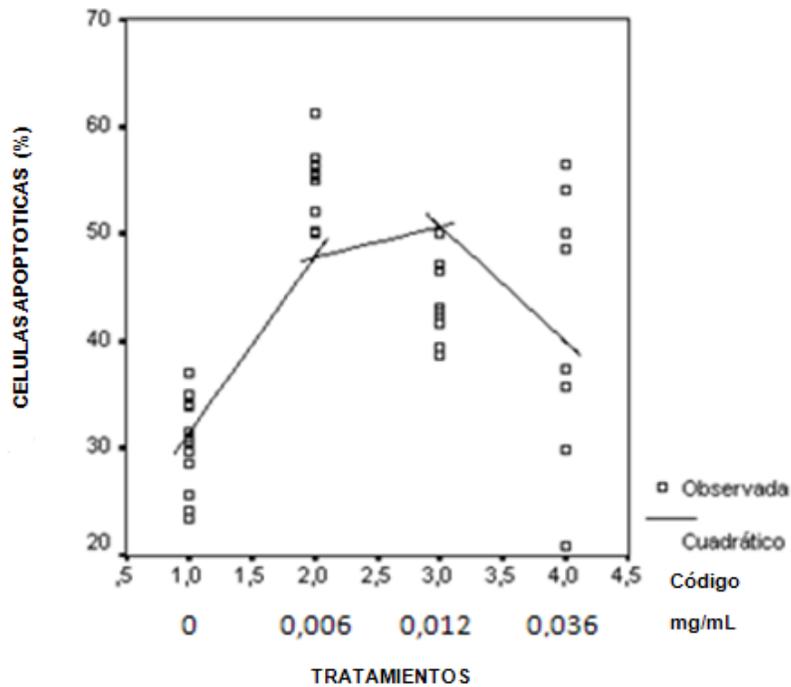
Figura 15. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el Porcentaje promedio de células viables, apoptóticas y necróticas en células mononucleares aisladas de sangre periférica.



En la figura 16 se presenta la curva de mejor ajuste, significativa estadísticamente ($p = 0,000$), que describe la relación entre la concentración del veneno (codificado) y los porcentajes de células apoptóticas.

La relación es de tipo cuadrática y se describe mediante la ecuación: células apoptóticas (%) = $1,19 + 36,92(\text{concentración codificada}) - 6,81(\text{concentración codificada})^2$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,48$ Indicando que la variabilidad de las células apoptóticas depende en un 48 % de la variabilidad en la concentración de veneno codificado.

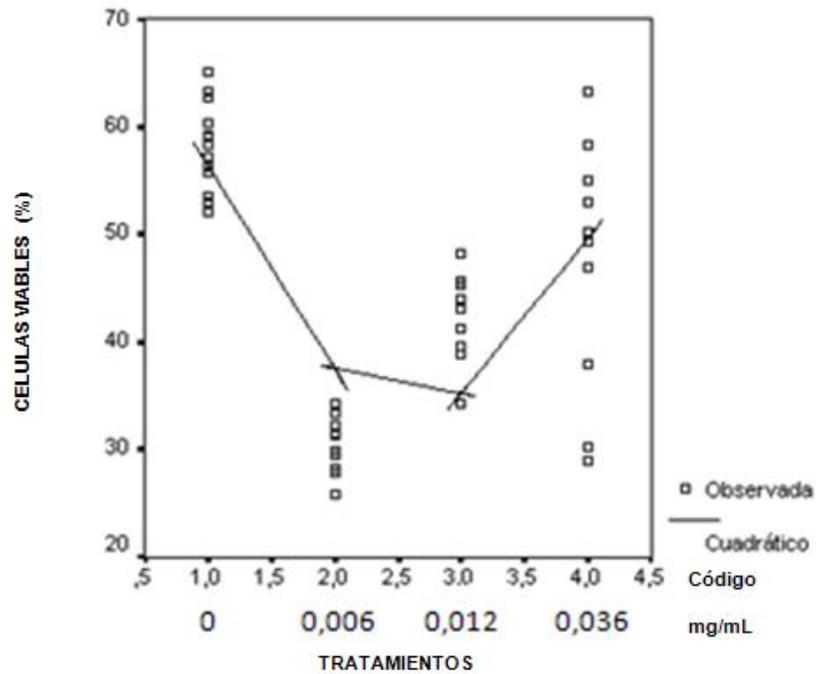
Figura 16. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de células apoptóticas en células mononucleares aisladas de sangre periférica.



En la figura 17 se presenta la curva de mejor ajuste, significativa estadísticamente ($p = 0,000$), que describe la relación entre la concentración del veneno (codificado) y los porcentajes de células viables.

La relación es de tipo cuadrática y se describe mediante la ecuación: células viables (%) = $92,05 - 93,02(\text{concentración codificada}) + 8,33(\text{concentración codificada})^2$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,56$ Indicando que la variabilidad de las células viables depende en un 56 % en la variabilidad de la concentración de veneno codificado.

Figura 17. Efecto del veneno del escorpión *T. pachyurus* sobre el porcentaje promedio de células viables en células mononucleares aisladas de sangre periférica.



Como era de esperar, las dos curvas son opuestas (ver figura 16 y 17), confirmando que la reducción en el número promedio de células viables se debe principalmente al incremento en la muerte celular por apoptosis.

9. DISCUSIÓN

9.1 CITOTOXICIDAD DEL VENENO.

En esta investigación se observó que a la concentración baja de veneno (6×10^{-4} mg/mL) de *T.pachyurus* el efecto citotóxico y apoptótico fue mas marcado respecto a las otras concentraciones evaluadas, infiriendo que dicho efecto puede ser por péptidos presentes en este veneno, con actividad para canales de Ca^{+2} ; ya que algunos trabajos han demostrado que toxinas con actividad en este tipo de canales causan alteraciones en la proliferación, viabilidad y muerte celular por apoptosis (Das Gupta et al., 2007; Gupta et al., 2009; Omran, 2003).

9.1.1. Efecto dosis – respuesta del veneno de *T.pachyurus*. Al no ser evidente una relación dosis-efecto dependiente de las concentraciones de veneno evaluadas, donde a menor concentración existe mayor toxicidad; Betancourt y colaboradores (2009), al evaluar el efecto citotóxico del escorpión *Rophalurus junceus* sobre las líneas celulares de mieloma de ratón Balb/c P3-X63/AG8/653 y Dunning R3327-G de próstata de ratas Copenhagen, encontraron que las concentraciones bajas de veneno (1 a 10 μ g /ml) indujeron efecto citotóxico sobre la línea celular de mieloma, mientras que en la línea celular Dunning, la concentración alta de veneno (100 μ g/ml) fue la que indujo el efecto citotóxico; sumado a ello, en ambas líneas celulares, la actividad del veneno del escorpión evaluado no respondió a la relación dosis – efecto dependiente. Los investigadores, justifican este fenómeno posiblemente a un efecto de saturación del complejo ABC presente en la membrana celular, el cual es un trasportador de membrana presente desde bacterias hasta el humano, y se caracteriza por ser altamente específica para péptidos y proteínas relacionados estructuralmente.

Otra posible razón es debido a un efecto de resistencia a la toxina a altas dosis, debido a la sobreexpresión de la proteína MDR1, presente en la membrana celular, y cuya función, es exportar fármacos al exterior celular induciendo resistencia a estos. Este mecanismo esta descrito para pequeños fármacos hidrófobos, sin embargo para corroborar dichas hipótesis y el mecanismo de

acción molecular del veneno, los investigadores sugieren el diseño de nuevos experimentos que corroboren lo planteado anteriormente (Betancourt et al., 2009). Un estudio realizado por Gupta y Gomes (2009), para evaluar una fracción (Bengalin) del veneno del escorpión *Heterometrus bengalensis Koch* en dos líneas celulares (leucemia y linfocitos humanos normales), mostró un efecto apoptótico significativo en la línea celular de leucemia, pero no en los linfocitos humanos normales. Sumado a ello, lo encontrado por Betancourt y colaboradores (2009), da pie para inferir que el efecto tóxico de los venenos escorpiónicos depende del tipo celular y de la concentración a la cual se ve efecto.

Es evidente, que el mecanismo de acción del veneno no solo depende de la concentración, sino también del tipo celular y/o tejido sobre el cual las concentraciones de veneno son evaluadas, lo cual muestra la importancia de evaluar el veneno de *T. pachyurus* en un tipo de línea celular diferente para determinar si, bajo otras condiciones el veneno tiene un comportamiento similar a bajas y altas concentraciones o, por el contrario, sigue el mismo comportamiento evidenciado en linfocitos humanos de sangre periférica.

9.1.2. Efecto citotóxico del veneno sobre el índice mitótico (IM). La concentración baja de veneno de *T. pachyurus* (6×10^{-4} mg/mL), disminuye drásticamente el IM respecto del control negativo, como respuesta a un daño pre mitótico, por lo tanto su posible capacidad de disminuir la proliferación celular por bloqueo del ciclo, puede ser en las fases de G_0 a G_1 , síntesis o G_2 .

La concentración baja de veneno (6×10^{-4} mg/mL) que deprimió significativamente el IM, y que también indujo un mayor porcentaje de células apoptóticas, semejante incluso, al registrado en el control positivo (H_2O_2 1 μ M), permite inferir una clara correspondencia entre el bloqueo premitótico del ciclo celular y la apoptosis. Dicha asociación se ha denominado “catástrofe mitótica” o “muerte mitótica”, que involucra similitud en las características morfológicas de la mitosis y apoptosis, sugiriendo un rumbo común en la proliferación celular y la muerte inducida, siendo así la apoptosis una propuesta abortiva de la mitosis (Erenpreisa et al., 2000).

Estudios realizados “*in vitro*” con toxinas escorpiónicas sobre líneas celulares cancerígenas, en su mayoría con fracciones aisladas, evidencian su efecto citotóxico con capacidad del bloquear en una fase específica del ciclo celular (Betancourt et al., 2009; Das Gupta et al., 2007; Gupta et al., 2009).

La literatura reporta que los venenos escorpiónicos que poseen efecto citotóxico que altera el ciclo celular, lo hacen bloqueando específicamente en la transición de fase G_0 a G_1 (Das Gupta et al., 2007), en la cual la célula es susceptible a la inducción de apoptosis (Ortega-Camarillo et al., 2001). La transición de la fase G_0 a G_1 del ciclo celular se caracteriza por la ocurrencia de eventos biológicos como el incremento del material enzimático, alta actividad bioquímica (replicación de organelas), síntesis y formación de moléculas proteicas claves para la buena replicación celular; por lo tanto, las toxinas escorpiónicas al bloquear en este fase del ciclo, inducen alteraciones en las actividades biológicas que aquí se llevan a cabo (Díaz et al., 2003).

Das Gupta y colaboradores (2007), mediante análisis por citometría de flujo, evidenciaron que en el ciclo celular, después de 48 horas de tratamiento con el veneno del escorpión *Heterometrus bengalensis* Koch sobre las líneas celulares U937 y K562, la apoptosis se incrementó especialmente en la fase G_1 , y en la transición de la fase G_0 a G_1 . En estas mismas fases del ciclo el contenido de ADN intracelular disminuye de 32.1% a 22.8% y de 27.5% a 7.35%, respectivamente. Por lo tanto se confirma que el veneno escorpiónico bloquea y/o arresta el ciclo celular con respuesta biológica en apoptosis.

9.1.3 Efecto citotóxico del veneno sobre la viabilidad celular. La viabilidad celular se evaluó mediante la técnica de tinción con azul de trypan y, en el ensayo de apoptosis, mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio (NA/BE).

El porcentaje de viabilidad celular obtenido mediante tinción con azul de trypan, mostró que todas las concentraciones de veneno disminuyeron la viabilidad celular respecto al control negativo. Sin embargo, fue a la concentración baja (6×10^{-7}

mg/mL) que el veneno tubo el mayor efecto, reduciendo en un 60% la viabilidad celular respecto del control negativo.

El porcentaje de viabilidad celular obtenido mediante tinción con NA/BE mostró que las concentraciones media y baja de veneno difieren significativamente respecto al control negativo; evidenciando un efecto citotóxico a estas concentraciones; siendo la concentración baja (6×10^{-4} mg/mL) la que reduce en mayor proporción la viabilidad celular en un 30% respecto al control negativo.

Al comparar los porcentajes de viabilidad celular obtenidos mediante los dos ensayos, es evidente que mediante tinción con azul de trypan la viabilidad en cada una de las concentraciones experimentales de veneno es mayor respecto a la viabilidad obtenida con la tinción NA/BE (ver tabla 2 y 3).

La prueba de viabilidad con azul de trypan, tiene como principio biológico, teñir las células muertas a consecuencia de ruptura a nivel de membrana, lo cual permite el paso del colorante, que al ser una molécula de gran tamaño (tamaño) necesita de lesiones graves en la membrana celular para el ingreso al interior de la misma.

En la trayectoria apoptótica, se considera una célula en apoptosis tardía, aquella que presenta una ruptura en la membrana celular; por lo tanto el registro de las células muertas que tiñe el colorante azul de trypan corresponde a células apoptóticas tardías, siendo imposible mediante esta técnica la identificación de células en apoptosis temprana. Esto indica que la alta viabilidad registrada se debe a que se están contando como vivas, las células que se encuentran en apoptosis temprana, ya que en esta fase no se presenta aún ruptura de membrana celular, por lo tanto no ingreso del colorante, pero si ocurre fragmentación de cromatina, como característica primordial de una célula apoptótica.

En contraste con la prueba de viabilidad celular mediante tinción con NA/BE que permite una clara identificación de los estadios apoptóticos temprano y tardío de la célula, es evidente que el menor porcentaje registrado, es a consecuencia de que

las células apoptóticas tempranas que se reconocen como vivas con azul de trypan, con NA/BE son registradas como células apoptóticas.

La disminución de la viabilidad celular está asociada con un deterioro en la membrana plasmática, a causa de un desequilibrio electrostático y alteración de la permeabilidad, determinada, a su vez, por la capacidad de la misma para regular y controlar el paso de iones y moléculas del interior al exterior de la célula, y viceversa. Omran (2003), al evaluar el efecto citotóxico del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus* sobre dos líneas celulares (293T y C2C12), encontró que el efecto citotóxico se hacía evidente a nivel de membrana, evidenciando lisis de plasmalema y de membranas de organelas celulares, lo cual aumentó significativamente la liberación de lactato deshidrogenasa citosólica (LDH), ensayo citotóxico mediante el cual la LDH es liberada al medio de cultivo cuando ocurre ruptura de la membrana celular.

Previas investigaciones han reportado que la membrana celular es el tejido blanco de la acción de toxinas de animales (Balboni et al., 1992; Brusés et al., 1993; Mebs and Ownby, 1990). Brusés y colaboradores (1993), evidenciaron que algunas miotoxinas pueden atravesar la membrana celular por endocitosis, o moverse a lado y lado de la célula por medio de los poros de los canales iónicos de las membranas, bajo un gradiente de concentración que trae como consecuencia cambios en la presión osmótica.

La literatura científica reporta información que explica el mecanismo de interacción de las toxinas de animales venenosos en la célula. Se evidencia claramente que la interacción toxina - canales iónicos, es fundamental y altamente específica para garantizar el mecanismo de acción de las mismas, y conocer que el veneno escorpiónico es rico en péptidos que, al interactuar con las membranas celulares, alteran el potencial de membrana (efecto citotóxico a nivel de membrana) (Omran, 2003), haciendo que los canales iónicos sufran un desequilibrio (Mouhat et al., 2004); por lo tanto, se infiere que el veneno de *T. pachyurus* al inducir un marcado efecto citotóxico a la concentración baja, disminuyendo en esta investigación drásticamente el porcentaje de viabilidad celular, induce modificaciones en la permeabilidad de la membrana mediante la

interacción de toxinas específicas, especialmente para canales de Ca^{+2} , que afecta los canales iónicos, originando pérdida de la homeostasis celular, que finalmente conlleva a muerte celular por apoptosis.

Al ser el Ca^{+2} un ion crucial para la regulación, función e inducción de muerte celular (Quintanar-Escorza et al., 2007; Valdivia et al., 1991; Valdivia et al., 1992), se puede concluir que el daño citotóxico ocasionado por el veneno de *T. pachyurus*, es posiblemente por un daño a nivel de membrana que afecta el normal funcionamiento de los canales iónicos para Ca^{+2} , debido a que la liberación masiva y excesiva del mismo, induce muerte celular. Esto explicaría el por que, a la concentración baja de veneno (6×10^{-4} mg/mL), la viabilidad celular disminuyó en un 60% y la apoptosis aumentó en un 59%.

9.1.4 Efecto apoptótico inducido por el veneno. Se encontró que las concentraciones media ($1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL) y baja (6×10^{-4} mg/mL) de veneno de *T. pachyurus*, incrementan significativamente el porcentaje de células apoptóticas, respecto al control negativo. Sin embargo, es a la concentración baja que el veneno de *T. pachyurus* tiene su mayor efecto apoptótico, comparable al del control positivo ($1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$), del cual no difiere significativamente.

El veneno de *T. pachyurus* a la concentración baja (6×10^{-4} mg/mL), aumentó en un 55% las células apoptóticas y disminuyó en un 30% las células viables. Se concluye así, que el veneno de *T. pachyurus* tiene la capacidad de inducir apoptosis en células mononucleares de sangre periférica humana.

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis es necesario que deje de recibir señales de supervivencia, desencadenando la vía intrínseca (vía mitocondrial), o que reciba señales de muerte, característica de la vía extrínseca, por activación de efectores específicos de muerte. La apoptosis desencadenada por vía intrínseca está bajo la jurisdicción de la mitocondria, la cual implica desregulación de su homeostasis, a consecuencia de la pérdida del potencial de membrana ($\Delta\Psi\text{m}$). La muerte generada por vía extrínseca, acontece por la activación de receptores de la familia TNF (TNF y Fas), ubicados en la superficie

celular, los cuales se unen a sus respectivos ligandos (RNF α y Fas L), transmitiendo así la señalización para la muerte celular programada (Angosto, 2003).

Independientemente de la vía por la cual se induzca la apoptosis, un conjunto de proteasas especializadas, llamadas caspasas, ejercen actividad proteolítica, tanto en fase iniciadora como en la efectora (ver ítem 7.5.2), siendo las mediadoras del proceso apoptótico. Del conjunto de caspasas iniciadoras y efectoras, las caspasas 9 y 3, respectivamente, participan en la apoptosis vía mitocondrial, mientras que, en la vía extrínseca, son las caspasas 8 y 10, las que activan los efectores de muerte (Angosto, 2003).

Asumiendo que el efecto apoptótico del veneno *T.pachyurus*, identificado en esta investigación, se deba a los componentes del veneno, especialmente aquellos que interactúan con los canales iónicos, en especial para canales de Ca⁺² (Das Gupta et al., 2007), se pueden explicar a continuación, las rutas y los mediadores implicados en el mecanismo de inducción de muerte celular apoptótica, que generan los venenosos escorpiónicos, y entre ellos el veneno de la especie *T.pachyurus*, sobre las células mononucleares de sangre periférica humana, cultivadas “*in vitro*”.

Es importante mencionar que la célula cuenta con dos fuentes principales de Ca⁺² intracelular, que son: el retículo endoplasmático (RE) y la mitocondria. La presencia del Ca⁺² intracelular en niveles por fuera de lo normal, es decir fuera del rango entre 10 – 100 nM, perturban la homeostasis celular. Por lo tanto, modificaciones de los niveles de Ca⁺² intracelular es un importante factor en la activación de muerte celular programada (Florea and Büsselberg, 2009).

Con base a ello se puede afirmar que existe una relación estrecha y directa entre Ca⁺² intracelular – retículo endoplasmático – mitocondria y apoptosis. Se ha establecido que el efecto tóxico inducido por la afluencia de Ca⁺² a través de sus canales receptores 1,4,5-trifosfato (InsP₃R) y ryanodina (RyR), incrementa los niveles de Ca⁺² intracelular, que son apoptogénicos por vía mitocondrial

(Hajnóczky et al., 2006; Szabadkai and Rizzuto, 2004), lo cual deja entrever la participación del Ca^{+2} como inductor de apoptosis mediada por la interacción retículo endoplasmático – mitocondria.

Investigaciones del efecto apoptótico inducido por toxinas escorpiónicas, han evidenciado que la ruta de apoptosis y el mecanismo biológico desencadenado corresponden a la vía mitocondrial (vía intrínseca), que implica pérdida del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) y alteración en la integridad de la misma, como uno de los primeros eventos de la apoptosis. La alteración en la permeabilidad de la membrana ha sido reportada por los estudios de Gupta y colaboradores (2009), quienes encontraron que la toxina Bengalin (proteína sintética a base de toxina escorpiónica) aislada del escorpión *Heterometrus bengalensis* sobre líneas celulares de leucemia, favorece la apertura de los poros para la liberación del factor pro apoptótico BAX y el subsecuente cierre de los poros que liberan los factores anti apoptóticos como BCL-2, seguido de la liberación de citocromo C al espacio citosólico y subsecuente activación de caspasas. La caspasa 9, una vez activada por la liberación del citocromo C, se adhiere a la procaspasa 3 y desencadena la activación de la misma, y posterior activación de los factores pro apoptóticos BAX, Apaf-1 y la represión de factores anti apoptóticos, como las proteínas de la familia BCL-2.

Sumado a ello, se ha establecido que la interacción de las toxinas del veneno escorpiónico interactúa y tiene efecto sobre canales iónicos para K^+ , Na^+ , Cl^- y Ca^{+2} (Mouhat et al., 2004). Los canales para Ca^{+2} y liberación excesiva del mismo, están involucrados en las manifestaciones citotóxicas de los venenos de escorpiones sobre líneas celulares y, a causa de ello, la inducción de apoptosis (Betancourt et al., 2009; Das Gupta et al., 2007; Gupta et al., 2009). De ser posible que en el veneno de *T. pachyurus* existan péptidos que interactúen con canales iónicos para Ca^{+2} en una baja concentración, desencadene un efecto apoptótico posiblemente mediado por activación de vía mitocondrial (vía intrínseca).

Fleckenstein y colaboradores (1974), demostraron que el exceso de Ca^{+2} que entra a las miofibrillas cardiacas causa muerte celular, jugando este ion un rol patológico en las afecciones cardiacas. Estudios sobre varios modelos celulares

evidenciaron que alteraciones en los poros iónicos para Ca^{+2} son altamente tóxicos en las células (Schanne et al., 1979), de allí que el Ca^{+2} sea participe en el proceso de la muerte celular apoptótica, trayendo como consecuencia sobre estimulación patofisiológica en los receptores colinérgicos post-sinápticos de glutamato, de las células musculares y neuronales; por lo tanto, la afluencia de Ca^{+2} es capaz de inducir muerte celular (Choi, 1992).

Reportes científicos han indicado que el incremento citosólico de Ca^{+2} se presenta en estadios tempranos y tardíos de la trayectoria apoptótica (Kyprianou et al., 1991; Tombal et al., 1999). Por lo tanto, el Ca^{+2} ha sido sugerido como la trayectoria final común de todos los tipos de muerte celular, con la diferencia que, a altos niveles de Ca^{+2} intracelular, se puede promover muerte celular a través de necrosis, mientras que a bajos niveles, induce la expresión de promotores de muerte celular por apoptosis (Choi, 1995; Nicotera and Orrenius, 1998).

En el programa de suicidio celular intervienen la transcripción de genes específicos y su traducción. Para suprimir tal suicidio, los procesos de transcripción y traducción de dichos genes deben inhibirse, lo que demuestra que la apoptosis esta mediada por mecanismos intrínsecos. La muerte celular implica una serie de acontecimientos ordenados, así: un aumento en el contenido de Ca^{+2} intracelular, que desencadena la activación inmediata de grupos enzimáticos como endonucleasas y caspasas (actividad proteolítica) por parte de la mitocondria que, junto con cambios en el esqueleto celular, alteran la forma y el tamaño de la célula.

Estos eventos biológicos caracterizan la fase efectora de la apoptosis, en la cual un aumento del Ca^{+2} intracelular, es uno de los factores clave (Angosto, 2003). Tan importante es el papel del Ca^{+2} en la muerte celular, que fue reconocido simultáneamente al proceso de la apoptosis (Szabadkai and Rizzuto, 2004). Finalmente se desencadenan las fases degradativa y de eliminación de la apoptosis ya explicadas en el numeral 4.6.1.

La inducción de apoptosis por vía mitocondrial es un excelente blanco para las terapias anticancerígenas, ya que la mitocondria, al integrar señales de supervivencia (citoquinas y BAD) y muerte (P53 y BAX) y dependiendo del ambiente celular, responde de manera apropiada; bien sea estabilizando la membrana por presencia de factores como Bcl 2, BCL-xL, o distorsionándola por presencia de factores como Ca^{+2} , especies reactivas de oxígeno (ROX) y BAX. Por lo tanto, la ruta apoptótica vía mitocondrial magnifica su efecto ante la presencia y liberación de inductores apoptóticos que tienen la capacidad de desencadenar la cascada de caspasas y alteraciones en la permeabilidad de la membrana. Los inductores de apoptosis por esta vía, se encuentran en todos los tipos celulares y parece que se conservan incluso en células tumorales (Angosto, 2003).

Es evidente que existen una gran variedad de sustancias que inducen fácilmente a la liberación de moléculas efectoras determinantes de la apoptosis por vía mitocondrial, como es la liberación del citocromo C; donde la presencia de iones y moléculas (Ca^{+2} y ROX) estimulan su liberación por efecto en la permeabilidad de la membrana. El citocromo C juega un papel crítico en los mecanismos de acción de diversos agentes quimioterapéuticos y toxinas celulares (Angosto, 2003).

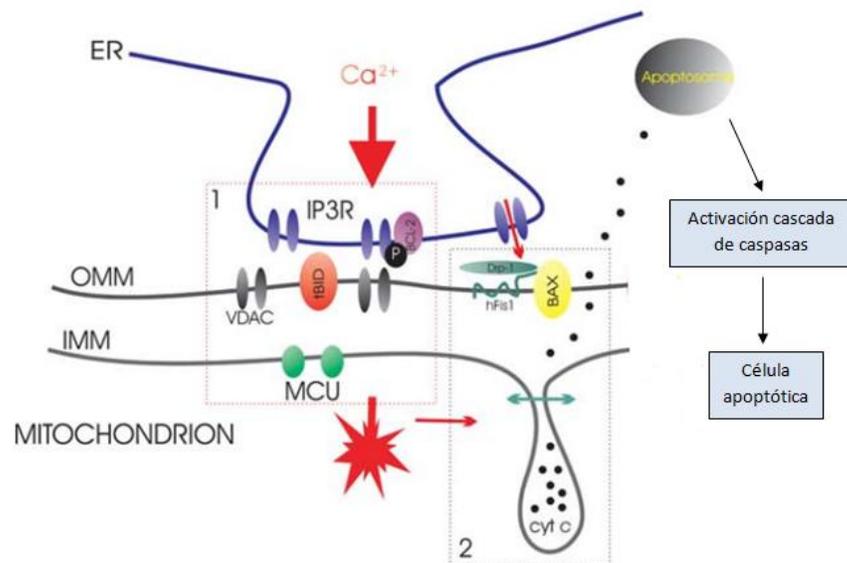
Asumiendo que el efecto apoptótico inducido por el veneno de *T. Pachyurus*, por afluencia de Ca^{+2} , es mediado por la interacción retículo endoplasmático – mitocondria, el mecanismo biológico que se desencadena se representa en la figura 18.

El Ca^{+2} es liberado por el retículo endoplasmático a través de los receptores IP3R (receptores para Ca^{+2}) hacia el citoplasma. En la membrana externa de la mitocondria se encuentran receptores de Ca^{+2} llamados canales iónicos selectivos dependientes de voltaje (VDAC), los cuales, por acción de potencial de membrana (transporte activo- ATP), permiten el paso del Ca^{+2} a la membrana interna mitocondrial, en la cual los poros mitocondriales para Ca^{+2} (MCU), permiten el ingreso del ión a la matriz mitocondrial (la apertura de los MCU depende de la concentración de Ca^{+2} intracelular, es decir, a mayor concentración se favorece la apertura de los poros), para su posterior uso en la respiración (Szabadkai and

Rizzuto, 2004). Este mecanismo evidencia el normal funcionamiento de la mitocondria, a niveles normales de Ca^{2+} intracelular.

Es evidente que en la membrana externa de la mitocondria, se encuentran ubicados factores pre y anti apoptóticos BAX, BID y Bcl2 respectivamente, los cuales interactúan y ejercen su función en respuesta a un estrés celular ocasionado por el aumento del Ca^{2+} intracelular, que se origina a consecuencia de la liberación masiva de este por parte del retículo endoplasmático (debido a un daño de la permeabilidad de la membrana para el ión) (Szabadkai and Rizzuto, 2004).

Figura 18. Proceso apoptótico mediado por el Ca^{2+} involucrado en la interacción retículo endoplasmático - mitocondria.



Fuente: Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial Calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? (Szabadkai and Rizzuto, 2004).

Al encontrarse una alta concentración de Ca^{+2} intracelular, se desencadena un proceso de señalización celular con fin apoptótico así:

El Ca^{+2} proveniente del retículo endoplasmático, induce traslocaciones en la molécula pro apoptótica BID (ubicada en la membrana externa mitocondrial), evento que induce de manera simultánea la activación de la caspasa 8, seguido de activación de la molécula BID, BAX; con subsecuente liberación de Citocromo C (CYT_c), el cual estimula la formación del apoptosoma (CYT_c , APAF -1 y procaspasa 9), activación de la cascada de caspasas (caspasa 9 y 3), y finalmente, la célula apoptótica.

En la membrana mitocondrial externa, adicional a los factores pre y anti apoptóticos, se encuentran las moléculas llamadas DRP1 y hFis1, las cuales, por efecto del aumento del Ca^{+2} intracelular, sufren traslocaciones que favorecen la afinidad y sobreexpresión de moléculas pro apoptóticas como BAX, lo cual da pie para mitigar la acción protectora de las moléculas anti apoptóticas Bcl2 (Szabadkai and Rizzuto, 2004) (ver figura 19).

Los mecanismos por los cuales el Ca^{+2} intracelular señala este tipo de ruta apoptótica, son explicados en función al mecanismo generado por la C_2 – ceramida, mecanismo que aún no está bien estudiado.

Una vez más, se puede ratificar el papel del Ca^{+2} en la ruta apoptótica a consecuencia de pérdida de la homeostasis celular. Si las toxinas del veneno de *T. pachyurus* tuvieran su efecto a nivel del retículo endoplasmático, la explicación de la trayectoria apoptótica generada por el veneno podría ser la anteriormente explicada.

Al ser evidente el efecto apoptótico inducido por toxinas específicas aisladas de venenos de escorpiones, sobre líneas celulares que, por alterar niveles de Ca^{+2} intracelular, inducen irregularidades en la permeabilidad de membrana (Das Gupta et al., 2007; Omran, 2003), y ser los miembros de la vía mitocondrial excelentes

dianas para terapias inducidas por apoptosis, se establece que las terapias apoptóticas dirigidas a la mitocondria pueden ser útiles en enfermedades proliferativas, como el cáncer (Angosto, 2003). Es de esperarse que el efecto apoptótico inducido por el veneno de la especie *T. Pachyurus*, posea toxinas específicas para canales de Ca^{+2} que tengan la capacidad de desencadenar muerte celular vía mitocondrial, y de allí vislumbrar el potencial biotecnológico de las toxinas del veneno de la especie de estudio para posibles terapias anti cancerígenas; como ha sido evidenciado por la efectividad y selectividad de toxinas aisladas de un sin número de especies de escorpiones, con efecto anti cancerígeno mediado por apoptosis sobre líneas celulares (Das Gupta et al., 2007; DeBin and Strichartz, 1991; Lyons et al., 2002; Wang and Ji, 2005).

Teniendo en cuenta que el objetivo a futuro es lograr aislar componentes tóxicos del veneno de *T. pachyurus* que tengan la capacidad de ejercer un efecto citotóxico y apoptótico sobre líneas celulares que puedan establecerse como terapias anti cancerígenas, es de esperar que, al aislar toxinas específicas para canales de Ca^{+2} , interactúen desencadenando apoptosis por vía mitocondrial.

Como ha sido evidente en la literatura científica, el veneno de otras especies de escorpiones, como *Heterometrus bengalensis* Koch (escorpión negro de la India), tienen la misma propiedad de las drogas anti cancerígenas, de inducir muerte celular tal como lo hace el Cisplatino (droga anti cancerígena), el cual incrementa los niveles de Ca^{+2} intracelular entre 250 y 750 μM , alterando el potencial de membrana en los almacenes de Ca^{+2} intracelular (RE y mitocondria), efecto comprobado sobre células de adenocarcinoma de cérvix (Kawai et al., 2006; Splettstoesser et al., 2007).

9.1.5 Efecto necrótico inducido por el veneno. La muerte celular por necrosis inducida por las concentraciones de veneno de *T. pachyurus*, no presentaron diferencia significativa respecto al control negativo; por lo tanto, se infiere que la muerte celular inducida por el veneno no es por necrosis.

Al tener como parámetro comparativo de muerte celular por apoptosis y necrosis la inducida por el H_2O_2 , se corrobora lo encontrado por Hampton y Orrenius

(1997), quienes evidencian que el H₂O₂, a una concentración de 50 µM (1 µM en medio de cultivo), sobre linfocitos T, induce un efecto netamente apoptótico y que, al aumentar la concentración del mismo, la muerte se hace evidente por necrosis.

Por lo tanto, el uso de H₂O₂ a concentraciones de 1 µM y 2 µM como control positivo, fue importante para inferir, que el efecto inducido por la concentración 2µM H₂O₂ es muy citotóxica, superando incluso significativamente el efecto citotóxico de la concentración baja de veneno (6x10⁻⁴ mg/mL), conduciendo a la célula a muerte celular por necrosis. Los resultados obtenidos en esta investigación dan mayor veracidad al mecanismo de apoptosis que inducen los venenos escorpiónicos y la posible aplicabilidad biotecnológica anti cancerígena.

En conclusión, el hecho de que la concentración de veneno 6x10⁻⁴ mg/mL que logró disminuir el IM, haya disminuido la viabilidad celular e inducido apoptosis, permite pensar que el bloqueo celular y la muerte por apoptosis comparten una vía en común.

Bajo los principios biológicos de cada una de las pruebas de citotoxicidad que se aplicaron para evaluar el potencial citotóxico del veneno de *T. pachyurus*, y los reportes bibliográficos de citotoxicidad inducida por venenos escorpiónicos, reflejan que el Ca⁺² cumple un papel importante en el efecto tóxico del veneno, cuyo mecanismo biológico es alterar la permeabilidad de membrana de las organelas celulares (RE y mitocondria) por interacción y bloqueo de los canales iónicos específicos, culminando con muerte celular por apoptosis, posiblemente por vía mitocondrial, como respuesta a un estrés celular y pérdida de la homeostasis.

10. CONCLUSIONES

Se identificó efecto citotóxico, determinado mediante la prueba de Índice Mitótico en linfocitos de sangre periférica cultivadas "*in vitro*" a la concentración baja (6×10^{-4} mg/mL) y media ($1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL) del veneno del escorpión *T. pachyurus*.

Se identificó efecto citotóxico, determinado mediante la prueba de Viabilidad Celular en células mononucleares aisladas de sangre periférica cultivadas "*in vitro*" en cada una de las concentraciones del veneno del escorpión *T. pachyurus* evaluadas.

Se determinó efecto apoptótico, identificado mediante tinción con NA/BE, en células mononucleares de sangre periférica cultivadas "*in vitro*" a la concentración baja (6×10^{-4} mg/mL) y media ($1,2 \times 10^{-2}$ mg/mL) del veneno del escorpión *T. pachyurus*.

Se estableció que las concentraciones de veneno de *T. pachyurus* no mostraron una relación dosis - efecto dependiente; en el cual a bajas concentraciones mayor toxicidad.

11. RECOMENDACIONES

Evaluar el veneno de *T. pachyurus* bajo los parámetros citotóxicos en ensayos “*in vivo*” o líneas celulares con activación metabólica, para esclarecer con claridad si el efecto citotóxico puede ser modulado por el metabolismo.

Realizar ensayos en líneas celulares cancerígenas, con el fin de evaluar el posible efecto antimitótico y apoptótico, que pueda dar pie a una aplicación biotecnológica de las toxinas aisladas de la especie *T. pachyurus*.

Realizar ensayos que se evalúen el posible efecto genotóxico del veneno de *T. pachyurus*, para verificar si la apoptosis inducida por el veneno de esta especie, es efectivamente por efecto citotóxico o probablemente por daño genotóxico.

Aislar y purificar las toxinas específicas para canales de Na⁺, K⁺, y Ca²⁺ que constituyen este veneno, y determinar con seguridad si es el Ca²⁺ u otros iones, los responsables por los efectos determinados en este trabajo.

12. BIBLIOGRAFIA

Alfaro, E., García, C., and Dueñas, A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerología (Mex)* 6, 275-280.

Angosto, C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis (Real Academia Nacional de Farmacia. 1-36).

Balboni, F., Bernabei, P., Barberio, C., Sanna, A., Rossi, F., and Delfino, G. (1992). Cutaneous venom of *Bombina variegata pachypus* (Amphibia, Anura): effects on the growth of the human HL 60 cell line. *Cell biology international reports* 16, 329-338.

Barona, J., Batista, C., Zamudio, F., Gomez-Lagunas, F., Wanke, E., Otero, R., and Possani, L. (2006). Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺-and K⁺-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *BBA-Proteins and Proteomics* 1764, 76-84.

Barona, J., Otero, R., and 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.

Baskic, D., Popovic, S., Ristic, P., and Arsenijevic, N. (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International* 30, 924-932.

Bayly, A., Roberts, R., and Dive, C. (1997). Mechanisms of apoptosis *Advances in Molecular and Cell Biology* 29, 183-251

Becerril, B., Marangoni, S., and Possani, L. (1997). Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon* 35, 821-835.

Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M., and Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 511, 145-178.

- Betancourt, O., Hernández, I., Iglesias, E., and Pargas, R. (2009). Evaluación de la toxicidad in vitro del veneno del alacrán *Rophalurus junceus* a través de un ensayo celular. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 28.
- Bioclon, I. (1997). *Biología del Alacran. toxicología del veneno de Alacrán Tratamiento del paciente picado por Alacrán*, 5-9.
- Brownell, P., and Polis, G. (2001). *Scorpion biology and research* (Oxford University Press Oxford/New York).
- Brusés, J., Capaso, J., Katz, E., and Pilar, G. (1993). Specific in vitro biological activity of snake venom myotoxins. *Journal of neurochemistry* 60, 1030-1042.
- Cardona, J., Patiño, R., Rangel, V., Córdoba, M., Cadavid, A., and Sandino, M. (2002). Aspectos toxinológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *MedUNAB* 5, 159-165.
- Céard, B., De Lima, M., Bougis, P., and Martin-Eauclaire, M. (1992). Purification of the main beta-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom using high-performance liquid chromatography. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 30, 105.
- Coronel Tovar, A. (2008). Determinación del efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* (viperidae) en linfocitos humanos y células mononucleadas de sangre periférica in vitro, mediante los ensayos de índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis Trabajo de grado (Bióloga) Universidad del Cauca *Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Área de genética*.
- Couto, A., Moraes-Santos, T., Azevedo, A., Almeida, A., and Freire-Maia, L. (1992). Effects of toxin Ts- gamma, purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom, on the isolated rat atria. *Toxicon* 30, 339-343.
- Cupo, P., Jurca, M., and De Azevedo-Marques, M. (1994). Severe scorpion envenomation in Brazil. *Inst Med Trop Sao Paulo* 36.
- Charry, H. (2006). Accidentes por picadura de escorpión Centro de investigación y asesoría ofidológica "*Ophidia*".
- Choi, D. (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology* 23, 1261-1276.
- Choi, D. (1995). Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends in neurosciences* 18, 58.

- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., and Traganos, F. (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27.
- Das Gupta, S., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J., and Gomes, A. (2007). Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leukemia research* 31, 817-825.
- DeBin, J., and Strichartz, G. (1991). Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 29, 1403-1408.
- Dehesa-Davila, M., and Possani, L. (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon(Oxford)* 32, 1015-1018.
- Díaz, L., Cala, Ó., Pinto, C., and Lizcano, Á. (2003). El ciclo celular. *MEDUNAB* 6, 21-29.
- Dueñas Cuellar, R.A. (2010). Valoración *in-vitro* del efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (Gervais 1841). Trabajo de grado (Bióloga) Universidad del Cauca *Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Área genética y Toxinología*.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Erenpreisa, J., Ivanov, A., Dekena, G., Vitina, A., Krampe, R., Freivalds, T., Selivanova, G., and Roach, H.I. (2000). ARREST IN METAPHASE AND ANATOMY OF MITOTIC CATASTROPHE: MILD HEAT SHOCK IN TWO HUMAN OSTEOSARCOMA CELL LINES. *Cell Biology International* 24, 61-70.
- Fenech, M., Crott, J., Turner, J., and Brown, S. (1999). ORIGINAL ARTICLES- Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: Description of the method and results. *Mutagenesis* 14, 605-612.
- Fleckenstein, A., Janke, J., Döring, H., and Leder, O. (1974). Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism* 4, 563.
- Florea, A.-M., and Büsselberg, D. (2009). Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *NeuroToxicology* 30, 803-810.

- Florez, E. (2000). Biología y sistemática de los escorpiones de Colombia. I Congreso Colombiano de Zoología Santa Fe de Bogotá
- Florez, E. (2001). Escorpiones de la familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. Reporte.
- Fu, Y., Yin, L., Liang, A., Zhang, C., Wang, W., Chai, B., Yang, J., and Fan, X. (2007). Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas. *Neuroscience letters* 412, 62-67.
- Goeptar, A., te Koppele, J., Glatt, H., Groot, E., Seidel, A., Barrenscheen, M., Wölfel, C., Doehmer, J., and Vermeulen, N. (1995). The cytotoxicity of mitomycin C and Adriamycin in genetically engineered V79 cell lines and freshly isolated rat hepatocytes. *Chemico-biological interactions* 97, 149-168.
- González-Sponga (1996). Guía para identificar escorpiones de Venezuela. Cuadernos Lagoven, 14-17.
- Gupta, S., Gomes, A., Debnath, A., and Saha, A. (2009). Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: Through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chemico-biological interactions*.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* 301, 5-17.
- Hajnoczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S., and Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 40, 553-560.
- Hampton, M., and Orrenius, S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters* 414, 552-556.
- Hassan, S., Haglund, C., Aoleskog, A., Larsson, R., and Lindhagen, E. (2007). Primary lymphocytes as predictors for species differences in cytotoxic drug sensitivity. *Toxicology in Vitro* 21, 1174-1181.
- Hering SE, and De Azevedo-Marques, M. (1992). Escorpionismo. *Plantas venenosas e Animais Peçonhentos* Primera edición, Sarvier, São Paulo, 216-227.
- Hirata, Takahashi, Kobayashi, S, Y., H, S., T, O., K, Y., and M, S. (1998). Caspases are activated in branched protease cascade and control distinct

downstream processes in Fas-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 187, 587-600.

Hjelle, J. (1990). *Anatomy and morphology. The Biology of Scorpions* Stanford: Stanford University Press, 9-63.

Houtgraaf, J., Versmissen, J., and van der Giessen, W. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine* 7, 165-172.

Hoyos, L., Carvajal, S., and Cajas, N. (2002). *Manual de citogenética: linfocitos humanos*. Grupo de investigación en Toxicología Genética y Citogenética, Universidad del Cauca 16-30.

Ibuki, Y., and Goto, R. (2004). Dysregulation of apoptosis by benzene metabolites and their relationships with carcinogenesis. *BBA-Molecular Basis of Disease* 1690, 11-21.

Ikeda, K., Pant, B., Mishiro, A., Ozawa, K., Masujima, T., and Sugiyama, M. (2000). A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 574-576.

Ismail, M. (1995). The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* 33, 825-858.

James, S., Muskhelishvili, L., Gaylor, D., Turturr, A., and Hart, R. (1998). Upregulation of apoptosis with dietary restriction: implication for carcinogenesis and aging. *Environmental Health Perspectives* 106, 307-312.

Kawai, Y., Nakao, T., Kunimura, N., Kohda, Y., and Gemba, M. (2006). Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to cisplatin-related renal cell injury. *Journal of pharmacological sciences*, 601120013.

Kerr, J., Gobe, G., Winterford, C., and Harmon, B. (1995). Anatomical methods in cell death. *Methods in cell biology* 46, 1.

Kerr, J., Wyllie, A., and Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239.

Klion, F., and Schaffer, F. (1996). The ultrastructure of acidophilic "councilmanlike" bodies in the liver. *American journal of pathology* 48, 755.

Klugs, W., and Cummings, M. (1999). *Colorantes de acridina y mutaciones de cambio de fase*. *Conceptos de Genética* Madrid Prentice Hall, 428.

Kyprianou, N., English, H., Davidson, N., and Isaacs, J. (1991). Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer research* 51, 162.

Lee, C., Kim, Y., Ko, H., and Han, E. (2005). Synergistic effects of hydrogen peroxide and ethanol on cell viability loss in PC12 cells by increase in mitochondrial permeability transition. *Biochemical pharmacology* 70, 317-325.

Lockshin, R. (1969). Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. *Journal of insect physiology* 15, 1505.

Lourenço, W., Von Eickstedt, V., CARDOSO, J., SIQUEIRA-FRANÇA, F., Wen, F., SANT'ANA MÁLAQUE, C., and Haddad Jr, V. (2003). Escorpiões de importância médica. CARDOSO, JLC, FRANÇA, FOS, WEN, FH, MÁLAQUE, CMS & HADDAD, V *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, 182-197.

Lozano, J., Tarazona, R., and Peña, J. 14 Citotoxicidad.

Lucas, S. (1992). Os escorpiões. Sao Paulo: Offset Instituto Butantan, 55.

Lucas, S., and Da Silva, P. (1992). Escorpioes de interesse médico no Brasil. *Plantas venenosas e animais peconhentos 1ra ed* Sao Pablo: Sarvier, 211-214.

Lucas, S., and Meier, J. (1995). Biology and distribution of scorpions of medical importance. *Handbook of Clinical toxicology of animal venoms and poisons 1ra edicion*, 205-220.

Lucas, S., and Meier, J. (1999). Biology and distribution of scorpions of medical importance. *Handbook of Clinical toxicology of animal venoms and poisons*, 221-238.

Lyons, S., O'Neal, J., and Sontheimer, H. (2002). Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. *Glia* 39, 162-173.

Marini, M., Musiani, D., Sestili, P., and Cantoni, O. (1996). Apoptosis of Human Lymphocytes in the Absence or Presence of Internucleosomal DNA Cleavage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229, 910-915.

Marinkelle, C., and Stahnke, H. (1965). Toxicological and clinical studies on *Centruroides margaritatus* (Gervais), a common scorpion in western Colombia. *Journal of Medical Entomology* 2, 197-199.

- Mebs, D., and Ownby, C. (1990). Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacology & therapeutics* 48, 223-236.
- Meki, A., Hasan, H., Mohey El-Deen, Z., and Bakkar, S. (2003). Dysregulation of apoptosis in scorpion envenomed children: its reflection on their outcome. *Toxicon* 42, 229-237.
- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., and Sabatier, J. (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochemical Journal* 378, 717.
- Murillo, A., Fernandes, A., and Tato, P. (1999). Manejo terapéutico del paciente intoxicado por picadura de alacran en las distintas instituciones de salud del estado. Instituto biotecnológico 3 Reunión de expertos en envenenamiento por animales ponzoñosos
- Murillo, M., and Gamboa, O. (2006). Investigación y situación del cáncer en Colombia *Innovación y Ciencia* 8, 38 - 47.
- Narayanan, S., O'Donovan, M., and Duthie, S. (2001). Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes. *Mutagenesis* 16, 455.
- Nicotera, P., and Orrenius, S. (1998). The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23, 173-180.
- Omran, M. (2003). Cytotoxic and apoptotic effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell lines. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 9, 255-276.
- Ortega-Camarillo, C., Díaz-Flores, M., Avalos-Rodríguez, A., Vergara-Onofre, M., and Rosales-Torres, A. (2001). La apoptosis y su importancia biomédica. *Gac Méd Méx* 137, 563-574.
- Otero, R., Navío, E., Céspedes, F.A., Núñez, M.J., Lozano, L., Moscoso, E.R., Matallana, C., Arsuza, N.B., García, J., Fernández, D., *et al.* (2004). Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 742-750.
- Otero, R., Uribe, F., and Sierra, A. (1998). Envenenamiento escorpionico en niños. *Actual pediátr* 8, 88-92.
- Plewa, M., Wagner, E., Jazwierska, P., Richardson, S., Chen, P., and McKague, A. (2004). Halonitromethane drinking water disinfection byproducts: chemical

characterization and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity. *Environ Sci Technol* 38, 62-68.

Puttonen, K.A., Lehtonen, S., Lampela, P., Männistö, P.T., and Raasmaja, A. (2008). Different viabilities and toxicity types after 6-OHDA and Ara-C exposure evaluated by four assays in five cell lines. *Toxicology in Vitro* 22, 182-189.

Quintanar-Escorza, M., González-Martínez, M., Navarro, L., Maldonado, M., Arévalo, B., and Calderón-Salinas, J. (2007). Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocytes of lead-exposed workers. *Toxicology and applied pharmacology* 220, 1-8.

Rathmell, J., and Thompson, C. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109, S97-S107.

Rezende, N., Amaral, C., and Freire-Maia, L. (1998). Immunotherapy for scorpion envenoming in Brazil. *Toxicon* 36, 1507-1513.

Rimsza, M., Zimmerman, D., and Bergeson, P. (1980). Scorpion envenomation. *Pediatrics* 66, 298-302.

Rodríguez, B., Javier (2008). Determinación del efecto clínico e histopatológico causado por el veneno del escorpión *Tityus pachyurus* (Buthidae), en ratones cepa ICR. Proyecto de tesis para aspirar al grado de Magíster en Toxicología *Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia*.

Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* 12, 440-450.

Saldarriaga Córdoba, M., and Otero Patiño, R. (2000). Los escorpiones: aspectos ecológicos, biológicos y toxicológicos. *MedUNAB* 3, 17-23.

Santalucia, M., Fan, H., and Oliveira, R. (2004). Scorpion stings: increasing the importance as a public health problem in Brazil.

Schanne, F., Kane, A., Young, E., and Farber, J. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206, 700.

Sehlmeyer, U., Meister, A., Beisker, W., and Wobus, A.M. (1996). Low mutagenic effects of mitomycin C in undifferentiated embryonic P19 cells are correlated with efficient cell cycle control. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 354, 103-112.

Simard, J., and Watt, D. (1990). Venoms and toxins. *The Biology of Scorpions* Stanford: Stanford University Press, 414-444.

Spletstoeser, F., Florea, A., and Büsselberg, D. (2007). IP₃ receptor antagonist, 2-APB, attenuates cisplatin induced Ca²⁺-influx in HeLa-S3 cells and prevents activation of calpain and induction of apoptosis. *British journal of pharmacology* 151, 1176-1186.

Sweet, L.I., Passino, D.R., G.Meier, P., and Omann, G.M. (1999). Xenobiotic - induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response *Biomarkers* 4, 237-253.

Szabadkai, G., and Rizzuto, R. (2004). Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Letters* 567, 111-115.

Tombal, B., Denmeade, S., and Isaacs, J. (1999). Assessment and validation of a microinjection method for kinetic analysis of [Ca²⁺] i in individual cells undergoing apoptosis. *Cell Calcium* 25, 19-28.

Trosko, J. (1995). Epigenetic biomarkers: potentials and limitations. *Biomarkers and Occupational Health: Progress and perspectives* 264-274.

Trujillo, S.C. (2009). Efecto apoptótico inducido por el tiner en células mononucleares de sangre periférica (in vitro), evaluado mediante microscopia de fluorescencia y microscopia óptica. Trabajo de grado (Bióloga) Universidad del Cauca *facultad de Ciencias Naturales Exactas y de Educación*

Valderrama, R., Otero , R., angel, R., and García, M. (1998). Envenenamiento por picadura de escorpiones. *Primer Simposion Colombiano de Toxinología: Toxinas y envenenamiento por animales, plantas y microorganismos*, 169-178.

Valdivia, H., Fuentes, O., El-Hayek, R., Morrissette, J., and Coronado, R. (1991). Activation of the ryanodine receptor Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. *Journal of Biological Chemistry* 266, 19135.

Valdivia, H., Kirby, M., Lederer, W., and Coronado, R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 12185.

Wang, W., and Ji, Y. (2005). Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *Journal of neuro-oncology* 73, 1-7.

Wright, S., Zhong, J., and Larrick, J. (1994). Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB Journal* 8, 654-660.

Wyllie, A., Kerr, J., and Currie, A. (1980). The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

Yurtcu, E., Ergun, M., and Menevse, A. (2003). Apoptotic effect of gossypol on human lymphocytes. *Cell Biology International* 27, 791-794.

Zare Mirakabadi, A., Mahdavi, S., Koohi, M., and Taghavian, M. (2008). Cytotoxic effect of ICD-85 (venom-derived peptides) on MDA-MB-231 cell line. *J venom anim toxins incl trop dis* 14, 619-627.

Zhang, L., and Cui, L. (2007). A cytotoxin isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells. *Toxicology in Vitro* 21, 1095-1103.