

EVALUACIÓN *in-vivo* DEL EFECTO TÓXICO Y GENOTÓXICO DEL VENENO DEL ESCORPIÓN *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (ESCORPIONES: BUTHIDAE), EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN, MEDIANTE LA PRUEBA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (ACs).

**NESTOR FABIAN LEYTON CASTRO
JUAN FERNANDO RIASCO PALACIOS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2012**

EVALUACIÓN *in-vivo* DEL EFECTO TÓXICO Y GENOTÓXICO DEL VENENO DEL ESCORPIÓN *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (ESCORPIONES: BUTHIDAE), EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN, MEDIANTE LA PRUEBA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (ACs).

**NESTOR FABIAN LEYTON CASTRO
JUAN FERNANDO RIASCO PALACIOS**

Trabajo de Grado para optar por el título de Biólogo

**Directora
LUZ STELLA HOYOS GIRALDO Ph. D.**

**Asesor
SILVIO MARINO CARVAJAL M. Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2012**

Nota de Aceptación

Director
Ph. D. Luz Stella Hoyos Giraldo

Jurado
Ph. D. Patricia E. Vélez

Jurado
Bióloga Elizabeth Londoño Velasco

Lugar y Fecha de Sustentación: Popayán, 23 de Febrero de 2012

*A nuestros padres Dora Castro, Carlos Leyton, Germany Palacios y Antonio Riasco.
A nuestros hermanos David Leyton y Andrea Riasco.
A nuestras familias, compañeros y amigos.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mis padres Dora E. Castro y Carlos A. Leyton, por su apoyo incondicional a lo largo de todos estos años, por estar siempre presentes en los buenos y malos momentos, y sobre todo, por darme las fuerzas y enseñarme a nunca olvidar mis metas y no abandonar los sueños, y por su puesto por ayudarme a alcanzarlos.

A mi hermano David J. Leyton, por saber aguantarme todos estos años, y por impulsarme a ser cada vez mejor para ser un buen ejemplo en su vida, espero haberlo conseguido. También gracias por las risas y la compañía.

A toda mi gran familia, por todos estos años de apoyo y preocupación, por su ayuda entregada sin condiciones.

A mis grandes amigos y compañeros, Juan F. Riasco, Rosa A. Dueñas, Miguel E. Guevara, Karen Y. Robles, Juan S. Gil, Lina F. Villada, Magaly Solarte y Elizabeth Vásquez, por todos los años de compañía, por las largas charlas y las noches de estudio, por las risas y las lagrimas, por los cuidados y los regaños, por recorrer este camino juntos.

A mis amigos de la vida, Johan Caicedo, Diego F, Burgos, José L. Riascos, Pedro J. Gutiérrez, por el constante apoyo, y por enseñarme a su manera lecciones que nunca voy a olvidar.

A la Ph. D. Luz Stella Hoyos, por ser un gran ejemplo de profesional y de investigadora, por ser más que una profesora una maestra, por haberme permitido conocer el mundo que me apasiona, por su paciencia, y por supuesto por todos sus aportes en la construcción de este trabajo.

Al M. Sc. Silvio Carvajal, por sus aportes metodológicos y por su asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.

Al grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, por permitirme formarme en sus aulas y usar sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo, especialmente a la Bióloga Ingrid

Reyes, por su instrucción, por ser una maestra y amiga, y a la auxiliar de laboratorio Elsa Velasco, por toda su ayuda en el trabajo de laboratorio, por tener siempre una sonrisa en su rostro y regalarme su alegría.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), en cabeza del M. Sc. José Beltrán, por permitirme usar las instalaciones y equipos para llevar a cabo parte de esta investigación.

También quiero agradecer a los grandes maestros que tuve a lo largo de mi carrera profesional, y gracias a los cuales me enamore cada día más de mi profesión, a la profesora de Genética Ph. D. Patricia E. Vélez, al profesor de Botánica M. Sc. Diego J. Macias, al profesor de Biología de Invertebrados Ph. D. Guillermo Vásquez.

A la Universidad del Cauca, por formarme y ser mí segundo hogar a lo largo de estos años de aprendizaje, por todas las experiencias que tuve en sus aulas y en sus pasillos.

A Veterinaria de Colombia (VECOL), por la donación de los ratones usados durante el desarrollo de este estudio.

Y por último a todas las personas que durante estos años aportaron su grano de arena en la consecución de este objetivo, tanto a nivel profesional, como personal, muchas gracias.

Nestor Fabian Leyton Castro.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este proyecto está dedicada a mis madres Germany M. Palacios, Maria Teresita Riascos y a mi padre Antonio Riasco, pilares fundamentales en mi vida y vivos ejemplos de perseverancia, constancia, tenacidad y lucha insaciable. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Gracias a ellos, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación motivando mi formación académica, y creyendo en mí en todo momento depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi capacidad para superar cada uno de ellos. Es por ellos que soy lo que soy ahora y han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar. A ustedes Gracias.

A Ti Madre mía, recibe esta humilde dedicación como homenaje a tu grandeza, inspiración, fortaleza, sabiduría, entrega, paciencia, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad, por el amor que siempre me has brindado, Por haberme educado y soportar mis errores. Gracias por tus consejos ¡Gracias por darme la vida! Gracias por ser mi madre.

A ti Padre mío, porque siempre fuiste un hombre admirable que me brindó su cuidado amor y comprensión, por tú paciencia, por tus sabios y acertados consejos que orientaron mis pasos por el camino recto de la vida, convirtiéndote por tus grades virtudes y esfuerzo en el mejor de los ejemplos a seguir, por eso, tú padre mío mereces hoy y siempre todos mis honores, eterno cariño y mi más grande respeto y gratitud.

A ti Tía mía, por todo tu amor, apoyo incondicional, constancia, dedicación, paciencia, consejos, regaños por ser el centro de amor y fe de esta gran familia, todo esto junto, ayudó a que hoy cumpla esta meta y culmine mi carrera profesional.

A ti Hermana mía, por ser ejemplo de tenacidad, carácter, dedicación, y porque a pesar de nuestras diferencias se que siempre podre encontrar en ti un gran apoyo amor y comprensión, gracias por tus regaños, que de una u otra manera supe apreciar y sé que fueron en pro de mi bienestar, espero que este trabajo te sirva de ejemplo y motivación en tu vida.

A todos mis primos que indirectamente me impulsaron y motivaron para llegar hasta este lugar.

A mis amigos, principalmente a mi gran amigo, hermano y compañero de tesis, Nestor Fabian Leyton y familia, a Miguel Eduardo Guevara, Karen Robles, Magaly Solarte, Sebastián Gil, Rosa Amalia Dueñas, Yesenia Andrea Martínez, Johan Caicedo, Elizabeth Vásquez, a todos y cada uno de ustedes gracias por tan memorables momentos compartidos durante este tiempo, por todas las risas, carcajadas, lágrimas, las risas, almuerzos, viajes, consejos, tramos, más risas, apoyo en momentos difíciles, y demás experiencias que alimentaron mi vida y mi alma. A ustedes Gracias.

A mis maestros.

Gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional, en especial: A la Ph.D. Luz Stella Hoyos, por haber guiado el desarrollo de este trabajo y por la paciencia para la culminación del mismo, por ser un vivo ejemplo a seguir de el éxito profesional que espero alcanzar en mi futuro.

A la Ph. D. Patricia Eugenia Vélez Varela. Por su apoyo ofrecido durante el transcurso de la carrera por su muy efectiva metodología de transmitir su conocimiento y por ser ejemplo de un Biólogo con gran sentido de la Bioética y profesionalismo.

Al Mg. Silvio Carvajal por su tiempo compartido y su valiosa asesoría para el desarrollo de este trabajo.

Y demás maestros como, María Isaura Valdivieso, Guillermo León Vásquez Zapata, entre otros que ayudaron a impulsar el desarrollo de mi formación profesional y encendieron en mí un gran amor por esta hermosa profesión.

A la Universidad Del Cauca, y en especial al grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, a todos y cada uno de sus integrantes, en especial a la auxiliar de laboratorio Elsa Velasco por su gran apoyo, y a la Bióloga Ingrid Reyes por su adiestramiento en las diferentes técnicas citogenéticas.

¡Gracias!

Juan Fernando Riasco Palacios

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. JUSTIFICACIÓN	18
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	20
2.1 MARCO TEÓRICO	20
2.1.1 ESCORPIONES	20
2.1.1.1 Veneno de escorpión.	22
2.1.1.2 Signos locales y sistémicos por envenenamiento	23
2.1.2 DOSIS LETAL 50 (DL ₅₀)	23
2.1.3 BIOMARCADORES CITOGENÉTICOS	24
2.1.3.1 Alteraciones Cromosómicas	25
2.1.4 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs)	31
2.1.5 MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PCD)	34
2.1.5.1 Apoptosis	35
2.1.6 BIOTRANSFORMACIÓN	38
2.2 ANTECEDENTES	40
2.2.1 ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ESCORPIONISMO	40
2.2.2 ESTUDIOS MOLECULARES DE LOS VENENOS DE ESCORPIÓN	41
2.2.3 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS Y GENOTÓXICOS	42
2.2.4 ANTECEDENTES DEL BIOMARCADOR DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	44
3. HIPOTESIS	48
4. OBJETIVOS	49
4.1 OBJETIVO GENERAL	49
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
5. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	50
5.1 TIPO DE ESTUDIO	50
5.2 MANTENIMIENTO DE ANIMALES	50
5.2.1 Ratones	50
5.2.2 Escorpiones	50

	pág.
5.3 EXTRACCIÓN DEL VENENO	51
5.4 CUANTIFICACIÓN DEL VENENO	52
5.5 RUTA DE ADMINISTRACIÓN	53
5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	53
5.6.1 TOXICIDAD: Determinación de la DL ₅₀ .	53
5.6.2 GENOTOXICIDAD: Grupos experimentales	54
5.7 PROCEDIMIENTO: PRUEBA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS <i>IN-VIVO</i> .	58
5.7.1 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA	58
5.7.2 GOTEO, TINCIÓN Y MONTAJE DE LAS PLACAS	58
5.8 ANÁLISIS AL MICROSCOPIO	59
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
6. RESULTADOS	60
6.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS DEL VENENO	60
6.2 EFECTO TÓXICO	60
6.2.1 Dosis Letal 50 (DL ₅₀)	60
6.2.2 Signos locales y sistémicos de envenenamiento	61
6.2.3 Dosis Administradas en los tratamientos	64
6.3 EFECTO GENOTÓXICO: FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	64
7. DISCUSIONES	70
8. CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Antecedentes de estudios epidemiológicos de escorpionismo en Colombia.	41
Cuadro 2. Antecedentes de estudios moleculares de venenos de escorpión.	43
Cuadro 3. Antecedentes de estudios Toxicológicos y Genotóxicos de venenos de escorpión.	44
Cuadro 4. Antecedentes del biomarcador de Alteraciones Cromosómicas.	46
Cuadro 5. Variables dependientes e independientes del estudio	51
Cuadro 6. Diseño experimental del estudio para genotoxicidad	57
Cuadro 7. Signos locales y sistémicos de envenenamiento por <i>C. margaritatus</i> evaluados por presencia (+)/ausencia (-) en ratones <i>Albino suizo</i> durante el procedimiento de DL ₅₀ .	62
Cuadro 8. Dosis de veneno y controles administradas en una única dosis, calculadas a partir de la DL ₅₀ establecida (46.64 µg/g).	64

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Mapa de distribución geográfica de los escorpiones a nivel mundial.	20
Figura 2. Morfología externa de un escorpión, vista dorsal.	21
Figura 3. Formación de una ACs (1. Translocación recíproca, 2. Cromosoma dicéntrico).	27
Figura 4. Formación de una ACs (3. Cromosoma dicéntrico y dos rupturas cromatídicas, 4. Deleción cromosómica).	28
Figura 5. Tipos de Alteraciones inducidos por la exposición a agentes clastógenos según la fase del ciclo celular en que han ejercido su acción y su dependencia de la fase S.	30
Figura 6. Tipos de Alteraciones inducidos por la exposición a agentes clastógenos según la fase del ciclo celular en que han ejercido su acción.	30
Figura 7. Productos del superóxido (O_2^-) y sus catalizadores.	32
Figura 8. Principales lesiones de bases en el ADN inducidos por el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica.	33
Figura 9. Representación esquemática de algunas de las principales vías de señalización apoptótica.	37
Figura 10. Extracción del veneno de escorpión por estimulación eléctrica.	52
Figura 11. Distribución de los ratones en los grupos experimentales	56

Figura 12. Porcentaje de aparición de los signos locales y sistémicos de envenenamiento por la toxina del escorpión *C. margaritatus* en ratones *Albino suizo* durante el procedimiento de DL_{50} . 63

Figura 13. Ratón con los síntomas positivos de envenenamiento (Sialorrea, Somnolencia), después de ser inoculado con veneno del escorpión *C. margaritatus* 63

Figura 14. Total de Alteraciones Cromosómicas (ACs) ($X \pm DE$) Vs. Tratamientos con veneno de escorpión (9.32, 18.65 y 37.31 $\mu\text{g/g}$) y controles (NaCl 0.9% y Ciclofosfamida 50 $\mu\text{g/g}$). 67

Figura 15. Metafase normal de ratón (Sin daño genotóxico) tratado con solución salina NaCl 0.9% (Control Negativo). 68

Figura 16. Metafase de ratón tratado con la dosis baja de veneno (9.32 $\mu\text{g/g}$), con ACs de tipo Cromatídicas. 68

Figura 17. Metafase de ratón tratado con el control positivo (ciclofosfamida, 50 $\mu\text{g/g}$), se observan múltiples Alteraciones Cromosómicas. 69

INTRODUCCIÓN

Los escorpiones se encuentran entre los animales más antiguos de la tierra, han sobrevivido más de 400 millones de años y durante este tiempo han podido conservar su morfología, lo que se podría atribuir al desarrollo de su poderoso veneno, usado como un arma eficaz tanto para su defensa como para obtener su alimento (Zhijian et al., 2006). Los escorpiones son invertebrados ponzoñosos que se encuentran dispersos por la mayor parte de las regiones cálidas de la tierra (Gordillo, 2000), desde desiertos hasta bosques, pasando por todas las zonas de vida intermedias, con altitudes de los 5500m en los Andes, hasta los 800m de profundidad en cuevas (Lourenço and Cloudsley-Thompson, 1996).

A nivel mundial, de más de 1500 especies conocidas, tan solo 25 especies son consideradas como peligrosas para el hombre, debido a la potencia de su veneno (Omran, 2003), y por su alta interacción con el mismo. La gran mayoría de estas especies se hallan distribuidas en cinco géneros, pertenecientes todos a la familia Buthidae: *Androctonus* y *Buthus* (África del Norte), *Leiurus* (África del Norte y el Medio Este), *Centruroides* (Norte América, Centroamérica, y al norte de Sur América) y *Tityus* (Sur América, Panamá, Costa Rica, Trinidad) (Flórez, 2001, 2007; Lourenço and Cloudsley-Thompson, 1996; Otero et al., 2004), en Colombia esta familia se encuentra representada por cuatro géneros: *Tityus* (29 spp.), *Centruroides* (1 sp.), *Ananteris* (4 spp.) y *Rhopalurus* (1 sp.) (Barona et al., 2004; Otero et al., 2004).

Los venenos de escorpión son mezclas complejas de moléculas, la mayoría son péptidos que muestran diferentes tipos de actividad biológica. Estos péptidos se unen específicamente a una gran variedad de blancos farmacológicos, en particular los canales iónicos localizados en los tejidos de su presa, produciendo en ésta efectos neurotóxicos. Se han descrito toxinas en el veneno de escorpión que modulan los canales iónicos celulares (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), aumentan la excitabilidad celular y causan liberación de neurotransmisores (catecolaminas y acetilcolina) en las terminaciones post-ganglionares de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático, produciendo los conocidos efectos neurotóxicos (Gómez et al., 2002; Lourenço et al., 2002; Otero et al., 2004; Oukkache et al., 2007; Valdez-Cruz et al., 2004). Además las toxinas producen efectos tóxicos como dolor, taquicardia, somnolencia, sudoración, y ciertas reacciones

inmunológicas (Oukkache et al., 2007). Sin embargo, algunos de los componentes del veneno de escorpión no han sido lo suficientemente estudiados. A través del tiempo y teniendo en cuenta los casos reportados de envenenamiento por picaduras de escorpiones, y la gravedad de cada situación, se han desarrollado estudios epidemiológicos, donde se analizó principalmente la composición de las toxinas y sus efectos tóxicos (Barona et al., 2006; Barona et al., 2004; Escobar et al., 2003; Gómez et al., 2002; Omran, 2003; Otero et al., 2004; P. and R., 2007).

El envenenamiento por picadura de escorpión afecta a todos los continentes, con una mayor incidencia en los países tropicales y subtropicales. A nivel mundial, Túnez, en África, presenta datos epidemiológicos de 30.000 a 45.000 casos al año (Adiguzel, 2010; Krifi et al., 2005). En Latinoamérica los países más afectados son México y Brasil, donde se ha constituido en un problema de salud pública con 200.000 y 8.000 casos al año, respectivamente (Barona et al., 2004; Bertazzi et al., 2005; Gómez et al., 2002). En Colombia los escorpiones se encuentran ampliamente distribuidos en todas las regiones, y son un problema de salud pública en los lugares donde su incidencia es alta, como en los departamentos de Antioquia, Tolima, y en el Cauca, a lo largo de la cuenca del río Patía. Sin embargo, debido a que la población afectada no acude a los centros de salud no existen suficientes registro de estos casos.

En nuestro país el conocimiento acerca de la epidemiología del escorpionismo es mínimo, y actualmente existen pocos estudios. Entre estos se destaca el desarrollado por Otero y colaboradores (Otero et al., 2004), en dos regiones de Colombia, Antioquia y Tolima, en el cual se reportan accidentes escorpiónicos graves y algunos accidentes fatales en niños. En otro estudio, durante un año se presentaron 129 casos de accidentes escorpiónicos, 41 de los cuales se presentaron en niños, en 10 de los casos no se identificó la especie de escorpión, y el 70.5% de estos ocurrieron dentro de las casas (Barona et al., 2004; Gómez et al., 2002), lo que demuestra la peligrosidad de la interacción del hombre con los escorpiones en los lugares donde la abundancia de estos es alta. Otro de los estudios fue el desarrollado por Gómez y colaboradores (Gómez et al., 2002), en la ciudad de Medellín, donde los indicadores epidemiológicos revelaron una alta infestación, hacinamiento y densidad de escorpiones en las viviendas de uno de los cerros de esta ciudad, durante el desarrollo de este estudio se encontró que la mayoría de los accidentes ocurrieron dentro de las casas (34.4%), y gran parte de estos (62.5%) durante las horas de la noche o en las primeras horas de la mañana (Gómez et al., 2002).

Debido a la alta intervención del hombre en los ecosistemas donde vive el escorpión, los accidentes escorpiónicos son cada vez más frecuentes, presentándose tanto accidentes laborales como accidentes domiciliarios. Aunque la mayoría de los accidentes ocurren en adultos cuando estos están laborando en el campo, los niños son los más afectados, y presentan los mayores síntomas de envenenamiento sistémico, tan graves que en algunos casos conducen a la muerte del menor (Barona et al., 2004; Gómez et al., 2002; Otero et al., 2004). En el Departamento del Cauca, especialmente a lo largo de la cuenca del río Patía, el accidente escorpiónico es muy común, pero por lo general las personas afectadas no acuden a los centros médicos, y optan por utilizar remedios caseros, como baños locales con orina, compresas con hierbas medicinales o con el escorpión macerado, y en algunos casos se automedican con analgésicos orales para disminuir el dolor (Gómez et al., 2002). Hasta el momento, en el Departamento del Cauca, no se han realizado estudios enfocados en conocer la epidemiología del escorpionismo en las zonas donde hay una alta densidad de estos. A nivel celular y genético solo se ha realizado un estudio donde se identificó el efecto genotóxico del veneno de escorpión *Centruroides margaritatus* mediante la prueba de Micronúcleos (Dueñas-Cuellar, 2009), sin embargo la información aun es poca, por esta razón es pertinente realizar investigaciones encaminadas a estudiar las características tanto clínicas, como epidemiológicas del escorpionismo en el Cauca, así como determinar el posible daño a nivel celular y genético, con el fin de conocer los probables riesgos que tienen las personas picadas por escorpiones de desarrollar problemas de salud a largo plazo, tales como el cáncer.

Este estudio evaluó *in-vivo* el efecto tóxico y genotóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* en células de médula ósea de ratón, para evaluar los efectos tóxicos se realizó una observación directa de los síntomas locales y sistémicos de envenenamiento presentados por los ratones. Para evaluar el efecto genotóxico se usó el biomarcador de Alteraciones Cromosómicas (ACs), el cual es el biomarcador de efecto temprano y de mayor relevancia para identificar o evaluar el daño genotóxico y el riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer, por exposición a agentes xenobióticos, o carcinogénicos (Almeida Santos et al., 2005; Bonassi and Au, 2002; Mateuca et al., 2006; Norppa et al., 2006; Vainio, 1998). Su aplicación en estudios epidemiológicos permite la implementación de programas y estrategias de prevención (Bonassi and Au, 2002).

Durante la realización de este estudio se observó que el veneno del escorpión *C. margaritatus* no presenta un efecto genotóxico significativo en las células de médula ósea de ratón, sin embargo se observó un aumento en la frecuencia de

ACs de tipo cromatídico cuando se aplicó la dosis más baja evaluada con respecto del control negativo. Por otro lado, las dosis media y alta presentaron una disminución en la frecuencia de las ACs de tipo cromatídico, lo que se puede inferir por un alto daño genotóxico, el cual induce citotoxicidad, lo que permito deducir que el veneno de escorpión sí puede afectar la estructura del ADN incluso a dosis bajas. Por esta razón es muy factible reconocer el uso del veneno de escorpión *Centruroides margaritatus* como droga terapéutica eficiente en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

1. JUSTIFICACIÓN

El Cauca por estar ubicado en la región Andina tiene una geografía quebrada, donde se presentan todas las variantes climáticas, lo que hace posible el desarrollo de dos géneros de escorpiones, *Tityus* y *Centruroides*, ambos pertenecientes a la familia Buthidae, los cuales representan un alto riesgo para los seres humanos por su potente, y en algunos casos mortal veneno. Sin embargo, a pesar del esfuerzo de algunos investigadores, en Colombia no se producen antídotos escorpiónicos, no se realizan estudios epidemiológicos prospectivos (Barona et al., 2004; Otero et al., 2004), y los estudios a nivel celular y genético son pocos (Dueñas-Cuellar, 2009).

El veneno de escorpión ha sido objeto de muchas investigaciones tanto *in-vivo*, como *in-vitro*, la mayoría de estas con el objetivo de evaluar los efectos tóxicos del veneno y sus diferentes componentes, mientras otras se han centrado en la caracterización e identificación de los diferentes constituyentes de esta mezcla proteica compleja. La mayoría de los datos de los mecanismos de acción de las toxinas de los animales venenosos, han sido obtenidos por experimentos *in-vitro* usando diferentes líneas celulares, de esta forma, muchos estudios usan algunos venenos de animales, o componentes de los mismos, como herramientas para resolver problemas particulares de las investigaciones, y para explicar el modo de acción de canales iónicos específicos (Omran, 2003). Hasta el momento solo se encuentra un reporte realizado con venenos de escorpión y el uso de biomarcadores de efecto biológico como los Micronúcleos (Mn) (Dueñas-Cuellar, 2009), por esta razón es importante la realización de más estudios *in-vivo*, enfocados en evaluar si las proteínas y demás componentes biológicos del veneno (nucleótidos, enzimas, lípidos, compuestos bioactivos y otros no identificados) del escorpión, o sus metabolitos derivados, ejercen una acción sobre el material genético (ADN), causando lesiones primarias, las cuales al no ser reparadas o mal reparadas, sean fijas en las células y causan mutaciones y posteriores enfermedades como el cáncer, en las personas que han sido víctimas de envenenamiento escorpiónico.

Los estudios *in-vivo* son especialmente sensibles y relevantes para medir el grado de genotoxicidad de posibles agentes clastógenos, estos permiten tomar en cuenta todos los procesos normales de biotransformación y de farmacocinética del

agente, así como medir ciertos procesos de reparación del ADN, además es una herramienta útil para corroborar resultados que hayan sido obtenidos en estudios *in-vitro* previos (Krishna and Hayashi, 2000). Por esta razón este trabajo se realizó *in-vivo*, ya que de esta manera los resultados obtenidos nos mostrarán de una forma precisa el posible daño que puede ocasionar el veneno del escorpión *C. margaritatus* en una población humana expuesta a éste, por extrapolación.

Los biomarcadores como las Alteraciones Cromosómicas (ACs), son evidencias de eventos biológicos ocurridos en las primeras etapas de una enfermedad, por esta razón son herramientas útiles en las investigaciones actuales, que se centran en evaluar el posible efecto que pueda causar un determinado agente xenobiótico (químico o biológico, o mezclas complejas como los venenos de escorpión) en un organismo dado. Es así como las ACs son el biomarcador de efecto biológico mejor validado para evaluar riesgo de cáncer, y el más ampliamente usado en la actualidad especialmente en estudios de biomonitoreo humano, en los cuales relacionan la alta frecuencia de ACs con un mayor riesgo de padecer de cáncer.

Teniendo en cuenta que en la actualidad la estadística de accidentes escorpiónicos es mínima y no es confiable, puesto que la población afectada en muchas ocasiones no acude a los centros hospitalarios, es imposible obtener datos reales, y realizar un seguimiento de los efectos a largo plazo. Es preocupante que en el departamento del Cauca no se hayan realizado hasta el momento estudios epidemiológicos, y la información del efecto a nivel celular y genético es muy poca (Dueñas-Cuellar, 2009). Lo anterior hace pertinente y necesario generar nuevos y relevantes conocimientos acerca de los posibles daños a nivel celular y genético, que pueda producir este veneno, el cual puede generar lesiones primarias que al no ser reparadas pueden causar posteriores mutaciones y desencadenar a largo plazo un proceso carcinogénico (Bonassi and Au, 2002; Rössner et al., 2005; Vainio, 1998).

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 ESCORPIONES

Los escorpiones son los animales terrestres más antiguos que se conocen, se han encontrado fósiles en depósitos del Silúrico de aproximadamente 400 millones de años. La capacidad de adaptación a los diferentes ecosistemas (Figura 1), les ha permitido resistir los cambios ambientales sin presentar nuevas formas estructurales (Hoffmann and del Carmen Farias, 2003).

Los escorpiones son arácnidos que producen un veneno con el que inmovilizan a sus presas, principalmente insectos (Escobar et al., 2003), hasta la fecha se han descrito en el mundo más de 1500 especies ubicadas en 21 familias (Barona et al., 2004; Otero et al., 2004), los escorpiones de la familia Buthidae comprenden aproximadamente 529 especies, divididas en 73 géneros, de los cuales solo cinco producen un veneno tóxico para el hombre (Valdez-Cruz et al., 2004), en Colombia ésta familia se encuentra representada por cuatro géneros: *Tityus* (29 spp.), *Centruroides* (1 sp.), *Ananteris* (4 spp.) y *Rhopalurus* (1 sp.) (Barona et al., 2004; Otero et al., 2004).

Figura 1. Mapa de distribución geográfica de los escorpiones a nivel mundial.

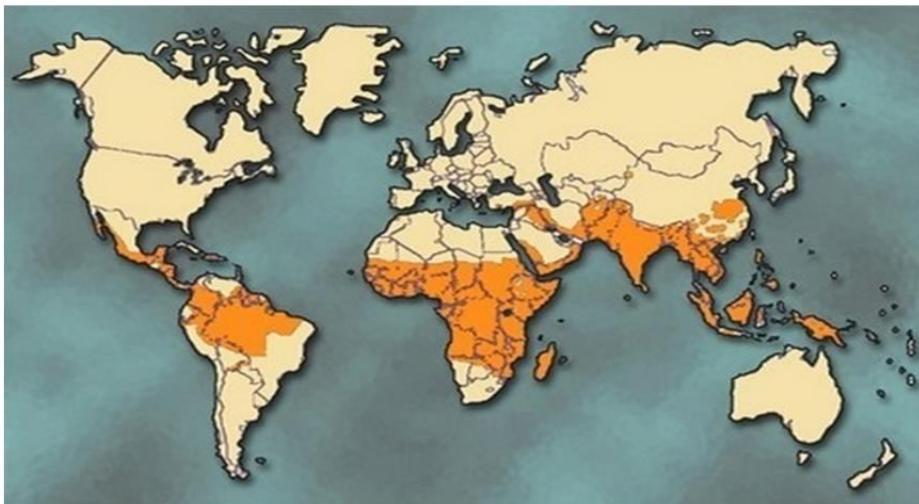
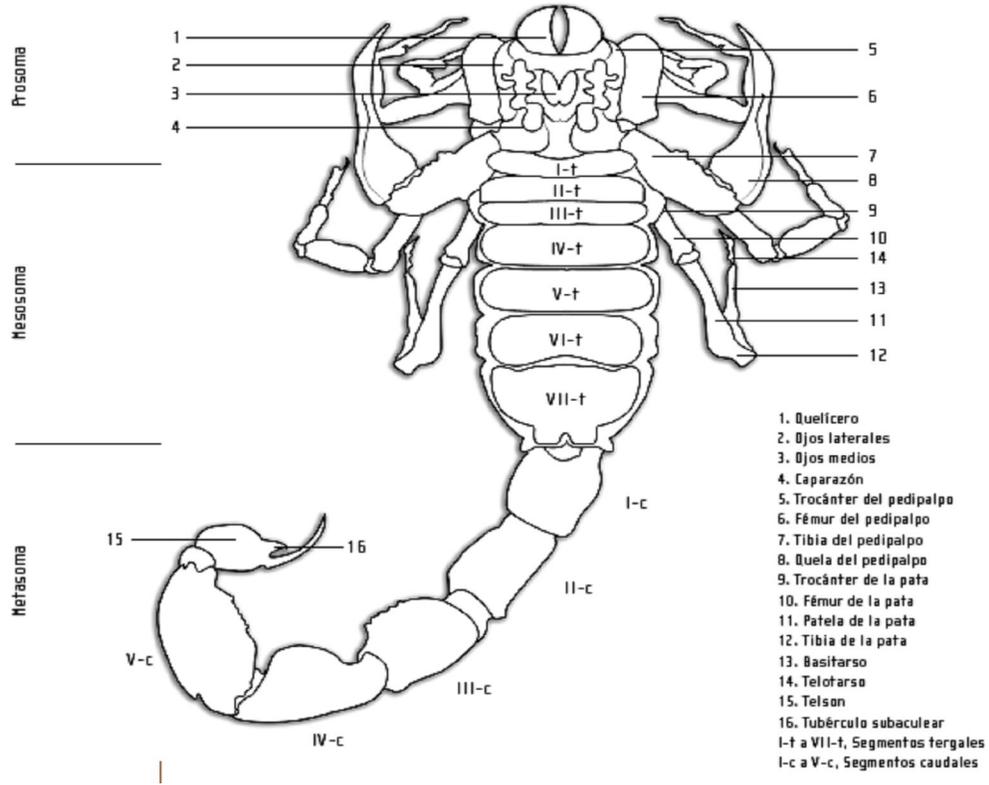


Figura 2. Morfología externa de un escorpión, vista dorsal.



Fuente: Los escorpiones: enigmáticas reliquias del pasado poco conocidas en Colombia. (Flórez, 2007)

El color de su tegumento varía en tonalidades de amarillo, café claro, café oscuro, hasta casi negro. Para su estudio su cuerpo se ha dividido en tres regiones principales, el prosoma, que corresponde al primer tercio del cuerpo, en este se encuentran la cabeza, los ojos y las quelas del animal, el mesosoma, que corresponde a la parte media del cuerpo, en esta parte se encuentran sus 4 pares de patas locomotoras, delgadas y aptas para correr con rapidez en caso necesario, y el metasoma o cola, mucho más delgado y largo; el último segmento de la cola está ensanchado, y forma la vesícula y el aguijón (Figura 2). Dentro de la vesícula se encuentran dos glándulas venenosas, cuya secreción sale por conductos que van a desembocar cerca de la punta del aguijón (Hoffmann and del Carmen Farias, 2003).

Los escorpiones son generalmente de hábitos nocturnos, durante el día se encuentran ocultos bajo piedras, troncos caídos y ocasionalmente entre la hojarasca, algunas especies se han adaptado incluso a vivir en viviendas humanas, encontrándose entre cavidades de ladrillos y grietas en techos de madera o paja (Flórez, 2007; Gómez et al., 2002; Lourenço and Cloudsley-Thompson, 1996), por lo que habitualmente las picaduras se producen de forma accidental en el hogar o como accidentes laborales, dando lugar a manifestaciones tóxicas locales o generales, el principal signo de envenenamiento local es el dolor, y en caso más graves puede producir taquicardia, somnolencia y sudoración generalizada, los cuales son signos de envenenamiento sistémico. (Gómez et al., 2002; Otero et al., 2004).

2.1.1.1 Veneno de escorpión.

El veneno de los escorpiones es una secreción apocrina, compuesta principalmente de proteínas (neurotóxicas) y péptidos de bajo peso molecular, los cuales ejercen su acción sobre los canales iónicos celulares (Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+}), aumentan la excitabilidad celular y causan liberación de neurotransmisores (catecolaminas y acetilcolina) en las terminaciones postganglionares de los sistemas simpático y parasimpático (Gómez et al., 2002; Lourenço et al., 2002; Otero et al., 2004; Petricevich, 2010; Valdez-Cruz et al., 2004), sin embargo algunos de estos componentes no están documentados a nivel estructural ni farmacológico. Además diversos estudios revelan que los venenos de escorpiones poseen diferentes constituyentes, los cuales pueden modular la proliferación celular, el crecimiento y el ciclo celular, y que los pequeños péptidos de bajo peso molecular tienen una amplia actividad farmacológica, tales como anti-epiléptico, anti-microbiano y actividad de bloqueo de canales (Adiguzel, 2010; Das Gupta et al., 2007; Petricevich, 2010). Entre las características más representativas de las neurotóxicas escorpiónicas, tenemos: **1.** Alta estabilidad molecular, lo cual las hace resistentes a cambios del medio ambiente y por ello, se consideran entre los venenos más poderosos que se conocen. **2.** No se inactivan con cambios bruscos de pH, ni por agentes desnaturalizantes, ni por las enzimas proteolíticas más comunes, ni por altas temperaturas. Las únicas sustancias que las afectan, son los agentes que reducen los puentes disulfuro y que reaccionan con los grupos amino y carboxilo (Polis, 1990; Valderrama, 1998). Es importante mencionar también, que el veneno posee rápida absorción tisular y alta capacidad de distribución (10-15 minutos), ya que por ser neurotóxico los síntomas se extienden rápidamente por el cuerpo del individuo, por otro lado la eliminación también es muy rápida,

aproximadamente 2 a 3 horas, tiempo durante el cual los síntomas se vuelven más leves o han desaparecido totalmente (Adiguzel, 2010; Barona et al., 2004; Gómez et al., 2002; Zare Mirakabadi et al., 2007).

Desde hace 40 o 50 años, en Colombia, los procedimientos médicos utilizados para la atención de la intoxicación por picadura de escorpión, son solo de tipo empírico y de acción sintomática, debido a que en el país no se producen antídotos contra picaduras de escorpión, y los estudios sobre los aspectos clínicos, epidemiológicos y toxicológicos del escorpionismo aún son escasas, esto motivó la realización de un estudio prospectivo clínico-epidemiológico (2000-2001) en 5 municipios de Tolima y 10 de Antioquia (Barona et al., 2004).

Por otra parte, las características propias del veneno, han generado la investigación de diversas áreas de la epidemiología, la fisiología, la toxicología y en forma muy importante, las relacionadas con los aspectos clínicos y el tratamiento, pero hasta ahora ninguna de estas disciplinas se ha preocupado por la investigación del posible daño a nivel celular y genético.

2.1.1.2 Signos locales y sistémicos por envenenamiento

Los signos de envenenamiento sistémico más frecuentes presentados en ratones tratados por vía intraperitoneal (i.p.), son sialorrea (salivación excesiva), piloerección, somnolencia y sudoración generalizada, a excepción de ésta última, la mayoría de los signos aparecen desde los 10 a 15 minutos posteriores a la inoculación del veneno de escorpión. Después de 20 a 30 minutos, los ratones tratados presentan taquipnea (aumento de la frecuencia respiratoria), ataxia (descoordinación en el movimiento), sudoración generalizada, convulsiones y en ocasiones la muerte. Además se puede observar que a medida que se aumenta la dosis de veneno aplicada, también se incrementa la frecuencia de los síntomas, especialmente la taquipnea, y la cianosis (coloración azulada en la piel), así como el compromiso neurológico, en casos graves se presenta sangrado por vía oral y anal 30 minutos después de la inoculación del veneno (Gómez et al., 2002).

2.1.2 DOSIS LETAL 50 (DL₅₀)

Para la realización de cualquier estudio *in-vivo* en el cual se usen sustancias tóxicas (químicas o biológicas), es fundamental determinar la Dosis Letal 50

(DL₅₀), ya que de esta se obtienen las diferentes dosis que serán usadas en el estudio. Debido a que la realización de este procedimiento genera sufrimiento en los animales tratados, en la actualidad por razones éticas se trata de usar el menor número de animales posibles, y que el tiempo de observación durante el procedimiento sea el mínimo, esto con el fin de causar el menor dolor a los animales experimentales y obtener los mejores resultados.

En toxicología se conoce como DL₅₀ a la dosis de una sustancia (química o biológica) que causa la muerte al 50% de los animales expuestos. La dosis letal depende de diversos factores como el sistema biológico o animal, la especie del animal, así como de su estado de madurez, también influyen el sexo y la dieta. Otro de los factores que influye en la realización de la DL₅₀ es el método de administración del tóxico, ya que hay sustancias que resultan menos tóxicas al ser aplicadas por vía oral que por vía intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.). Generalmente los resultados se expresan en términos de miligramos de tóxico por kilogramo de peso del animal (mg/kg), aunque se pueden usar otros factores como microgramos de tóxico por gramo del animal (µg/g), además se acostumbra decir el animal en el cual se realizó la prueba para poder extrapolar los resultados a los humanos. Los valores obtenidos en la DL₅₀ son usados como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia (química o biológica).

2.1.3 BIOMARCADORES CITOGÉNÉTICOS

Las técnicas de la epidemiología tradicional han sido siempre utilizadas como métodos para demostrar la asociación entre la exposición a sustancias peligrosas y el desarrollo de enfermedades como por ejemplo el cáncer, es así que la incorporación de biomarcadores en los estudios toxicológicos, citotóxicos, y genotóxicos, ha desempeñado un papel sumamente importante en las investigaciones, desde ya hace 25 años, ya que estos pueden ser utilizados en la implementación de programas de prevención, (Bonassi and Au, 2002), por esto se han desarrollado diversos tipos de estos marcadores, que han permitido el estudio y monitoreo de enfermedades constituidas por varias etapas. Esos biomarcadores son divididos en unas categorías específicas: dosis interna, dosis efectiva biológica, biomarcadores de efecto y susceptibilidad (Almeida Santos et al., 2005; Bonassi and Au, 2002; Mateuca et al., 2006; Norppa et al., 2006; Vainio, 1998).

Los marcadores biológicos de exposición o dosis interna, como análisis de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), rupturas de cadena, aductos a

macromoléculas, aductos en proteínas, aductos en el ADN, son biomarcadores altamente sensibles que permiten la medición de la exposición de las células a agentes químicos (Bonassi and Au, 2002).

El análisis de Alteraciones Cromosómicas (ACs), es uno de los biomarcadores de efecto biológico efectivo, más usado y mejor validado (Bonassi and Au, 2002; Mateuca et al., 2006; Norppa et al., 2006; Vainio, 1998), este análisis es muy utilizado para detectar la exposición a radiación ionizante, debido a que esta, produce alteraciones de tipo cromosómicas, como por ejemplo cromosomas dicéntricos. Por otro lado la exposición a agentes químicos usualmente induce alteraciones tipo cromatídicas, como rupturas e intercambios (Natarajan and Boei, 2003). Así mismo otros reflejan la susceptibilidad innata o adquirida, a efectos de agentes etiológicos (Vainio, 1998). Indiscutiblemente los biomarcadores son una herramienta supremamente importante para la identificación de individuos o grupos de individuos, que puedan presentar un riesgo a sufrir de determinada enfermedad.

2.1.3.1 Alteraciones Cromosómicas

Las Alteraciones Cromosómicas (ACs) se encuentran ampliamente asociadas a problemas de salud humana, tomando como ejemplo el hecho de que cerca del 0.6% de los neonatos tienen Alteraciones Cromosómicas Estructurales o Numéricas, más del 50% de los abortos espontáneos presentan ACs y muchos tumores humanos son caracterizados por deleciones o translocaciones cromosómicas específicas (Natarajan and Boei, 2003), debido a esto, la presencia de ACs en linfocitos de sangre periférica y en células de médula ósea, ha sido aplicado desde hace décadas como un biomarcador de efecto temprano de carcinógenos genotóxicos (Palitti, 1998), estas ACs son una de las consecuencias biológicas de la exposición humana a las radiaciones ionizantes o a cualquier otro tipo de agente genotóxico (Natarajan and Boei, 2003; Obe et al., 2002).

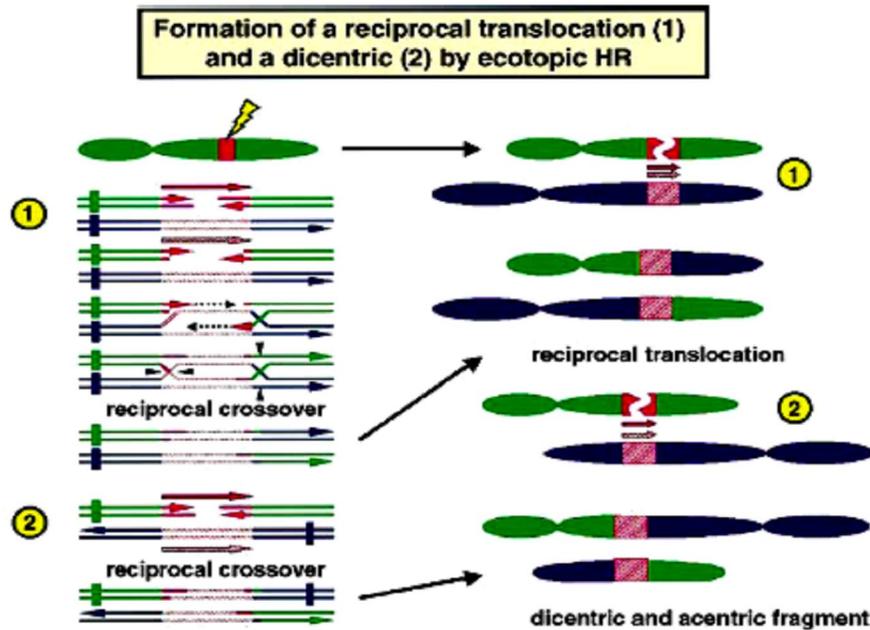
La prueba de ACs detecta cambios en la estructura de los cromosomas, que son visibles al microscopio óptico. Estos cambios corresponden a rupturas y reordenaciones dentro de un cromosoma o entre cromosomas diferentes, y pueden surgir espontáneamente o de un tratamiento químico o de radiación (Mateuca et al., 2006). La asociación entre desordenes genéticos y presencia de ACs, las convierte en biomarcadores de riesgo para procesos potencialmente carcinogénicos, especialmente a las ACs de tipo cromosómico (Norppa et al.,

2006). Generalmente la mayoría de estas ACs son producidas sobre todo por aquellas sustancias que rompen directamente la cadena de ADN (p.e. radiaciones ionizantes) o que distorsionan la doble hélice de ADN (p.e. agentes intercalantes).

Las Alteraciones Cromosómicas (ACs) pueden ser de dos tipos, Numéricas o Estructurales, las ACs Numéricas son aquellas que implican la pérdida o la ganancia de uno o varios cromosomas completos (Aneuploidias) o la variación de juegos completos de cromosomas (Euploidias), estas pueden afectar tanto a autosomas como a cromosomas sexuales, causando graves problemas de salud o la muerte. Las ACs estructurales se pueden clasificar como estables o inestables, indicando la posibilidad o no, por parte de la célula, de superar la división celular. Las ACs inestables (dicéntricos, anillos, fragmentos y otras reordenaciones asimétricas) conducen a la muerte de la célula durante la división celular mitótica. Esto es debido a que las reorganizaciones producidas no permiten la división de la célula o conducen a la pérdida de fragmentos de material genético en las células hijas. Las ACs estables (translocaciones equilibradas, inversiones y otras reordenaciones simétricas) pueden ser transmitidas a la progenie porque no interfieren con la división celular.

En la Figura 3, se puede observar la formación de dos tipos de Alteraciones Cromosómicas (ACs), en el número 1 se detalla la formación de una translocación recíproca, al producirse una ruptura de cadena doble, el cromosoma dañado se alinea con otro cromosoma homólogo, el cual le sirve de template, finalmente se obtienen dos cromosomas que han sido copiados, pero cada uno con la mitad de la información del cromosoma del cual fueron copiados, en el número 2 se representa la formación de un cromosoma dicéntrico y un fragmento acéntrico, este proceso inicia también con una ruptura de cadena doble, pero en este caso, cuando los cromosomas homólogos se alinean, lo hacen en sentido contrario, por lo tanto, cuando se producen los cortes durante la reparación, los extremos cohesivos que se forman causan la unión de los dos cromosomas enteros, formando el cromosoma dicéntrico, y así mismo sus fragmentos terminales se unen generando el fragmento acéntrico observado, en este caso los dos tipos de alteraciones se forman cuando son reparados por el sistema de Recombinación de Homólogos (HR) (Figura 3) (Obe et al., 2002).

Figura 3. Formación de una ACs (1. Translocación recíproca, 2. Cromosoma dicéntrico).



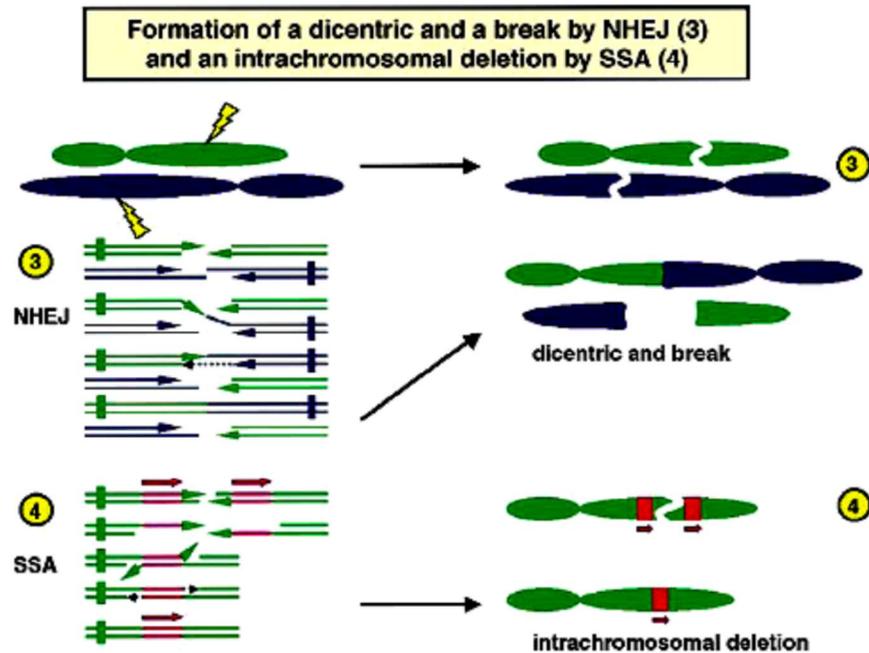
Fuente: "Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution" (Obe *et al.*, 2002)

La figura 4 muestra la formación de dos tipos de ACs, en el número 3 se observa la formación de un cromosoma dicéntrico, el cual se origina cuando se producen rupturas de cadena doble en dos cromosomas no homólogos, en este caso los extremos cohesivos generados, inducen la unión de los dos cromosomas grandes y se produce un cromosoma dicéntrico, sin embargo los fragmentos originados después del corte no se unen y por lo tanto se observan dos fragmentos acéntricos, este tipo de cromosoma dicéntrico se da cuando actúa el mecanismo de Reparación por Recombinación de No Homólogos (NHEJ), en el número 4 se observa la formación de una deleción intracromosómica, primero se produce una ruptura de doble cadena en el cromosoma, y este al ser reparado por el sistema de Alineamiento de una sola Hebra (SSA), origina la pérdida de la información genética que se encuentra entre los dos sitios de corte creados por el sistema de reparación, dando lugar así a la deleción (Figura 4) (Obe *et al.*, 2002).

Las Alteraciones Cromosómicas pueden ser de dos tipos teniendo en cuenta el momento del ciclo celular en el que tenga lugar la exposición al clastógeno, las Alteraciones de tipo cromatídico (afectan a una sola cromátida del cromosoma) y las Alteraciones de tipo cromosómico (afectan a ambas cromátidas del

cromosoma) (Figura 5 y 6), de igual forma los agentes clastógenos se pueden clasificar en dos categorías según el tipo de alteración estructural que producen: agentes S-dependientes y agentes S-independientes.

Figura 4. Formación de una ACs (3. Cromosoma dicéntrico y dos rupturas cromatídicas, 4. Delección cromosómica).



Fuente: Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. (Obe *et al.*, 2002)

Los agentes S-dependientes (radiación ultravioleta, agentes alquilantes, etc.) son aquellos Xenobióticos que necesitan atravesar la fase S del ciclo celular para producir algún tipo de daño, generalmente estos agentes causan rupturas en una sola cadena (SSB: Single Strand Break) del ADN; cuando estos agentes actúan en las fases G_0 y G_1 y las fases tempranas de la fase S, estos inducen rupturas de cadena sencilla, las cuales al producirse la duplicación del material genético durante la fase S se observan como rupturas cromatídicas, en la Metafase, de la misma manera, estos agentes pueden actuar durante la fase G_2 del ciclo celular, ocasionando los mismos daños o rupturas de una sola cadena en el ADN, pero dado que estos no son duplicados, no son observables en Metafase.

Los agentes S-independientes (radiaciones ionizantes y algunos compuestos químicos radiomiméticos como bleomicina y neocacinostatin) generalmente causan rupturas de la doble cadena (DSB: Double Strand Break) de ADN, por lo tanto no es necesario que exista duplicación del material genético para que estas

rupturas sean observables en Metafase, sin embargo, dependiendo de la fase del ciclo celular donde actúen pueden inducir Alteraciones de tipo cromatídico o cromosómico; cuando actúan durante las fases G_0 y G_1 inducen una ruptura de cadena doble, el cual al pasar por la fase de síntesis duplicará el daño, y este será observado como una Alteración de tipo cromosómico en la etapa metafásica, cuando actúan durante la fase S del ciclo celular pueden producir una mezcla de ambos tipos de daños, cromosómico y cromatídico, dependiendo si el daño se produce en la fase S temprana o fase S tardía, si el daño es producido durante la fase S temprana se observara durante la metafase una Alteración de tipo cromosómico, por otro lado, si el daño es producido durante la fase S tardía, se observara durante la metafase una Alteración de tipo cromatídico, de igual forma, si el daño o ruptura es producido en la etapa G_2 , del ciclo celular, se producirán rupturas de cadena doble, pero ya que este daño no pasa por fase S, no se duplica, por esta razón el daño es observado en metafase como una Alteración de tipo cromatídico (Mateuca et al., 2006; Natarajan and Boei, 2003; Obe et al., 2002; Palitti, 1998) (Figura 5 y 6).

Como los linfocitos periféricos se encuentran en la fase G_0 en circulación, las lesiones inducidas por los agentes radiomiméticos pueden ser reparadas inmediatamente, no reparadas, o reparadas incorrectamente, dando lugar en ciertos casos a Alteraciones de tipo cromosómico. La frecuencia de estas Alteraciones no se reduce, excepto por dilución de la población, por linfocitos no afectados o por recambio celular. Esta es la razón del por qué las Alteraciones de tipo cromosómico pueden ser detectadas incluso años después del cese de la exposición. En el caso de las lesiones inducidas por los agentes S-dependientes, éstas sólo se expresarán cuando la célula atraviese la fase S (fase de replicación del ADN), por lo que hasta que la célula sea estimulada, pueden pasar largos períodos en los que puede darse la reparación celular, de modo que sólo algunas alteraciones se mantendrán y se expresarán como alteración cuando se dé la estimulación *in-vitro*. Las Alteraciones Cromosómicas estructurales son indicadores de exposición a genotóxicos y mutágenos. Generalmente conducen a la muerte de la célula o de su progenie, estas son originadas cuando los cromosomas rotos se restituyen o intercambian fragmentos entre ellos. Por esto se puede asumir que todos los agentes que producen rupturas cromosómicas también inducen mutaciones (Mateuca et al., 2006; Natarajan and Boei, 2003; Obe et al., 2002; Palitti, 1998).

Figura 5. Tipos de Alteraciones inducidos por la exposición a agentes clastógenos según la fase del ciclo celular en que han ejercido su acción y su dependencia de la fase S. (Flecha roja: Daño inducido por radiación ionizante o por químicos radiomiméticos (S-independientes); Flecha verde: Daño inducido por químicos o agentes clastógenos (S-dependientes)).

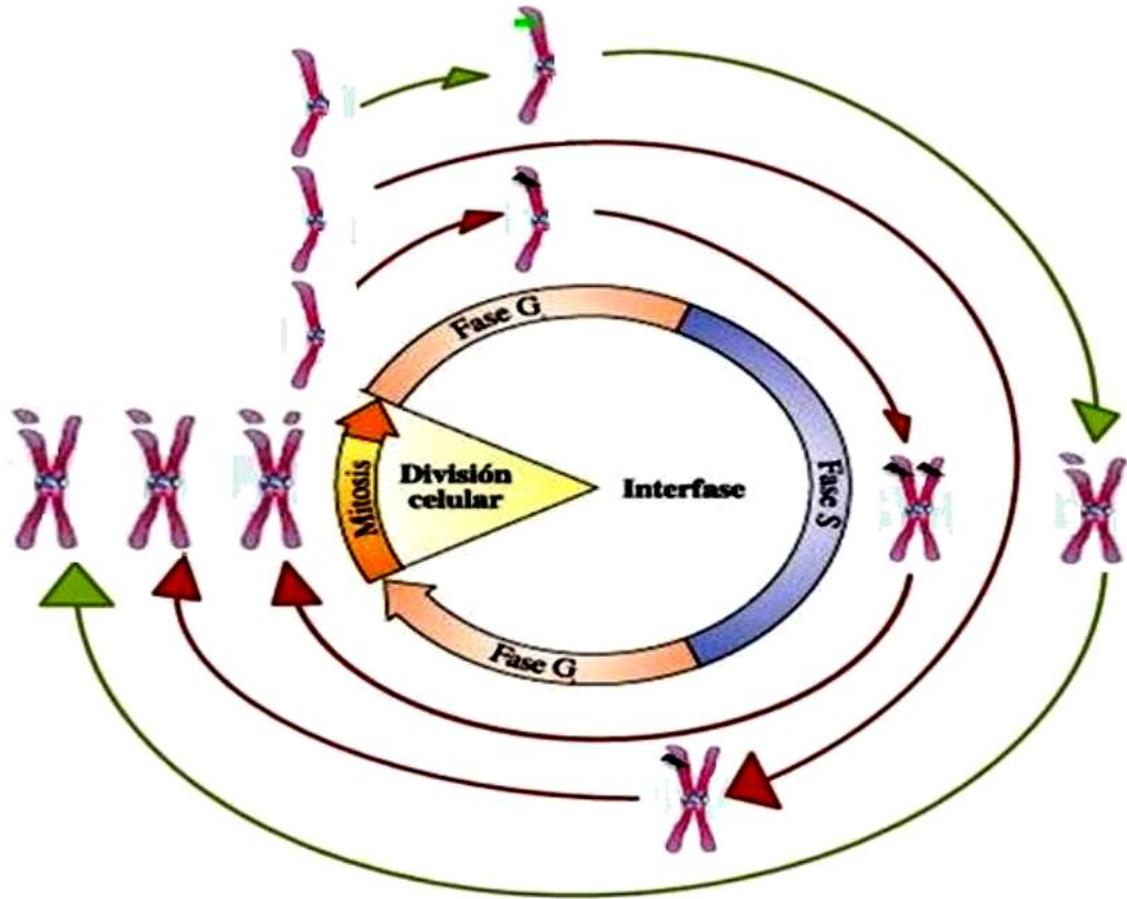


Figura 6. Tipos de Alteraciones inducidos por la exposición a agentes clastógenos según la fase del ciclo celular en que han ejercido su acción.

AC. Cromosómicas							AC. Cromatídicas						
P R O F A S E	M E T A F A S E	A N A F A S E	T E L O F A S E	G ₁	S	G ₂	P R O F A S E	M E T A F A S E	A N A F A S E	T E L O F A S E			
MITOSIS				INTERFASE						MITOSIS			

2.1.4 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs)

Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), es un nombre genérico que se le ha dado a una variedad de moléculas y radicales libres derivados del oxígeno, entre las cuales se encuentran el ion Superóxido (O_2^-), el radical Hidroxilo (OH^\cdot) y el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) (Bennett, 2001; Engel and Evens, 2006; Tudek et al., 2010), las EROs son formadas como productos inevitables de la respiración aeróbica (dada en la mitocondria), y de otros varios procesos anabólicos y catabólicos, son altamente reactivas y pueden reaccionar con macromoléculas biológicas, modificar la estructura y función de proteínas, y causar daño oxidativo en el ADN (Circu and Aw, 2010; Covarrubias et al., 2008; Engel and Evens, 2006; Stowe and Camara., 2009; Thannickal and Fanburg, 2000; Waris and Ahsan, 2006; Weinberg et al., 2010).

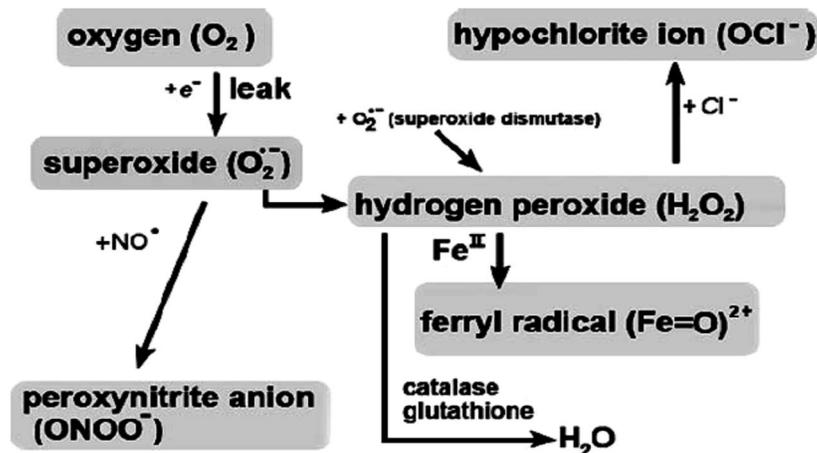
Actualmente se sabe que las EROs, cuando son estrechamente reguladas, cumplen funciones como mensajeros secundarios dentro de los procesos de señalización intracelular (Circu and Aw, 2010; Covarrubias et al., 2008; Raval et al., 2006; Waris and Ahsan, 2006), estas existen en todas las células aeróbicas en un balance con los antioxidantes bioquímicos (Waris and Ahsan, 2006), pero un desbalance en el contenido intracelular puede inducir muerte apoptótica por estrés oxidativo (Tudek et al., 2010).

La formación de las EROs se puede dar por la exposición a la radiación Gama (γ), X, UV, por la biotransformación de químicos, algunos componentes de la dieta, reacciones inflamatorias, y también como resultado del metabolismo de diversos compuestos llevado a cabo en la célula, se generan cuando interactúan con ciertas sustancias o procesos celulares como el citocromo b_5 reductasa, peroxisomas, catecolaminas, hidroquinonas, oxidasas de la membrana plasmática como el NADPH oxidasa, lipoxigenasas, monoaminas oxidasas, xantina/xantina oxidasa, sintasas de óxido nítrico acopladas o desacopladas, vías de eicosanoides, entre otros (Stowe and Camara., 2009; Thannickal and Fanburg, 2000; Tudek et al., 2010).

La mayoría de estos compuestos pueden perder un electrón por autooxidación y formar el radical anión superóxido (O_2^-), no obstante, estas EROs formadas o liberadas en el citosol, son amortiguadas bajo fuertes condiciones de reducción por tioles intracelulares, particularmente el glutatión (GSH) y el tioredoxin ($TRXSH_2$) por la acción de sus reductasas (Thannickal and Fanburg, 2000), sin embargo, debido a que son controladas y reducidas rápidamente, no se ha

demostrado si tienen una función específica en la iniciación de la apoptosis. Por otro lado, las EROs que son producidas en la mitocondria durante el proceso de respiración celular (Ciclo de Krebs), han sido estudiadas con mayor profundidad, además se ha demostrado que al producirse el estrés oxidativo, estas actúan como iniciadores del proceso apoptótico, y varios estudios demuestran que tiene una acción directa sobre el ADN (Bernardi et al., 1999; Circu and Aw, 2010; Floyd, 1990; Jackson and Loeb, 2001; Tudek et al., 2010)(Figura 7).

Figura 7. Productos del superóxido (O_2^-) y sus catalizadores.



Fuente: Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. (Stowe and Camara., 2009)

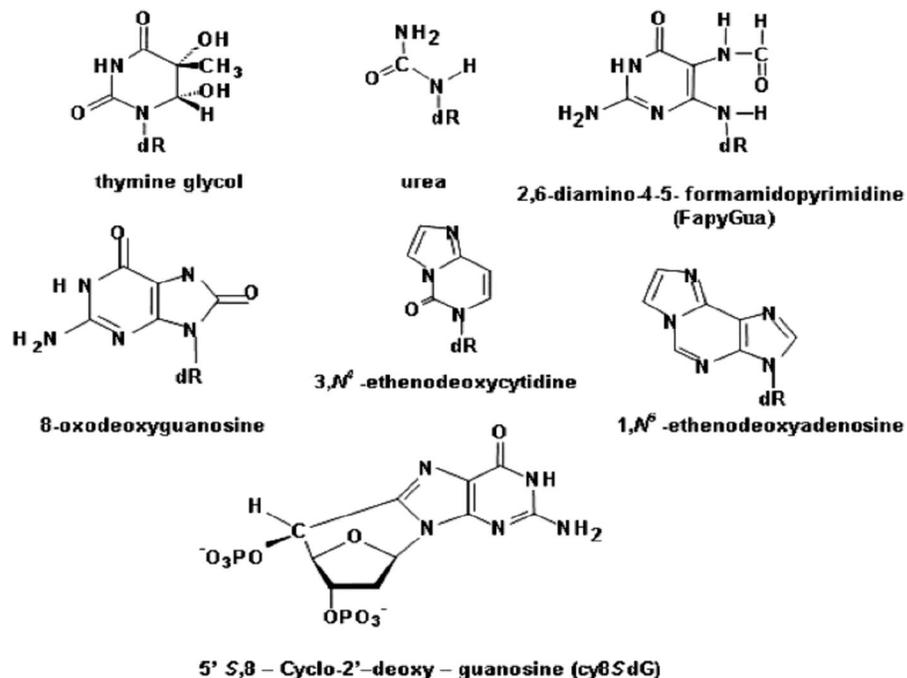
Las EROs producidas a nivel mitocondrial, se generan en su gran mayoría en dos de los cuatro complejos que participan en la cadena respiratoria, exactamente en los complejos I y III. El complejo I o también llamado NADH, tiene como función catalizar la transferencia de electrones del NADH al complejo II o coenzima Q en la cadena respiratoria, la formación del Ion superóxido (O_2^-) en este complejo se da cuando el NADH es oxidado a NAD^+ , después que este transfiere sus dos electrones a un flavin mononucleotido (FMN), en este momento es cuando se produce la liberación de los electrones, los cuales al unirse al oxígeno forman el Ion superóxido (O_2^-). El complejo I es probablemente la principal fuente de EROs mitocondriales en la mayoría de las condiciones fisiológicas.

Otro de los sitios importantes en la generación de EROs, es el complejo III o complejo citocromo bc1, el complejo III recibe dos electrones de QH2 (complejo II o Succinato deshidrogenasa), y se los transfiere a dos moléculas de citocromo c, es en este momento de la transferencia al citocromo c cuando se produce la

liberación de los electrones que interactúan con el oxígeno para formar más iones superóxido (Bernardi et al., 1999; Circu and Aw, 2010; Stowe and Camara., 2009; Thannickal and Fanburg, 2000).

El ataque de las EROs al ADN puede dar como resultado la formación de rupturas de cadena sencillos o dobles, generación de sitios abásicos, y lesiones en las bases o azúcares. El ataque de los radicales hidroxilos (OH^\cdot) causa ionización de las bases del ADN, así como de otros componentes celulares. La acción de los radicales libres sobre el ADN genera toda una serie de daños, entre ellos un gran número de lesiones derivadas de Purinas y Pirimidinas, algunas de estas bases de ADN modificadas tienen un potencial considerable para afectar la integridad del genoma. Los principales productos del daño oxidativo al ADN incluyen la 8-oxo-7,8- dihidroadenina (8-oxoAde), 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua); y sus deoxinucleosidos equivalentes, 8-oxodG, 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (Timina glicol, Tg) y lesiones de anillo abierto como 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyAde) y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua) (Floyd, 1990; Thannickal and Fanburg, 2000; Tudek et al., 2010) (Figura 8).

Figura 8. Principales lesiones de bases en el ADN inducidos por el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica.



Fuente: Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. (Tudek et al., 2010)

La lesión de la 8-oxoGua es una de las más ampliamente estudiadas, la presencia de residuos de 8-oxoGua en el ADN generalmente lleva a transversiones de tipo GC→ TA, a menos que sean reparadas antes de la replicación del ADN, además estas lesiones al intentar ser reparadas por los mecanismos de reparación del ADN, pueden generar sitios abásicos (sitios apurínicos). Por lo tanto, la presencia de 8-oxoGua en las células puede dar lugar a mutaciones puntuales. Un nivel elevado de 8-oxoGua acompaña el desarrollo de varias enfermedades humanas, se han encontrado altas concentraciones de 8-oxoGua en el ADN de leucocitos de la sangre y en la orina de pacientes de cáncer de pulmón y de colon (Tudek et al., 2010) (Figura 8).

2.1.5 MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PCD)

Existen dos mecanismos de muerte celular programada, los cuales son regulados por procesos de señalización altamente controlados, con los cuales los organismos mantienen su estabilidad tanto celular como genómica, y también están involucrados en procesos de dar forma y mantener el tamaño de ciertos órganos y tejidos (Gewies, 2003). Estos mecanismos de protección, se pueden presentar como respuesta a un daño severo a nivel celular o tisular, o por procesos naturales del organismo (señalización celular extrínseca e intrínseca) (Fink and Cookson, 2005; Gewies, 2003).

El primero de estos, conocido como necrosis, es un proceso de muerte celular que puede ser considerado patológico, causado por un daño severo a nivel celular, durante el cual se pierde la integridad de la membrana y se presenta lisis de la misma, debido a esto se produce la liberación de sustancias proinflamatorias que sirven como iniciadores en los procesos de muerte necrótica en las células y tejidos adyacentes (De Toro, 2006; Fink and Cookson, 2005; Gewies, 2003).

El segundo proceso se conoce como apoptosis, este es considerado una muerte fisiológica de la célula y, al contrario de la necrosis, la apoptosis no tiene efectos patológicos, en realidad se trata de un mecanismo de defensa y control, que permite al organismo eliminar una o varias células específicas que presenten daño a nivel de membrana o a nivel genómico. En este se presentan ciertas características específicas que son propias del proceso, como la formación de cuerpos apoptóticos y la desintegración de la cromatina, pero sin los procesos inflamatorios que se observan en la necrosis. La apoptosis se encuentra activa desde el inicio del proceso embrionario, y participa en la eliminación de ciertas

estructuras, o durante la formación de otras para mantener su forma y tamaño, así mismo juega un rol importante en el mantenimiento del sistema inmune y en la homeostasis de los organismos (Bernardi et al., 1999; Brodská, 2011; De Toro, 2006; Fink and Cookson, 2005; Gewies, 2003; Jordan, 2003).

2.1.5.1 Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo altamente eficiente en la eliminación de células dañadas o que han completado su ciclo de vida, es un proceso altamente regulado por diferentes factores y proteínas, muchos de los cuales actúan en las diferentes fases, puede ser actuando como iniciadores, mediadores, ejecutores o como reguladores de la señal apoptótica (Gewies, 2003). Los componentes de la red de señalización apoptótica se encuentran codificados genéticamente, y pueden ser activados en cualquier célula por factores tanto intrínsecos como extrínsecos, como por ejemplo por la unión de señales a los receptores de superficie celular, por daño al ADN como resultado de mecanismos de reparación defectuosos, tratamientos con drogas citotóxicas o por radiaciones, por la falta de señales de supervivencia, o por señales de muerte. Aunque la ruta apoptótica más que ser lineal, es una ruta muy ramificada, debido a que los estímulos pueden venir de diferentes partes, por lo general confluyen hacia una ruta similar que finalmente llevara a la muerte de la célula por apoptosis (Kaufmann and Earnshaw, 2000).

Uno de los primeros eventos que se da a nivel celular durante la apoptosis, es el cambio en la conformación de la membrana celular, esto sucede como resultado de cambios bioquímicos intracelulares, los cuales interfieren en las uniones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína, las cuales son las encargadas de mantener la estabilidad de la membrana, de la misma forma se da un cambio en la acción de tres enzimas específicas (flipasa, flopasa, escramblasa) dependientes de ATP, la escramblasa es una de las más importantes en los cambios que se observan durante la apoptosis, esta enzima es la encargada de mantener un flujo constante de fosfolípidos entre el interior y el exterior de la célula, pero durante el proceso apoptótico su acción se degenera totalmente, lo que da como resultado la desestabilización de la membrana celular, es importante anotar que esta enzima es dependiente del Calcio intracelular, y como se sabe una gran cantidad de venenos escorpiónicos poseen toxinas específicas que afectan los canales de Calcio. Otro de los cambios importantes es la formación de unas pequeñas ampollas conocidas como “blebs”, los cuales se forman como resultado de un

cambio en la conformación del citoesqueleto debido a la proteólisis de ciertas sustancias que lo conforman.

Uno de los orgánulos celulares más importante es la mitocondria, y se ha encontrado que esta está directamente relacionada con el proceso apoptótico, se han encontrado ciertos cambios importantes que se producen en ella durante la apoptosis. En primer lugar se produce un desacople en la cadena de transporte de electrones, así como una detención del metabolismo energético, como consecuencia de esto, se produce una caída en la producción de ATP, pero esto ocurre a largo plazo y no parece estar implicado en la inducción de apoptosis; en segundo lugar se da una alta producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), ya que al perder eficiencia la cadena de transporte durante la apoptosis, se incrementa la formación de estos radicales libres (O_2^-), y por último se produce una gran liberación de moléculas de citocromo c, las cuales juegan un papel muy importante en la formación del apoptosoma formado por Apaf-1 y la procaspasa 9, además se encarga de su procesamiento hasta dar lugar a caspasa-9 activa, la cual es una de las caspasas iniciadoras de la apoptosis. (Bernardi et al., 1999; Gewies, 2003)

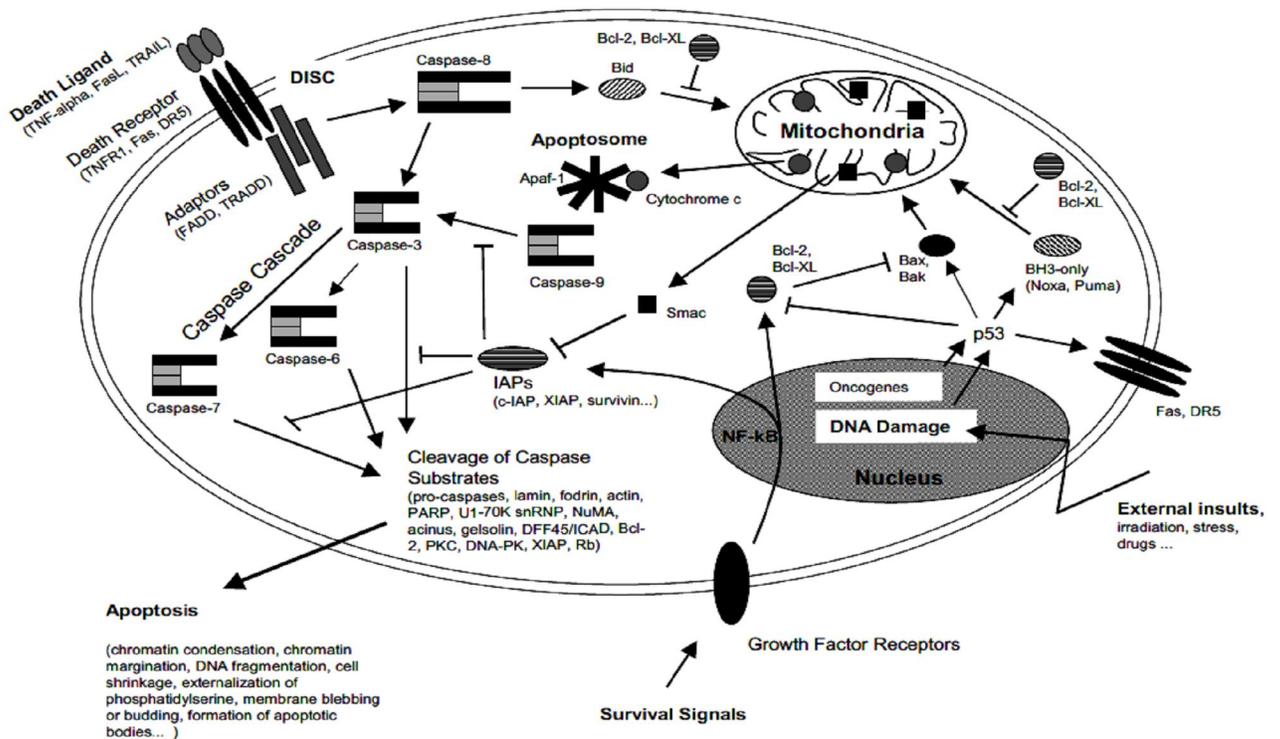
Para entender cómo se da el proceso apoptótico, debemos hablar en primer lugar de una serie de proteínas conocidas como caspasas (cysteine-dependent aspartate-specific proteases), las cuales participan como iniciadoras, reguladoras o como efectoras, en los humanos se han identificado 11; dentro del grupo de caspasas proapoptóticas, se pueden dividir dos grupos, las caspasas iniciadoras, entre las que se encuentran la 2, 8, 9 y 10, y las ejecutoras son la 3, 6 y 7 (Earnshaw et al., 1999; Fink and Cookson, 2005). Las caspasas generalmente se encuentran en forma de zimógenos (precursor enzimático inactivo) en la célula, y deben ser activados, ya sea por una señal extrínseca o intrínseca, estas poseen en su extremo N-terminal un prodominio seguido por una subunidad grande y una pequeña (Fink and Cookson, 2005; Gewies, 2003). La caspasa activa se forma por la unión de dos subunidades pequeñas y dos subunidades grandes.

Mientras que las caspasas ejecutoras poseen solo prodominios cortos, las caspasas iniciadoras poseen prodominios largos, en los cuales se encuentran los dominios efectoras de muerte (DED) (procaspasas 8 y 10), o los dominios reclutadores de caspasas (CARD) (procaspasa 9 y 2); las caspasas una vez activadas tienen la capacidad de activar las procaspasas adyacentes mediante autoproteólisis, y así generar una cascada de señalización.

A través de sus prodominios, las procaspasas iniciadoras son reclutadas y activadas en complejos de señales inductoras de muerte (Death Inducing Signalling Complex, DISC), ya sea por la unión de señales a los receptores de muerte de la superficie celular (vía apoptótica extrínseca), o en respuesta a señales originadas desde el interior de la célula (vía apoptótica intrínseca).

En la vía apoptótica extrínseca, la procaspasa 8 es reclutada por sus DEDs al DISC, el cual es un complejo receptor de membrana formado después de la unión de un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). Cuando se unen al DISC, las moléculas de procaspasa 8 se encuentran muy juntas y de esta manera se da la activación de las adyacentes y la posterior cascada de señalización (Figura 9).

Figura 9. Representación esquemática de algunas de las principales vías de señalización apoptótica.



Fuente: Introduction to Apoptosis. (Gewies, 2003)

La vía apoptótica intrínseca, involucra principalmente a la procaspasa 9, la cual es activada por los eventos proapoptóticos mitocondriales, y forma el llamado Apoptosoma, el cual está formado por la unión de la proteína Apaf-1, el citocromo c liberado por la mitocondria y la procaspasa 9. En primer lugar durante la

formación del Apoptosoma, se unen la proteína Apaf-1 y el citocromo c, esta unión permite que los CARDs presentes en la proteína Apaf-1 sean liberados y queden en disposición de unirse con la procaspasa 9, la cual después de unirse al complejo se transforma en una caspasa 9 activa (Denault and Salvesen, 2002), la cual tiene la capacidad de activar caspasas efectoras, como la número 3, esta sucesión de acontecimientos acaba desembocando en la activación de otras caspasas, y de factores de degradación de ADN que se encargan de fragmentar el material genético (Bernardi et al., 1999; Earnshaw et al., 1999; Gewies, 2003) (Figura 9).

2.1.6 BIOTRANSFORMACIÓN

En la actualidad, debido al avance en la creación de sustancias para uso industrial y doméstico, y al descubrimiento de ciertas sustancias naturales, las personas se encuentran constantemente en contacto con muchas clases de xenobióticos, los cuales son moléculas o sustancias que no son producidas de forma natural por los organismos, estas sustancias pueden ingresar a nuestro organismo por diferentes vías, como la piel, por vía oral o por inhalación, entre otros. La gran mayoría de xenobióticos presentan características lipofílicas, por lo que pueden entrar fácilmente a las células, e interactuar con una gran cantidad de moléculas y estructuras celulares lipofílicas, además, debido a que no son degradadas por las rutas del metabolismo intermedio, es posible que se acumulen en tejidos u órganos y alteren la homeostasis celular y del organismo en general (Donato, 2000; Nebbia, 2001).

Cuando un xenobiótico ingresa a cualquier organismo, sufre cuatro procesos principales, los cuales son la absorción, distribución, biotransformación (metabolismo de xenobióticos) y finalmente la eliminación del mismo. Sin embargo, la etapa más importante podría ser la de biotransformación, ya que es durante esta que se da la activación o inactivación del xenobiótico, es decir, que durante esta etapa se puede aumentar o disminuir considerablemente la capacidad de la sustancia de causar daños en tejidos o moléculas, o de ser acumulada o rápidamente eliminada.

Aunque los procesos enzimáticos de biotransformación se dan en diferentes órganos (riñón, pulmón piel, intestinos), el hígado es sin lugar a dudas el órgano principal donde se realizan estas reacciones, y su función principal es la detoxificación del organismo. Las etapas de biotransformación de los xenobióticos

se dan en dos fases principales, la Fase I o también llamada fase de transformación, durante esta fase, actúan enzimas muy diversas y con una baja especificidad, por lo cual pueden actuar sobre una cantidad casi ilimitada de substratos, y catalizar diversas reacciones, entre estas enzimas se encuentran algunas con actividad monooxigenasa (Citocromo P-450, Flavin monooxigenasa), varias oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), esterases y amidasas hepáticas y plasmáticas. Entre las reacciones que producen estas enzimas se cuentan reacciones de oxidación, hidrólisis y reducción, que finalmente convierten los xenobióticos en moléculas más hidrosolubles, gracias a la incorporación de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo) (Donato, 2000; Kenneth W, 2001; Klinger, 1982; Nebbia, 2001). Durante la Fase II, también llamada de conjugación, se dan principalmente este tipo de reacciones mediadas por transferasas, en esta etapa el xenobiótico o los metabolitos formados en la Fase I, se unen covalentemente a moléculas endógenas polares (Glutathion, ácido glucurónico, acetatos, metilos, sulfatos, glucosa, aminoácidos), de este modo se forman compuestos generalmente inactivos, los cuales son excretados rápidamente (Klinger, 1982).

Aunque el objetivo principal de las reacciones de biotransformación son las de producir moléculas y sustancias más polares, más hidrosolubles, para que sean fácilmente excretadas por el organismo, en ocasiones los metabolitos generados, pueden resultar mucho más tóxicos y reactivos que la sustancia inicial (Kenneth W, 2001; Nebbia, 2001), estas nuevas moléculas tienen la capacidad de interactuar con elementos o procesos celulares, esto sucede cuando se da la formación de radicales libres y otros metabolitos electrofílicos (epóxidos alifáticos o aromáticos, quinonaimidas), capaces de unirse covalentemente y modificar macromoléculas (ADN, proteínas), o de producir interacciones no covalentes (p. e. estrés oxidativo), lo que finalmente puede causar desbalances celulares, reacciones inmunológicas, producir efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos (Kenneth W, 2001; Nebbia, 2001), y desencadenar a largo plazo enfermedades asociadas a estos procesos, tales como el cáncer.

Además de las características propias del xenobiótico, existen otros factores que pueden afectar la respuesta del organismo a estas sustancias, tales como la edad, el género, factores genéticos, la nutrición, la dieta, factores ambientales y alteraciones patológicas (enfermedad hepática)(Donato, 2000; Klinger, 1982).

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ESCORPIONISMO

En el año 2000, con el fin de conocer las características clínicas y epidemiológicas del envenenamiento escorpiónico, se realizó un estudio descriptivo en varios hospitales de los departamentos de Antioquia y Tolima, en los cuales se presentaron 129 casos durante el año de estudio, 78 de los cuales se presentaron en el departamento del Tolima, la mayoría de los accidentes que ocurrieron fueron intradomiciliarios (70.5%), las partes del cuerpo más afectadas fueron las manos (27.9%) y los pies (26.4%). Los síntomas de envenenamiento sistémico fueron significativamente más frecuentes en niños que en adultos, se administró un antídoto anti-*Centruroides* spp. a 19 de 31 pacientes que presentaron síntomas de envenenamiento sistémico, ninguno de estos presentó reacción adversa al antídoto (Otero et al., 2004). En el Departamento del Cauca no hay estudios reportados.

Durante un año se realizó un estudio prospectivo en un sector de la ciudad de Medellín, en una muestra del 9,6% de las casas (180) y del 9,4% de la población del área (719 habitantes); con el objetivo de determinar las características toxicológicas, clínicas y epidemiológicas del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni*, el cual presentó una DL₅₀ (i.p.) en ratones (18-20 g) de 79,2 µg (3,9 mg veneno/kg). Durante todo el estudio se detectaron 32 accidentes por *T. fuhrmanni*. El 90,6% de los casos fueron leves y el 9,4% (3 niños) tuvieron envenenamiento moderado con signos sistémicos (sudoración generalizada, dolor abdominal). Las zonas corporales más afectadas fueron las manos (31.3%), la cabeza y el cuello (18.8%), no hubo casos graves y los pacientes no requirieron hospitalización. Durante la realización de la DL₅₀ los ratones tratados por vía intraperitoneal (i.p.), presentaron sialorrea (salivación excesiva), piloerección, somnolencia, sudoración generalizada, taquipnea (aumento de la frecuencia respiratoria), cianosis (coloración azulada en la piel), ataxia (descoordinación en el movimiento) y convulsiones antes de morir. La rápida aparición (10-15 min) de los signos de envenenamiento en los ratones y su pronta desaparición (2 horas) en los sobrevivientes, permiten concluir que el veneno es de rápida absorción, distribución y eliminación (Gómez et al., 2002).

Se han realizado estudios retrospectivos con base en 25 historias clínicas, en las cuales se reportaron accidentes escorpiónicos, en el Hospital San Rafael de la ciudad de Girardot, donde se encontró una mayor frecuencia de accidentes en

mujeres (56%) y en horas de la noche (73%). Además se encontró que las manos y pies eran las zonas del cuerpo más afectadas por picaduras, con un 30% y 35%, respectivamente. Los medicamentos más utilizados para los tratamientos fueron los antihistamínicos (88%), los glucocorticoides (32%) y adrenalina (32%). Este estudio concluyó que el escorpionismo es frecuente en Girardot y que su tratamiento no fue el más indicado (Pineda Rivera and Castellanos, 1998). En el Cauca no existen estudios epidemiológicos o retrospectivos reportados(Cuadro 1).

Cuadro 1. Antecedentes de estudios epidemiológicos de escorpionismo en Colombia.

Nombre del estudio	Autores	Resultados
Envenenamiento escorpiónico en dos regiones de Colombia: aspectos clínicos, epidemiológicos y terapéuticos	Otero, R. et al. (2004).	Mayormente accidentes intradomiciliarios, manos y pies partes más afectadas, envenenamiento sistémico más frecuente en niños.
Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión <i>Tityus fuhrmanni</i> Kraepelin.	Gómez, J. P. et al. (2002)	DL ₅₀ : 3.9 mg/Kg, síntomas en ratones tratados vía i.p., sialorrea, piloerección, somnolencia entre otros. En humanos causa sudoración generalizada y dolor abdominal. Partes más afectadas, manos, cabeza y cuello
Escorpionismo en Girardot Hospital San Rafael: Enero-Junio de 1994.	Pineda Rivera, D., and Castellanos, J. A. (1998).	Mayor frecuencia de accidentes en mujeres, y durante la noche, las partes más afectadas fueron manos y pies. El tratamiento no fue el más indicado.

2.2.2 ESTUDIOS MOLECULARES DE LOS VENENOS DE ESCORPIÓN

La toxicidad del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia fue evaluada *in-vivo*, para probar la efectividad de los antídotos anti-escorpión producidos en Latinoamérica, por Alacramyn, del Instituto Bioclón de México; el suero anti-escorpiónico del Instituto Butantán, de São Paulo, Brasil, y el suero anti-escorpiónico del Centro de Biotecnología de la Universidad Central de Venezuela (Caracas, Venezuela). Este escorpión produjo 0,68±0,20 mg de veneno por estimulación manual, el cual presentó una dosis letal 50 (DL₅₀) en ratones de 4,8 mg/kg (91,3 mg/ratón de 18-20 g). Por electroforesis (SDS-PAGE) se demostró que el veneno contiene proteínas desde menos de 14 kd hasta 97 kd. Los

Western-blot indicaron reactividad inmunológica de los tres antídotos con los diversos componentes del veneno, incluso las proteínas de baja masa molecular (<14 kd). Los resultados permiten concluir que el veneno de *T. pachyurus* es neutralizado eficientemente por los antídotos contra picaduras de escorpiones producidos en México y Brasil (Barona et al., 2004). En nuestro país no existen reportes de antídotos anti-escorpiónicos para la especie *Centruroides margaritatus*, o alguna otra especie.

Las proteínas del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*, de ejemplares adultos capturados en el norte de Perú, fueron separadas mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25. El perfil cromatográfico reveló la presencia de 9 picos de proteína, y los ensayos de toxicidad permitieron identificar tres tipos de toxinas, cada una específica para crustáceos, insectos y roedores, respectivamente. Tanto en el veneno crudo como en las fracciones colectadas, no se encontró actividad de fosfolipasa ni actividad proteolítica, esto debido a que el veneno es usado para inmovilizar la presa, pero no participa en la digestión de la misma (Escobar et al., 2003).

Teniendo en cuenta que la toxicidad del veneno de escorpión es una de las de mayor interés debido a su influencia en las actividades humanas, y la salud pública, se ha evaluado el efecto citotóxico y apoptótico del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus* en dos líneas celulares eucarióticas (293T, C2C12). La citotoxicidad fue notable, y la supervivencia celular fue altamente reducida a la concentración más alta probada (50 µg/ml). Hubo un incremento significativo en la liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH) citosólica, lo que sugiere que esta toxina actúa a nivel de membrana. Los efectos citotóxicos son dependientes de la dosis y el tiempo, y la muerte celular por apoptosis fue más característica en la línea celular 293T que en la C2C12. Los efectos apoptóticos fueron más claros y notables en los estadios tempranos de toxicidad (formación de ampollas), mientras que otras formas de daño celular tal como hinchazón, ruptura, y/o necrosis ocurrieron en los estadios apoptóticos tardíos (Omran, 2003) (Cuadro 2).

2.2.3 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS Y GENOTÓXICOS

Hasta el momento se han usado diferentes biomarcadores para evaluar la acción genotóxica de ciertas toxinas animales, en un estudio realizado por Dueñas-Cuellar en el 2009, se evaluó *in-vivo* el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* empleando el biomarcador de

Cuadro 2. Antecedentes de estudios moleculares de venenos de escorpión.

Nombre del estudio	Autores	Resultados
Aspectos toxicológicos e inmunológicos del veneno del escorpión <i>Tityus pachyurus</i> Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica	Barona, J. <i>et al.</i> (2004).	DL ₅₀ en ratones 4,8 mg/kg, el veneno contiene proteínas desde menos de 14 kd hasta 97 kd, el veneno de <i>T. pachyurus</i> es neutralizado por los antídotos producidos en México y Brasil.
Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de <i>Centruroides margaritatus</i> (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae).	Escobar, E. <i>et al.</i> (2003).	Cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25, presencia de 9 picos de proteína, tres tipos de toxinas, específicas para crustáceos, insectos y roedores, no actividad de fosfolipasa o proteolítica.
Efecto citotóxico y apoptótico del veneno del escorpión <i>Leiurus quinquestratus</i> en las líneas celulares eucarióticas 293T y C2C12.	Omran, M. A. A. (2003).	Alta citotoxicidad a la concentración más alta, la toxina actúa a nivel de membrana, efectos citotóxicos son dependientes de la dosis y el tiempo, la muerte celular por apoptosis fue más característica en la línea celular 293T que en la C2C12.

Micronúcleos (Mn), después de realizar la DL₅₀ del escorpión *C. margaritatus*, reportó una dosis de 46.63 µg/g, y evaluó los signos locales y sistémicos de envenenamiento por observación directa, los principales signos presentados por los ratones tratados por vía intraperitoneal (i.p.) fueron sialorrea, taquipnea, disnea (dificultad respiratoria), pérdida de equilibrio y tremor, como era de esperarse se presentó la muerte en aproximadamente el 50% de los ratones tratados. Respecto al daño citotóxico y genotóxico después del desarrollo de este estudio se concluyó que el veneno de este escorpión tiene un efecto citotóxico *in-vivo* sobre los eritrocitos de sangre periférica, presentándose mayor citotoxicidad con la dosis baja y media, pero no con la dosis alta, esto probablemente por la acción del veneno sobre los canales iónicos de Ca²⁺ los cuales son muy importantes en el inicio de la cascada apoptótica, al evaluar el efecto genotóxico, se encontró que la dosis más alta de veneno probada incrementó la frecuencia de Micronúcleos (Mn), demostrando así que el veneno o sus derivados metabólicos interactúan con el material genético (ADN), o con algunos componentes celulares (microtúbulos) (Dueñas-Cuellar, 2009).

Otro de estos estudios usó el biomarcador de Micronúcleos (Mn), para evaluar *in-vivo* el efecto citotóxico y genotóxico del veneno de la víbora *Bothrops asper*, en este estudio se concluyó que el veneno tiene efecto citotóxico *in-vivo*, mostrando

un efecto dosis-respuesta inversamente proporcional, ya que la dosis más baja probada fue la que causó la citotoxicidad más alta, esto puede deberse a la composición del veneno y a su forma de acción en el organismo. Por otro lado, respecto al daño genotóxico, se observó un efecto dosis-respuesta directamente proporcional, ya que a mayor dosis de veneno aplicada, se observó un aumento en la frecuencia de Micronúcleos (Mn), causados probablemente por las enzimas exonucleasas con actividad ADNasa presentes en el veneno (Yasnó V., 2005) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Antecedentes de estudios Toxicológicos y Genotóxicos de venenos de escorpión.

Nombre del estudio	Autores	Resultados
Valoración <i>in – vivo</i> del efecto Tóxico, Citotóxico y Genotóxico del veneno del escorpión <i>Centruroides margaritatus</i> (Gervais, 1841)	Dueñas-Cuellar, (2009)	El veneno de este escorpión tiene un efecto citotóxico <i>in-vivo</i> sobre los eritrocitos de sangre periférica, presentándose mayor citotoxicidad con la dosis baja y media. Respecto al efecto genotóxico, se encontró que la dosis más alta de veneno probada incrementó la frecuencia de Micronúcleos (Mn),
Determinación del efecto Citotóxico y Genotóxico del veneno de serpiente <i>Bothrops asper</i> (Viperidae) en eritrocitos de sangre periférica de ratones (<i>Mus musculus</i>) mediante la prueba de Micronúcleos.	Yasnó V., (2005)	El veneno tiene efecto citotóxico <i>in-vivo</i> , mostrando un efecto dosis-respuesta inversamente proporcional, ya que la dosis más baja probada fue la que causó la citotoxicidad más alta. Respecto al daño genotóxico, se observó un efecto dosis-respuesta directamente proporcional, ya que a mayor dosis de veneno aplicada, se observó un aumento en la frecuencia de Micronúcleos (Mn)

2.2.4 ANTECEDENTES DEL BIOMARCADOR DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

La incorporación de biomarcadores en los estudios toxicológicos, citotóxicos, y genotóxicos, ha aumentado en los últimos 25 años, ya que estos son marcadores de efecto y de respuesta temprana, de células que han sufrido algún tipo de daño inducido por compuestos carcinógenos (Almeida Santos et al., 2005; Bonassi and Au, 2002; Mateuca et al., 2006; Norppa et al., 2006; Vainio, 1998), además son importantes en la predicción de riesgo de sufrir enfermedades a largo plazo como

el cáncer u otro tipo de enfermedades crónicas asociadas a exposición a genotóxicos.

En lo concerniente a las Alteraciones Cromosómicas (ACs), se han elaborado numerosos estudios que indican que estas son predictoras de riesgo de cáncer (Almeida Santos et al., 2005; Bonassi and Au, 2002; Mateuca et al., 2006; Norppa et al., 2006; Obe et al., 2002), esto ha resultado en la acumulación de diferentes estudios de cohorte que ayudaron a la validación de esta técnica como predictora de riesgo de cáncer.

Uno de estos estudios de cohorte fue iniciado en el 2001 en los países Europeos, donde se incluyeron casi 22.000 personas, en el cual se obtuvo una asociación entre la alta frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (ACs) y el riesgo de sufrir cáncer (Norppa et al., 2006; Rössner et al., 2005), esta misma relación se encontró en otro estudio de cohorte, realizado en los países Nórdicos, donde la tasa de incidencia fue de 1.21 y 1.87 para los grupos medios y altos de ACs, respectivamente, en comparación con los grupos con baja frecuencia de ACs. Por otro lado el estudio de cohorte realizado en Italia, determino una tasa de mortalidad de 1.93 para pacientes con alta frecuencia de ACs (Bonassi and Au, 2002; Mateuca et al., 2006; Norppa et al., 2006; Rössner et al., 2005).

Al mismo tiempo de los estudios de cohorte en Italia y los países Nórdicos, otras investigaciones se estaban llevando a cabo, para la predicción de cáncer por medio del biomarcador citogenético de ACs. En Taiwán el estudio efectuado tomó un pequeño grupo de 22 pacientes con cáncer y 22 pacientes control, todos residentes de una área endémica de Taiwán, con un diseño experimental de caso-control, los resultados obtenidos indicaron que las ACs de tipo cromosómico, fueron predictoras de riesgo de cáncer (Bonassi and Au, 2002; Liou et al., 1999).

El estudio citogenético *in-vivo*, es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo de gran sensibilidad, útil para asociar la alta frecuencia Alteraciones Cromosómicas (ACs) Estructurales o Numéricas, con el posible desarrollo de enfermedades tales como el cáncer, un ejemplo de estos estudios fue desarrollado por Arencibia *et al.* (2009), en el cual se evaluó Frecuencia de ACs espontáneas e inducidas en células de médula ósea de ratones NMRI y Balb-C, de ambos sexos. En este estudio se concluyó que las líneas de ratones NMRI y Balb-C, constituyen un buen modelo a emplear en los estudios genotoxicológicos, dada la baja frecuencia espontánea de ACs de tipo estructural, además se confirmó el daño genotóxico inducido por la Ciclofosfamida (CP) administrada en dosis de 50 mg/kg por vía

intraperitoneal (i.p.) a las 48 y 24 horas antes del sacrificio, la cual provocó un aumento en la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (ACs) (Arencibia, 2009).

Cuadro 4. Antecedentes del biomarcador de Alteraciones Cromosómicas.

Nombre del estudio	Autores	Resultados
Cambios cromosómicos: métodos de inducción y detección y la aplicabilidad en biomonitorio humano.	Mateuca, R. <i>et al.</i> (2006).	Revisión de los mecanismos de inducción, metodología, sensibilidad y especificidad de las Alteraciones Cromosómicas
Alteraciones Cromosómicas e Intercambio de Cromátidas Hermanas como biomarcadores de riesgo de cáncer.	Norppa, H. <i>et al.</i> (2006).	Alto nivel ACs se asocia con un mayor riesgo de cáncer, La frecuencia de SCE no parece tener un valor predictivo del cáncer.
Alteraciones cromosómicas en linfocitos de sujetos sanos y riesgo de cáncer.	Rössner, P. <i>et al.</i> (2005).	La frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica es un predictor de cáncer; Este estudio contribuye a la validación de la ACs como un marcador predictivo de riesgo de cáncer, en particular, de cáncer de estómago
Biomarcadores en estudios de epidemiología molecular para la predicción de riesgos de salud.	Bonassi, S., and Au, W. W. (2002).	Revisión de los diferentes tipos de biomarcadores
Alteraciones cromosómicas: formación, identificación y distribución.	Obe, G <i>et al.</i> (2002).	Las Alteraciones Cromosómicas son cambios en el ADN generados por diferentes mecanismos de reparación de rupturas en el ADN de doble cadena (DSB)

Así mismo, se han desarrollado importantes estudios *in-vivo*, en los cuales se han evaluado la genotoxicidad asociado al daño al ADN, uno de estos fue desarrollado por Giri *et al.*, en células de médula ósea de ratón, en el cual evaluaron la generación de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs) y Alteraciones Cromosómicas (ACs) inducidas por Paracetamol (PC = acetaminofén), donde se halló un efecto de dosis-respuesta significativo en el aumento de la frecuencia de ICHs y ACs. El aumento significativo de la frecuencia de ICHs, así como de ACs inducida por el PC se atribuyó al hecho de que el PC induce genotoxicidad a través de daños en el ADN. Finalmente se concluyó que el PC fue genotóxico *in-vivo* en células de la médula ósea de ratón (Giri *et al.*, 1992).

En uno de los estudios *in-vivo* realizados en células de médula ósea de ratón, se evaluó el efecto genotóxico de dos pesticidas (fenarimol y propamocarb) usados para proteger el maíz de hongos, para esto se usaron los biomarcadores de efecto, Micronúcleos (Mn) y Alteraciones Cromosómicas (ACs). El resultado del estudio demostró que ninguno de los dos pesticidas presentaban efecto genotóxico *in-vivo* en las células de médula ósea de ratón, sin embargo, se encontró un efecto citotóxico con ambos pesticidas (Aydemir and Bilaloglu, 2004).

Después de una búsqueda en las bases de datos ScienceDirect, ISI Web of Knowledge, PubMed, entre otras, hasta el momento no hay reportes de estudios realizados con venenos de escorpión y el biomarcador de Alteraciones Cromosómicas (ACs), por lo tanto este estudio sería el primer reporte para la literatura.

3. HIPOTESIS

Si el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* tiene un efecto tóxico en los ratones inoculados, se espera observar signos locales y sistémicos de intoxicación (Hi), de lo contrario se espera que no se observe signo de intoxicación alguno (Ho).

Si el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* ejerce efecto genotóxico *in-vivo*, en las células de médula ósea de ratón, se espera un incremento en la frecuencia basal de Alteraciones Cromosómicas (ACs) (Hi), de lo contrario se espera que la frecuencia sea igual o menor a la frecuencia basal (Ho).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in-vivo* el efecto tóxico y genotóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*, en células de médula ósea de ratones *Albino suizo*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) del veneno del escorpión *C. margaritatus* en ratones *Albino suizo* tratados vía intraperitoneal (i.p.).

Determinar el efecto Tóxico del veneno del escorpión *C. margaritatus* valorando signos locales y sistémicos de envenenamiento en ratones *Albino suizo*.

Evaluar la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (ACs) inducidas por el veneno de *C. margaritatus* en células de médula ósea de ratón *Albino suizo*.

5. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio *in-vivo* y de prueba de hipótesis con experimento real, empleando como modelo experimental ratones *Albino suizo* de una cepa ICR, los cuales fueron tratados con diferentes dosis (9.32, 18.65 y 37.31 $\mu\text{g/g}$) de veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*; y se llevaron a cabo los respectivos controles, Negativo (Solución salina NaCl 0.9%) y Positivo (Ciclofosfamida 50 $\mu\text{g/g}$) (Cuadro 5).

5.2 MANTENIMIENTO DE ANIMALES

5.2.1 Ratones

Para la realización de este estudio se emplearon ratones *Albino suizo* machos de una cepa ICR provenientes de los laboratorios de VECOL (Veterinaria de Colombia), con 10 semanas de nacidos y con un peso aproximado de 35 g. Los ratones fueron mantenidos en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), en condiciones específicas: ciclos de 12h luz/12h oscuridad, temperatura ambiente (18 a 20 °C), fueron instalados en cajas de acero inoxidable, las cuales fueron rotuladas y enumeradas, se les administró agua y alimento cada 24 horas, con el fin de controlar su peso.

5.2.2 Escorpiones

Los escorpiones fueron colectados en el Valle del Patía, por el grupo de Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT), y fueron mantenidos en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), se dividieron los machos de las hembras, y se conservaron en contenedores de plástico, se alimentaron con una cucaracha por dos escorpiones cada ocho días, el agua fue administrada constantemente. Al interior de los contenedores fueron ubicados pedazos de cartón con el fin de aumentar el área de dispersión, la limpieza de los contenedores se realizó cada tres días.

Cuadro 5. Variables dependientes e independientes del estudio

VARIABLES		TIPO DE VARIABLE	NATURAL EZA	NIVEL DE MEDICIÓN	ANÁLISIS ESTADÍSTICO
Concentración del veneno	Dosis baja	Independiente	Cuantitativo	Razón	Prueba no paramétrica: Mediana con el método de Hodges y Lehmann
	Dosis media				
	Dosis alta				
Alteraciones Cromosómicas	Alteraciones Cromosómicas	Dependiente	Cuantitativo	Razón	Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk). Pruebas no paramétricas: Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.
	Alteraciones Cromatídicas				
Signos locales y sistémicos de envenenamiento	Sialorrea	Dependiente	Cualitativa (ordinal)		Análisis de frecuencias relativas.
	Piloerección				
	Sudoración generalizada				
	Somnolencia				
	Priapismo				
	Taquipnea				
	Disnea				
	Cianosis				
	Perdida de equilibrio				
	Tremor				
	Convulsiones				
	Muerte				
	Aumento en la excreción.				

5.3 EXTRACCIÓN DEL VENENO

El veneno que se empleó para el establecimiento de la DL_{50} y para los diferentes tratamientos que fueron aplicados, fue obtenido de un grupo (hembras y machos) de escorpiones de la especie *Centruroides margaritatus*, mantenidos en cautiverio en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), los cuales hacen parte de la colección del Grupo de

Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) de la Universidad del Cauca.

La extracción del veneno se realizó cada 15 días, durante tres meses, utilizando un generador de impulsos eléctricos JRM 2000. Se tomó cada escorpión y se inmovilizó, dejando libre únicamente la zona metasomal, con una pinza larga se tomó el tercer segmento para introducir el telson en el tubo eppendorf, y con las pinzas del generador previamente humedecidas, esto para permitir que el impulso llegue adecuadamente a los músculos de la glándula venenosa, se aplicaron 50 voltios en la zona intermedia entre el cuarto y quinto segmento. A cada escorpión se le aplicaron un máximo de cinco impulsos, para obtener una adecuada extracción y garantizar el bienestar de los escorpiones, así como causarles el menor estrés posible (Figura 10).

Figura 10. Extracción del veneno de escorpión por estimulación eléctrica.



5.4 CUANTIFICACIÓN DEL VENENO

Para calcular la concentración de proteínas totales en el pool de veneno, se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, esto con el fin de retirar impurezas, posteriormente se recuperó el sobrenadante, el cual se homogenizó en vórtex y se procedió a calcular la concentración de proteínas en el espectrofotómetro, para llevar a cabo esto se tomaron $10\text{ }\mu\text{l}$ del mismo, se

diluyeron en 1990 μ l de Solución Salina al 0.9%, para llegar a un total de 2000 μ l, los cuales fueron colocados en una celdilla de cuarzo, y se midió la absorbancia a 280 nm, para obtener la concentración real del veneno se utilizó la Ley de Beer-Lambert (1).

$$C_{fv} = (A_{280}) * (Fd) * (Vt) \quad (1)$$

C_{fv}: Concentración final del pool de veneno en mg/ml

A₂₈₀: Absorbancia a 280 nanómetros (nm)

Fd : Factor de dilución

Vt : Volumen total de veneno

La cantidad de veneno obtenido fue almacenado a -80°C, hasta el momento de su utilización.

5.5 RUTA DE ADMINISTRACIÓN

Para la administración del veneno del escorpión, y de las soluciones control (NaCl y Ciclofosfamida), se usaron jeringas de 1 mL por cada ratón. Los tratamientos se aplicaron vía intraperitoneal (i.p.), con el fin de simular la picadura del escorpión y de esta forma observar las reacciones fisiológicas y los síntomas de envenenamiento producidos por el veneno. El volumen inoculado se calculó a partir del peso de cada ratón.

5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.6.1 TOXICIDAD: Determinación de la DL₅₀.

Después de encontrar la concentración de proteínas totales en el veneno, se realizó la determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀), partiendo de una dosis letal preestablecida de 42.83 μ g/g. (Guerrero, 2002), siguiendo el método de Beccari modificado por Molinengo (Sevcik, 1987).

Para el establecimiento de la DL₅₀ en este estudio, se utilizaron 13 ratones machos de 10 semanas de edad con un peso aproximado de 30 g, el pool de veneno fue disuelto en solución salina 0.9% para que pudiera ser inyectado por vía i.p.. Se tomó cada ratón y se determinó de acuerdo a su peso la cantidad de veneno que debía ser inoculado, tomando en cuenta la concentración de veneno que se deseaba existiera al interior de cada ratón.

Ejemplo 1: Para comenzar se toma la dosis previamente reportada de 42.83 $\mu\text{g/g}$. (Guerrero, 2002) y se multiplica por el peso del ratón (30 g), lo que nos da como resultado la cantidad de μg de veneno (1284.9 μg), este resultado después se divide por la concentración de la solución de trabajo (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), el resultado de esta operación será la cantidad de veneno que se debe inyectar (256.98 μl) al ratón para alcanzar una concentración interna de 42.83 $\mu\text{g/g}$. (Guerrero, 2002). Después los μl que son inyectados se dividen por el peso del ratón (30 g), lo cual nos dará un factor (8.56), a este factor se le saca el logaritmo (Log), y nos da otro factor (0.93), posteriormente de acuerdo a si el ratón vive o muere se resta o se suma 0.04 al segundo factor que obtuvimos, en nuestro ejemplo el ratón vive así que se aumenta 0.04 a 0.93, lo cual nos da 0.97, a este nuevo número se le saca el logaritmo inverso (LogInv) 0.97(9.33), este número se multiplica por el peso del segundo ratón (31 g), lo cual nos da como resultado la cantidad de μl que se inyecta (289.23 μl), esta cantidad se multiplica por la concentración de la solución de trabajo (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y obtenemos la cantidad de μg de veneno que se inyectaron (1446.15 μg) en el ratón, esta cantidad se divide por el peso del ratón (31 g) y obtenemos la nueva concentración de veneno dentro del ratón (46.65 $\mu\text{g/g}$), es decir la dosis que se aplicó. De esta forma y teniendo en cuenta si los ratones viven o mueren se realizan las mismas operaciones, hasta obtener la DL_{50} . Los datos obtenidos fueron evaluados usando el programa Toxicon desarrollado por Carlos Sevcik especialmente para la determinación de la DL_{50} (Ejemplo 1).

Los síntomas por envenenamiento sistémico (taquipnea, bradipnea, sialorrea, piloerección, etc.) (Barona et al., 2004; Gómez et al., 2002; Otero et al., 2004), producidos por el veneno de este escorpión, fueron observados y registrados durante 30 minutos, tiempo en el cual el ratón podía o no morir.

5.6.2 GENOTOXICIDAD: Grupos experimentales

La administración de las dosis de veneno y de los controles se realizó en una única dosis (exposición aguda), para simular una exposición aguda por la picadura del escorpión a un tiempo cero (0h).

Para el desarrollo de la prueba citogenética fueron establecidos tres grupos experimentales: para la Dosis Baja se tomó el 25% de la DMT (9.32 $\mu\text{g/g}$), la Dosis Media equivale al 50% de la DMT (18.65 $\mu\text{g/g}$), y la Dosis Alta equivale al 80% de la DL_{50} y es igual a la Dosis Maxima Tolerada (DMT) (37.31 $\mu\text{g/g}$). Como Control Positivo se usó Ciclofosfamida (CP) (50 $\mu\text{g/g}$), y como Control Negativo se

El diseño experimental fue de bloques completos aleatorios, se emplearon 6 jaulas, cada una de las cuales mantuvo cinco ratones (uno por cada tratamiento), los cuales fueron tomados al azar al momento de ser tratados. Al final se consiguieron seis repeticiones por cada tratamiento aplicado. Los bloques fueron tratados en diferentes días (Figura 11 y Cuadro 6).

Figura 11. Distribución de los ratones en los grupos experimentales



Cuadro 6. Diseño experimental del estudio para genotoxicidad

Grupos de estudio	Tratamiento	Dosis Única	N° de ratones	N° de placas/ratón	N° total de placas	Metafases ACs/ratón	Total de metafases
Control negativo	Sln salina (NaCl 0.9%)	0.01 mL x gramo de ratón	6	3	18	100	600
Grupos experimentales	Dosis baja 25% DMT	9.32 µg/g	6	3	18	100	600
	Dosis media 50% DMT	18.65 µg/g	6	3	18	100	600
	Dosis alta 80% DL50 (DMT)	37.31 µg/g	6	3	18	100	600
Control positivo	Ciclofosfamida	50 µg/g	6	3	18	100	600
Total			30		90		3000

5.7 PROCEDIMIENTO: PRUEBA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS *in-vivo*.

5.7.1 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA

Una hora antes de aplicar el tratamiento, se les implantó a los ratones una pastilla de 50mg de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), cubiertas parcialmente con parafina, esto con el fin de asegurar que las metafases analizadas se encontraran en primer ciclo de división celular (M1). Los ratones experimentales fueron tratados a un tiempo 0 con una dosis única (exposición aguda). Después de 22 horas de la inoculación del veneno, se les aplicó a los ratones Colcemid [1mg/mL] (agente inhibidor del huso acromático), con el fin de detener la mayor cantidad de células en metafase. Dos horas después (24 horas) se procedió a la eutanasia de los ratones, los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical, previo sometimiento a éter etílico. Los dos fémures de cada ratón fueron retirados, se limpiaron retirando el exceso de tejido, y se hizo un corte fino al extremo distal de estos, para obtener las células de médula ósea. En un tubo de centrifuga de 15 ml, se adicionaron 6 ml de Buffer Fosfato Salino (PBS a 37°C). Con una jeringa de insulina se inyectó el PBS a través del pequeño corte hecho anteriormente, esto con el fin de extraer las células que se encuentran en la médula, este proceso se realizó hasta que la suspensión tomó un color lechoso y hasta que el hueso se observaba casi blanco.

Para la fijación y obtención de las células se resuspendió la suspensión celular, se centrifugó la solución a 1000 rpm por 10 minutos, se descarto el sobrenadante, se resuspendieron las células y se agregó 10 ml de solución hipotónica a 37°C [0.075 M de KCl], se resuspendió nuevamente la solución y se procedió a colocarlas en baño María a 37°C por 30 minutos. Después de sacar la suspensión del baño María se les agregó 2 ml de fijador Carnoy (3:1, Metanol: Ácido acético glacial). Se centrifugó la suspensión nuevamente a 1000 rpm por 5 minutos, y se retiró el sobrenadante, después se adicionó 6 ml de fijador Carnoy y se refrigeró por 30 minutos. La fijación y centrifugación se repitió dos veces más, con el fin de limpiar el precipitado lo mejor posible. Las células fueron dejadas por una noche en refrigeración para obtener una mejor fijación de las metafases durante el goteo.

5.7.2 GOTEO, TINCIÓN Y MONTAJE DE LAS PLACAS

Para el goteo, el pellet fijado fue centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos y se retiró el exceso de fijador, y se goteo la solución sobre las placas, se dejó caer de 4 a 5

gotas de la suspensión celular, teniendo en cuenta distribuir las a lo largo de toda la placa. Se realizaron 3 placas por ratón. Las placas fueron secadas en una plancha caliente a 40°C. Después fueron colocadas en cajas durante tres días para asegurar su buen secado y posteriormente se colorearon mediante tinción directa con colorante Giemsa.

Para la coloración directa, se sumergieron las placas en una solución fresca de colorante Giemsa al 10% durante 6 minutos. Luego las placas fueron lavadas con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Posteriormente se colocaron en cajas para su respectivo secado. Por último, cuando las placas estuvieron bien secas se procedió a fijarlas permanentemente con entellan. Después se esperó un mínimo de 24 horas antes de comenzar a observarlas al microscopio.

5.8 ANÁLISIS AL MICROSCOPIO

Para evitar sesgos en los datos las placas fueron codificadas por una persona diferente a las implicadas en el proyecto. Para la prueba de ACs se analizaron 100 metafases por ratón, en microscopio de luz a 10x para identificar el campo, y se realizó una lectura en zigzag con un aumento de 100x, solo se tuvieron en cuenta las metafases que presentasen 40 cromosomas para ser analizadas.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico, los datos fueron sometidos a pruebas de estadística descriptiva como media, error estándar, desviación estándar, siendo el tamaño de muestra $n=6$ ratones.

Para determinar si los datos se ajustan a la distribución normal, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. Para comparar si había diferencia significativa entre los experimentos respecto de las Alteraciones de tipo Cromatídico y Cromosómico, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para hacer una comparación por parejas de tratamientos se usó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Para todo lo anterior se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 14.0 (Statistical Package for the Social Sciences), con un nivel de significancia máximo de $p=0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS DEL VENENO

La concentración total del pool de veneno, extraído del escorpión *Centruroides margaritatus*, se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro de masas, posteriormente se aplicó la fórmula de concentraciones finales de Beer-Lambert ($C_{fv} = (A_{280}) * (Fd) * (Vt)$). La concentración final de veneno fue de 93.8 µg/ µl de proteína. A partir de esta se obtuvieron dos soluciones de trabajo, con concentraciones de 5 µg/ µl y 2 µg/ µl, esto con el fin de facilitar la medición de los volúmenes administrados a los ratones.

6.2 EFECTO TÓXICO

6.2.1 Dosis Letal 50 (DL₅₀)

Para calcular la Dosis Letal 50 (DL₅₀) del veneno del escorpión *C. margaritatus*, se utilizó el método de Beccari modificado por Molinengo (Sevcik, 1987), partiendo de una DL₅₀ previamente reportada de 42.83 µg/g. (Guerrero, 2002).

Este protocolo se realizó para cada uno de los 13 ratones empleados para este fin (Tabla 1). Es importante recordar que para los ratones que murieron durante el procedimiento, la constante 0.04 es restada del logaritmo obtenido de la división de λ por el peso de cada ratón.

La Dosis Letal 50 establecida para el veneno de *Centruroides margaritatus*, usando los datos de concentración de veneno de la tabla y el programa estadístico Toxicon de Carlos Sevcik (1998), aplicando la Mediana de Hodges y Lehmann, fue de **46.64 µg/g**, con un intervalo de confianza del 95%, de 46.32 µg/g a 46.92 µg/g.

Tabla 1. Valores obtenidos durante la determinación de la DL₅₀ del veneno del escorpión *C. margaritatus* según el método de Molinengo reportado por Sevcik (Sevcik, 1987). (Concentración inicial: 42.83 µg/g. (Guerrero, 2002))

No Ratón	λ (µL veneno) volumen a inyectar	Peso ratón (g)	µg veneno/g ratón [] dentro del ratón	Vive (-) +0,04 Muere (+) -0,04
1	255	29.66	42.83	-
2	283.8	30.42	46.64	-
3	318.9	31.18	51.15	+
4	288.3	30.90	46.65	+
5	273.2	31.81	42.94	-
6	297.8	31.92	46.64	+
7	260.7	30.35	42.94	-
8	312.3	33.48	46.63	+
9	276.4	32.18	42.94	-
10	290.7	31.16	46.64	-
11	312.4	30.54	51.14	+
12	284	30.45	46.63	-
13	330.4	32.30	51.14	+

6.2.2 Signos locales y sistémicos de envenenamiento

En el Cuadro 7 se reportan los signos de envenenamiento locales y sistémicos, observados durante el procedimiento de la DL₅₀, en la media hora posterior a la administración del veneno. En la primera columna se muestran los principales signos de envenenamiento escorpiónico reportados en la literatura, en las filas se

muestran los datos de cada uno de los ratones (1-13), y los síntomas presentados, los cuales se evaluaron por presencia (+) o ausencia (-), en la columna final se muestra el porcentaje total de aparición de cada síntoma en los ratones evaluados. Los síntomas de envenenamiento más observados fueron sialorrea, taquipnea y disnea, con una aparición del 100%, seguidos por pérdida de equilibrio (92.3%), tremor (61.5%) y piloerección (53.8%), algunos de los síntomas no se presentaron o no fue posible reconocerlos a simple vista, entre ellos la cianosis y la sudoración generalizada, como se esperaba la muerte se presentó en casi la mitad de los ratones (46.2%). Finalmente hay que anotar que los síntomas fueron evaluados por observación directa y no se usaron métodos específicos para medir cada uno de ellos (Figura 12 y Figura 13).

Cuadro 7. Signos locales y sistémicos de envenenamiento por *C. margaritatus* evaluados por presencia (+)/ausencia (-) en ratones *Albino suizo* durante el procedimiento de DL₅₀.

SIGNOS Presencia (+) / Ausencia (-)	Ratones													% de aparición de síntomas
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Sialorrea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100,0
Piloerección	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	53,8
Sudoración generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Somnolencia	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	38,5
Priapismo	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	46,2
Taquipnea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100,0
Disnea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100,0
Cianosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Pérdida de equilibrio	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	92,3
Tremor	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	61,5
Convulsiones	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	23,1
Muerte	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	46,2
Aumento en excreción.	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	46,2

Figura 12. Porcentaje de aparición de los signos locales y sistémicos de envenenamiento por la toxina del escorpión *C. margaritatus* en ratones *Albino suizo* durante el procedimiento de DL₅₀.

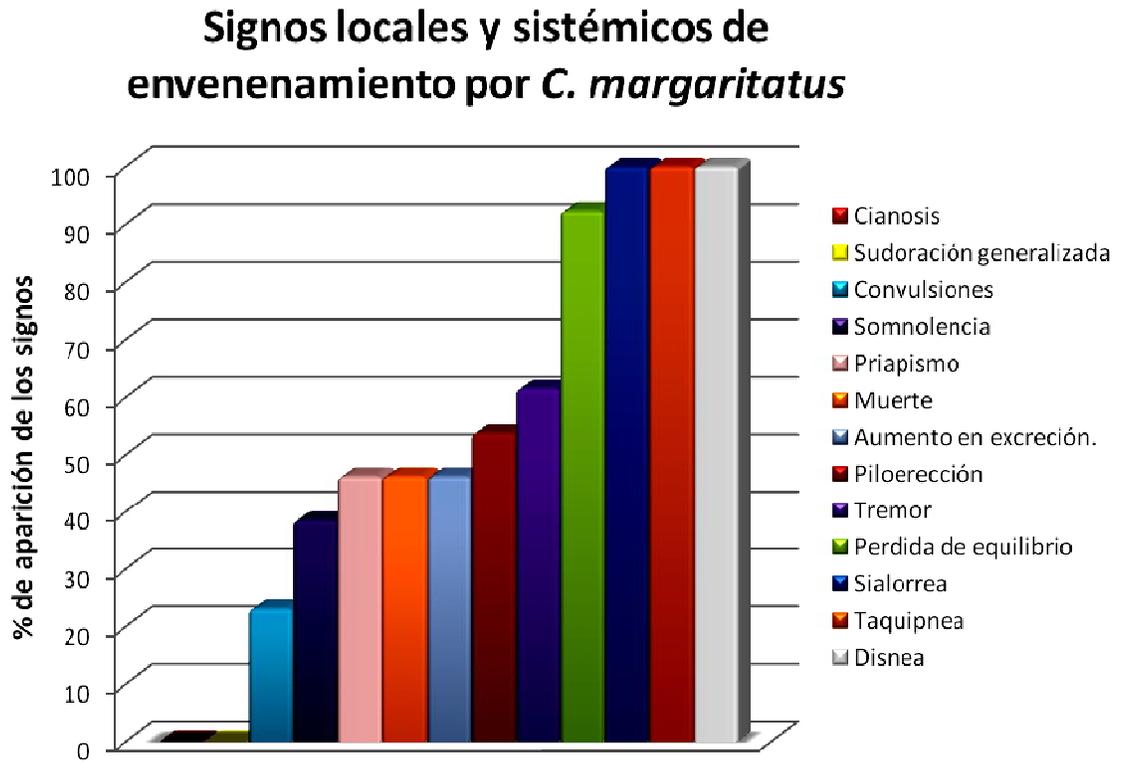
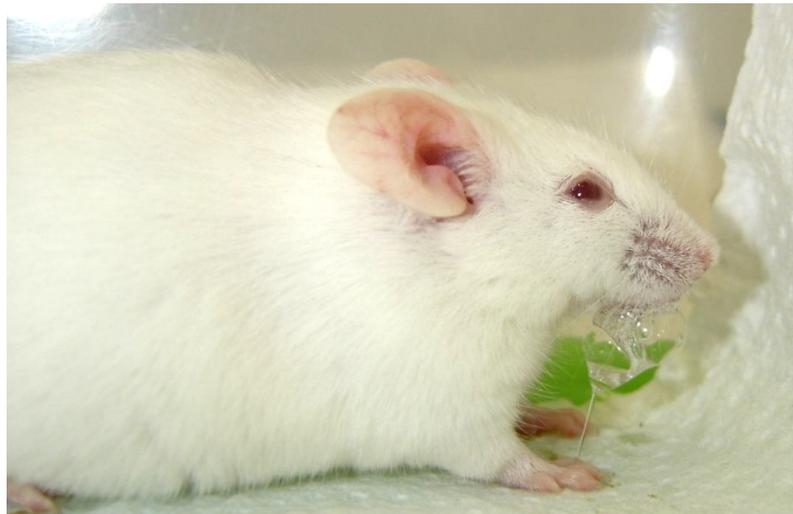


Figura 13. Ratón con los síntomas positivos de envenenamiento (Sialorrea, Somnolencia), después de ser inoculado con veneno del escorpión *C. margaritatus*



6.2.3 Dosis Administradas en los tratamientos

Las dosis de veneno administradas para evaluar genotoxicidad, se calcularon partiendo de la DL₅₀ establecida (46.64 µg/g), correspondiendo a la Dosis Alta el 80% de la DL₅₀ (Dosis Máxima Tolerada: DMT) (37.31 µg/g), y la Dosis Media y Dosis Baja al 50% (18.65 µg/g) y 25% (9.32 µg/g) de la DMT, respectivamente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Dosis de veneno y controles administradas en una única dosis, calculadas a partir de la DL₅₀ establecida (46.64 µg/g).

Grupos de estudio	Tratamiento	Única Dosis
Control negativo	Sln salina 0.9%	0.01 mL x g de ratón
Grupos experimentales	Dosis baja 25% DMT	9.32 µg/g
	Dosis media 50% DMT	18.65 µg/g
	Dosis alta 80% DL ₅₀ (DMT)	37.31 µg/g
Control positivo	Ciclofosfamida	50 µg/g

6.3 EFECTO GENOTÓXICO: FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Como los datos obtenidos mediante la prueba de Alteraciones Cromosómicas no se ajustan a una distribución normal (Shapiro-Wilk: $p < 0.05$), el análisis de prueba de hipótesis se realizó mediante la aplicación de las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para comparar tres o más categorías, y U de Mann-Whitney para comparar dos categorías.

Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis no se identificó diferencia significativa ($p > 0.05$), entre los experimentos realizados en días diferentes, es decir que las repeticiones del experimento concuerdan en sus resultados.

Al comparar el número promedio de Alteraciones cromatídicas y del total de Alteraciones, entre los 5 tratamientos, se identificó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). No obstante, al aplicar la prueba U de Mann-Whitney para comparar las concentraciones del veneno respecto del control negativo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, se

observa que la dosis baja presenta un incremento no significativo en la frecuencia de ACs de tipo Cromatídico (Figura 14 y 16). También se observa que, a medida que se incrementa la concentración del veneno el número promedio de Alteraciones Cromosómicas disminuye. Por ejemplo: para la dosis más alta de veneno, el número total de ACs se reduce hasta un 29% respecto del control negativo. Esta diferencia del 71% en el número de ACs totales, no fue detectada como significativa por la prueba U de Mann-Whitney, posiblemente por el pequeño tamaño de muestra ($n = 6$), o por la heterogeneidad de las desviaciones típicas. En la Figura 15 se observa una metafase normal de ratón, después de ser tratado con solución salina (Control Negativo).

En la Tabla 2 se muestran los promedios del número de Alteraciones Cromosómicas y sus respectivas desviaciones estándar, para cada uno de los tratamientos, haciendo énfasis en cada uno de los tipos de Alteraciones Cromosómicas (ACs de tipo Cromosómico, y ACs de tipo Cromatídico, y el Total de ACs), así como la significancia ($p < 0.05$) determinada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

La diferencia significativa detectada al comparar los cinco tratamientos, para las Alteraciones cromatídicas y el total de Alteraciones, solo se debe a que el control negativo y las concentraciones del veneno (9.32, 18.65 y 37.31 $\mu\text{g/g}$) difieren del control positivo, el cual fue el único que evidenció efecto genotóxico (Figura 14).

La Figura 16 muestra la metafase de un ratón tratado con la dosis baja de veneno (9.32 $\mu\text{g/g}$), se observan varias ACs de tipo Cromatídico, en la Figura 17, se muestra la metafase de un ratón tratado con el control positivo (ciclofosfamida, 50 $\mu\text{g/g}$), en esta se observan múltiples Alteraciones Cromosómicas.

Tabla 2. Promedio de Alteraciones Cromosómicas (ACs) registradas en células de médula ósea de ratón al evaluar *in-vivo* el potencial genotóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*.

Promedio de ACs/100 metafases por ratón (X±DE)			
Tratamientos	ACs CrSomicas	ACs CrTidicas	Total ACs
Control negativo (Solución salina)	1.16 ± 1.17	2.83 ± 2.48	4.0 ± 3.46
Dosis Baja (9.32 µg/g)	1.66 ± 1.75	3.5 ± 3.20	5.16 ± 3.86
Dosis Media (18.65 µg/g)	0.66 ± 1.21	2.16 ± 1.16	2.83 ± 1.60
Dosis Alta (37.31 µg/g)	0.66 ± 1.21	0.5 ± 0.83	1.16 ± 1.16
Control positivo (Ciclofosfamida)	1.16 ± 1.16	9.5 ± 2.42**	10.66 ± 3.14**
Sig. (p < 0.05)	0.5	0.002*	0.003*

* Diferencia significativa (p < 0.05), entre tratamientos y los tipos de Alteraciones Cromosómicas (Kruskal-Wallis).
 Los tratamientos con veneno de escorpión no difieren significativamente respecto al control negativo (p > 0.05) (U de Mann-Whitney)
 ** Tratamiento con Ciclofosfamida (control positivo) si difiere significativamente del resto de tratamientos (U de Mann-Whitney).

Figura 14. Total de Alteraciones Cromosómicas (ACs) ($\bar{X} \pm DE$) Vs. Tratamientos con veneno de escorpión (9.32, 18.65 y 37.31 $\mu\text{g/g}$) y controles (NaCl 0.9% y Ciclofosfamida 50 $\mu\text{g/g}$).

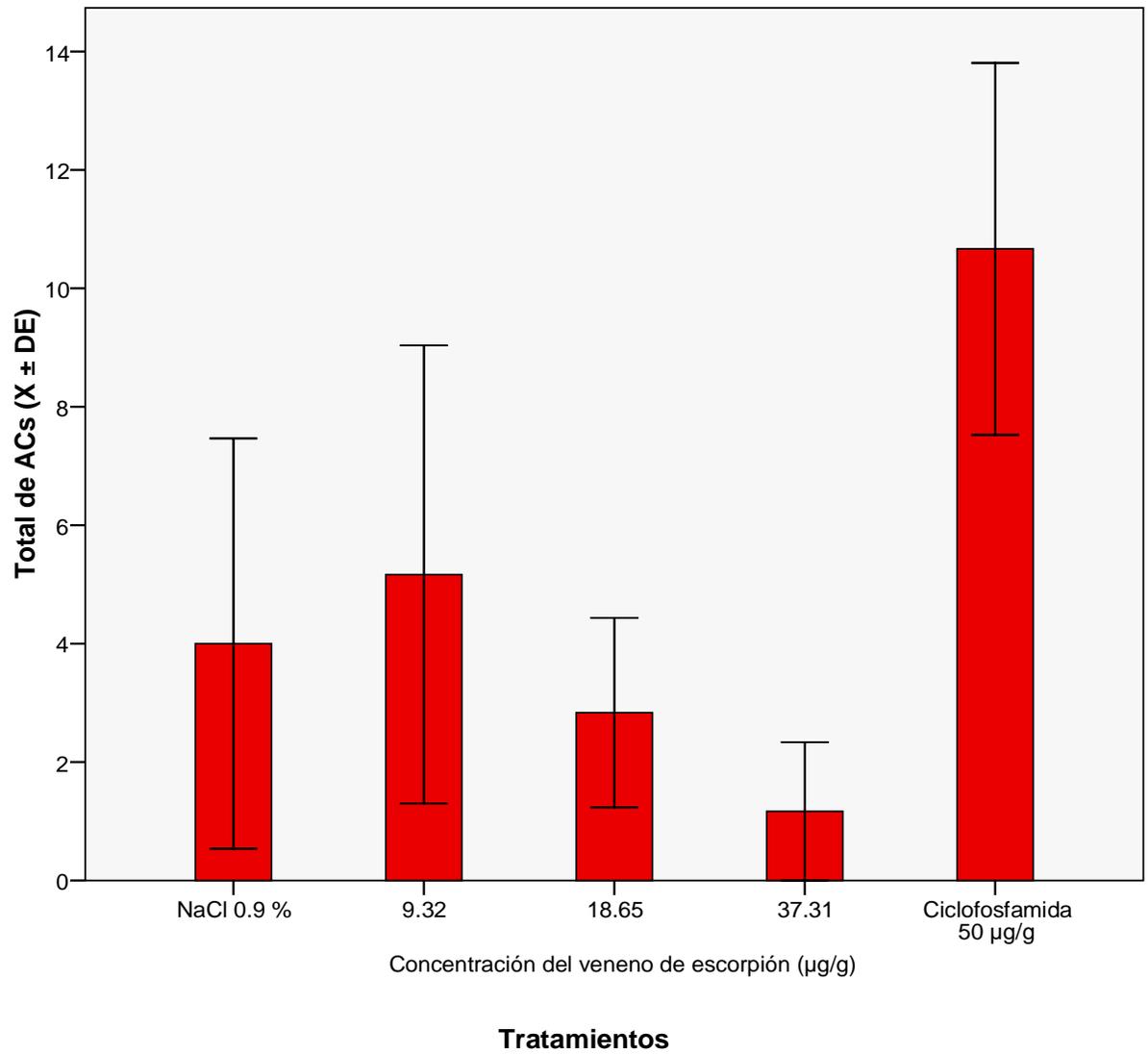


Figura 15. Metafase normal de ratón (Sin daño genotóxico) tratado con solución salina NaCl 0.9% (Control Negativo).

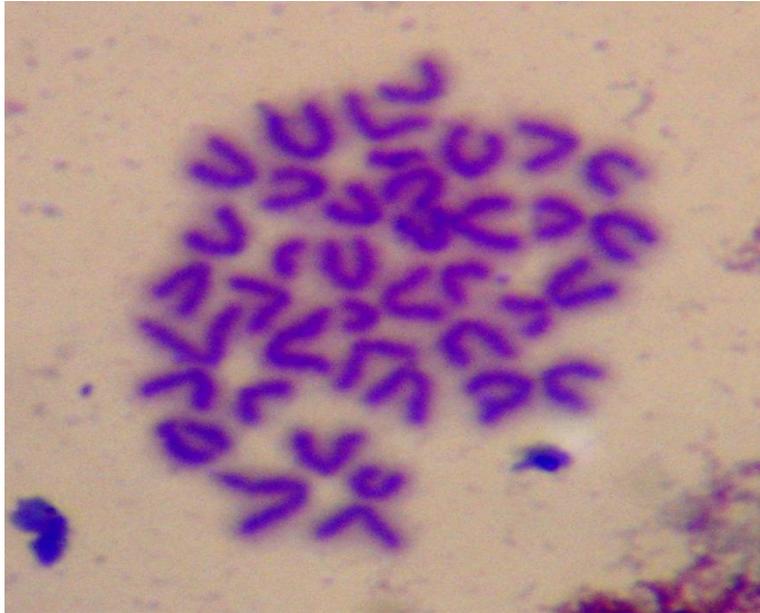


Figura 16. Metafase de ratón tratado con la dosis baja de veneno (9.32 µg/g), con ACs de tipo Cromatídicas.

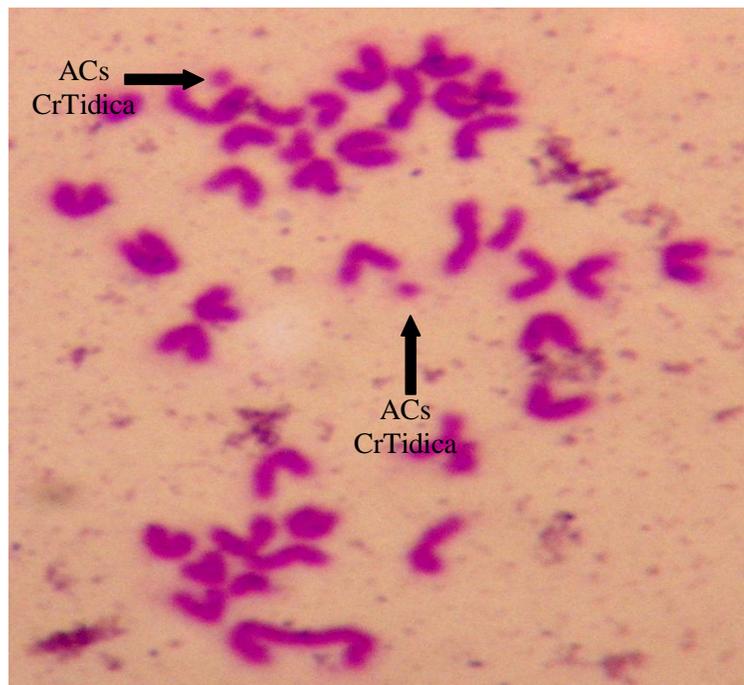
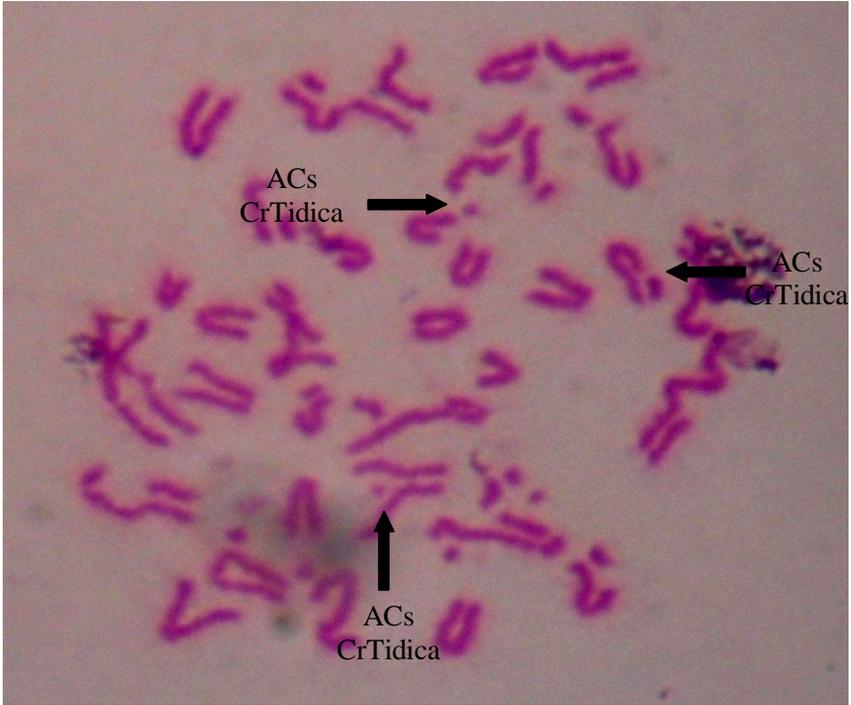


Figura 17. Metafase de ratón tratado con el control positivo (ciclofosfamida, 50 µg/g), se observan múltiples Alteraciones Cromosómicas.



7. DISCUSIONES

Durante la realización de este estudio se obtuvo una DL_{50} de 46.63 $\mu\text{g/g}$, para el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*, en contraste con la reportada por Guerrero (2002), la cual fue de 42.83 $\mu\text{g/g}$, para la misma especie de escorpión. Esta diferencia en las dosis reportadas puede atribuirse a la cepa de los ratones empleados, o a la susceptibilidad de estos al veneno, como también a la edad de los ratones usados en ambos estudios, ya que en el trabajo de Guerrero (2002) se utilizaron ratones de aproximadamente 6 semanas, mientras que en el presente estudio, los ratones tratados tenían una edad de 10 semanas y ya habían alcanzado la madurez sexual.

La letalidad presentada en este estudio durante el establecimiento de la DL_{50} , se pudo deber a la interacción global de los síntomas de envenenamiento, ya que como menciona Zare *et al.* (2007) y Hernandez *et al.*, los principales síntomas de envenenamiento sistémico son sudoración, sialorrea, taquipnea y disnea, todos estos observados en los ratones de este estudio, sin embargo, la interacción de estos produce fallos sistémicos, pudiendo generar hipotensión, hipertensión, bradicardia o taquicardia, contracción ventricular prematura, edema pulmonar y shock, todo esto debido a que el veneno del escorpión estimula los canales iónicos de las células que conforman las dos ramas del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático), además estos efectos son dependientes de ciertos factores como; el género y especie del escorpión, y la susceptibilidad del ratón (Hernandez Betancourt *et al.*, 2009; Zare Mirakabadi *et al.*, 2007).

La mayoría de estos síntomas de envenenamiento, se deben a una liberación masiva de catecolaminas, las cuales juegan un papel importante en la patogénesis de la picadura de escorpión, estas son liberadas por las glándulas suprarrenales y las terminaciones nerviosas postganglionares, y pueden actuar ya sea en los receptores β -adrenérgicos, elevando la resistencia periférica, o en los receptores α -adrenérgicos, aumentando la contractilidad cardíaca, causando la liberación de renina de los riñones; la cual es una proteína (enzima) liberada al torrente sanguíneo por células renales en respuesta a los niveles decrecientes de sal (Sodio), o al bajo volumen de sangre; lo que finalmente conlleva a la muerte debido a una disfunción miocárdica (Adiguzel, 2010; Lourenço *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2004; Petricevich, 2010). Uno de los primeros procesos patológicos del

envenenamiento escorpiónico es la disfunción de los capilares pulmonares, generando edema pulmonar y otros síntomas asociados, como disfunción renal y hepática. La muerte después del envenenamiento escorpiónico puede ser el resultado de una falla cardiovascular complicada por el edema pulmonar, así como de un paro respiratorio (Petricevich, 2010; Zare Mirakabbadi et al., 2007)

Los síntomas de envenenamiento, ocasionados por el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*, en los ratones tratados, se comenzaron a observar pasados tan solo 5 minutos después de la inyección del veneno, los signos locales se presentaron como un enrojecimiento en la zona periférica donde se aplicó la inyección, y los signos de envenenamiento sistémico más comunes fueron sialorrea (100%), taquipnea (100%), disnea (100%) y la pérdida de equilibrio (92.3%) (Cuadro 7 y Figura 12), estos síntomas se deben principalmente a la gran cantidad de componentes presentes en el veneno, entre los cuales se cuentan mucopolisacaridos, hialuronidasa, fosfolipasa, serotonina, estamina, enzimas inhibitoras, y pequeñas proteínas con acción neurotóxica (neurotoxinas), las cuales son las responsables de la gran mayoría de los síntomas (Otero et al., 2004; Petricevich, 2010). Algo importante de anotar es que la mayoría de los síntomas de envenenamiento desaparecían totalmente después de 2 a 3 horas de inoculado el veneno, lo cual confirma que este es de rápida absorción, distribución y eliminación (Adiguzel, 2010; Barona et al., 2006; Petricevich, 2010; Zare Mirakabbadi et al., 2007).

Las neurotoxinas pueden cambiar los potenciales de acción neuronales y causar la liberación de neurotransmisores de las neuronas colinérgicas y adrenérgicas (Gómez et al., 2002; Lourenço et al., 2002), lo que ocasiona un daño masivo al sistema nervioso y el consiguiente daño sistémico, al cambiar el gradiente de voltaje de los canales iónicos celulares, se ven afectados diversos procesos tales como la excitación nerviosa y muscular, la secreción hormonal, la proliferación celular, transducción sensorial, el control del balance de sal y agua intracelular y la regulación de la presión sanguínea (Petricevich, 2010; Zare Mirakabbadi et al., 2007). Estas neurotoxinas también pueden dañar las vesículas sinápticas, ocasionando la suspensión de la liberación de Acetilcolina (ACh) y el bloqueo de la transmisión neuromuscular, lo cual explicaría la pérdida de equilibrio y la parálisis muscular observada en algunos ratones tratados (Adiguzel, 2010; Petricevich, 2010).

Los signos por envenenamiento escorpiónico pueden clasificarse como neurológicos, y no neurológicos, los síntomas no neurológicos, incluyen fallas

cardiovasculares, respiratorias, gastrointestinales, hematológicas, y en las señales metabólicas, entre los signos de intoxicación neurológicos, la mayoría de los síntomas se deben a la liberación ya sea de catecolaminas de las glándulas suprarrenales, o a la liberación de Acetilcolina (ACh) de las neuronas parasimpáticas postganglionares, las cuales estimulan los canales de sodio, llevando a una disfunción del sistema nervioso autónomo, la estimulación de sus dos ramas producen sudoración, salivación, hipotensión, hipertensión, bradicardia o taquicardia, convulsiones, shock, y priapismo, todos estos síntomas observados en los ratones (Petricevich, 2010; Valdez-Cruz et al., 2004; Zare Mirakabbadi et al., 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, los venenos de escorpión contienen péptidos que actúan como toxinas específicas para los canales iónicos celulares (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (Barona et al., 2006; Otero et al., 2004), estos péptidos neurotóxicos pueden conducir a disfunciones fisiopatológicas que provocan reacciones, como la desestabilización de la membrana celular, el bloqueo del sistema nervioso central y periférico, o la alteración del músculo liso o esquelético. Una de las más importantes toxinas son las α -Toxinas las cuales se unen directamente al receptor 3 de los canales voltaje-dependientes de Na^+ , de una manera membrana-dependiente, causando una prolongación en el potencial de acción de los nervios y músculos por la inactivación de los canales de sodio (Akaike et al., 2009; Petricevich, 2010). Otra neurotoxina importante es la que actúa directamente sobre los canales de Ca^{2+} , ya que este ion juega un papel primordial como receptor acoplado a segundos mensajeros para activar muchos procesos celulares que incluyen la excitabilidad celular, liberación de neurotransmisores, metabolismo intracelular y la expresión de genes (Adiguzel, 2010; Petricevich, 2010; Pipelzadeh et al., 2006; Zare Mirakabbadi et al., 2007), además el Ca^{2+} actúa como segundo mensajero durante la cascada apoptótica, induciendo la liberación de Citocromo c (Cyt c) desde el interior de la mitocondria, en un proceso de retroalimentación (feedback) (Earnshaw et al., 1999; Gewies, 2003). Los signos de estas fallas en la función de los canales de Ca^{2+} , fueron observados ampliamente en los ratones, ya que el 92.3% perdió el equilibrio manifestándose como movimientos erráticos hacia los lados, el 61.5% presento temblor y el 53.8% piloerección, la presencia de convulsiones se dio en un 23% de los casos.

Los ratones son un modelo biológico ideal para la realización de estudios *in-vivo*, ya que el metabolismo de los agentes xenobióticos y sus mecanismos de reparación son muy similares al de los humanos, de esta manera podemos inferir

el efecto genotóxico en una persona que ha sufrido un envenenamiento escorpiónico agudo o crónico. La aplicación *in-vivo* del biomarcador de Alteraciones Cromosómicas (ACs), permite inferir de acuerdo al tipo de lesión, el modo de acción que presenta (S-dependiente, S-independiente), tomando en cuenta los procesos de biotransformación del veneno dentro del organismo, y que tan eficientes son los mecanismos de reparación, o la respuesta celular frente al daño adquirido (Mateuca et al., 2006; Obe et al., 2002).

La prueba de Alteraciones Cromosómicas (ACs) es el biomarcador de efecto biológico más usado y mejor validado (Bonassi and Au, 2002; Mateuca et al., 2006; Norppa et al., 2006; Vainio, 1998), y está asociado a problemas de salud humana en estudios prospectivos y epidemiológicos; es una técnica que permite medir el daño ocasionado por agentes xenobióticos, químicos o naturales, sobre el ADN (Natarajan and Boei, 2003; Obe et al., 2002; Palitti, 1998), y se ha demostrado en diferentes estudios que existe una fuerte asociación entre una alta frecuencia de ACs y el riesgo de sufrir enfermedades como el cáncer (Bonassi and Au, 2002; Mateuca et al., 2006; Norppa et al., 2006; Obe et al., 2002; Rössner et al., 2005). Por estas razones la aplicación de esta prueba en este estudio, es de gran relevancia, por ser la más adecuada para la determinación de posibles daños causados al ADN por el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*, o sus derivados metabólicos, en una población humana expuesta a este.

Para la realización de este estudio se usó como Control Positivo la Ciclofosfamida (CP), disuelta en Solución Salina (NaCl 9%), ya que está comprobada su acción como agente altamente alquilante, que causa una gran cantidad de daños a nivel del ADN, incluyendo varios tipos de ACs, razón por la cual esta droga es usada en la terapia contra el cáncer (Quimioterapia). Aunque la Ciclofosfamida no es genotóxica por sí sola, por procesos metabólicos genera una gran cantidad de metabolitos que tienen funciones de oxidasas, los cuales atacan el ADN y otras biomoléculas. Como se observa en la Figura 14, el daño causado por la Ciclofosfamida fue el doble (60% más) del daño observado con el Control Negativo, lo que corrobora la acción altamente genotóxica de esta droga, y valida la sensibilidad del diseño experimental empleado. Además al realizar la comparación por parejas de tratamientos, se encontró diferencia significativa del Control Positivo respecto a todos los demás tratamientos (Control Negativo, Dosis Baja, Media y Alta) (Tabla 2).

Como Control Negativo se usó la Solución Salina (NaCl 9%), puesto que fue el diluyente usado para aplicar la Ciclofosfamida y el veneno de escorpión (Dosis

Baja, Media y Alta), además no hay información que demuestre que esta tenga una acción directa o indirecta sobre el ADN. Al realizar la comparación por parejas de tratamientos con veneno de escorpión respecto al control negativo, no se encontró diferencia significativa en la frecuencia de ACs (Tabla 2). Sin embargo, en la Dosis Baja (9.32 µg/g), se observa un aumento aproximadamente del 23% en las ACs de tipo Cromatídico, lo que probablemente se debe a que el veneno está actuando sobre el ADN induciendo la formación de ACs.

Aunque el incremento de las ACs no es significativo, la tendencia permite inferir, que el veneno de escorpión posee una gran cantidad de péptidos de bajo peso molecular que actúan sobre diversos canales iónicos celulares (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (Petricevich, 2010; Pipelzadeh et al., 2006), causando la excitabilidad celular y la liberación de diferentes neurotransmisores, como acetilcolina y catecolaminas, que inducen la formación de EROs, esto sumado al daño sistémico, provoca en los ratones el fenómeno de estrés oxidativo (Bennett, 2001; Tudek et al., 2010; Waris and Ahsan, 2006).

Las EROs, interactúan con el ADN e inducen la formación de aductos y bases oxidadas (Bernardi et al., 1999; Circu and Aw, 2010). Uno de los casos más importantes es el de la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-OxoGua), el cual es reparado por el mecanismo de Reparación por Escisión de Bases (REB) (Floyd, 1990; Thannickal and Fanburg, 2000; Tudek et al., 2010), sin embargo cuando este sistema de reparación no es completado antes de iniciar el proceso de replicación en la fase S, esta lesión primaria puede causar sustituciones GC---TA, o crear sitios abásicos e inducir la formación de rupturas de cadena sencilla los cuales al pasar por la fase S se observan en metafase como ACs de tipo Cromatídico. Esta interacción de las EROs con el ADN explica la razón por la cual se pudo dar el incremento en la frecuencia de las ACs de tipo cromatídico (Mateuca et al., 2006; Natarajan and Boei, 2003; Obe et al., 2002; Rössner et al., 2005) (Figura 5). Es importante decir que si la célula considera que el daño genómico no es tan grave, puede continuar su ciclo celular, por esta razón a pesar de que los mecanismos de reparación están cumpliendo su función, es posible que los daños se puedan acumular en la célula a lo largo de los años, dando origen a una lesión premaligna, que muy posiblemente degenera en una enfermedad como el cáncer (Bonassi and Au, 2002; Norppa et al., 2006).

Además de las EROs, el ADN puede estar siendo afectado por los metabolitos del veneno del escorpión, generados durante los procesos de biotransformación (Fase I: activación), mediados por la familia de proteínas del Citocromo P-450, las cuales generan grupos electrofílicos como epóxidos y quinonas, que inducen lesiones primarias que al no ser reparadas o ser mal reparadas pueden generar lesiones pre-malignas y desencadenar a largo plazo un posible proceso carcinogénico. Los metabolitos también pueden unirse a grupos sulfhidrilos (SH) del citosol, y a otro tipo de biomoléculas, como las proteínas de membrana, y algunas enzimas, generando inestabilidad celular, o unirse al glutatión para continuar el proceso de biotransformación y eliminación del metabolito tóxico (Donato, 2000; Kenneth W, 2001; Nebbia, 2001).

Al comparar los datos obtenidos de los ratones tratados con la Dosis Media y la Dosis Alta con respecto a los datos del Control Negativo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de aparición de las Alteraciones Cromosómicas (ACs), sin embargo, al analizar las medias de los datos, se pudo comprobar que hubo una disminución en la frecuencia de las ACs de aproximadamente el 29.25% con la en la Dosis Media, y de un 71.0% con la Dosis Alta, respecto al Control Negativo (Figura 14 y Tabla 2), esta disminución aunque no significativa, se puede explicar por la acción del veneno sobre los canales iónicos, y especialmente sobre los canales de Ca^{2+} , ya que este ion es de gran importancia en el inicio de la cascada apoptótica, donde actúa como segundo mensajero. Cuando el veneno afecta los canales de Ca^{2+} , promueve la liberación del calcio intramitocondrial, el cual al salir al espacio intracelular inicia una serie de procesos que aumentan la liberación del Citocromo c (Cyt c) desde el interior de la mitocondria (Bernardi et al., 1999). Este es un mecanismo de retroalimentación, ya que entre más calcio sea liberado se liberará más Citocromo c, el cual a su vez causa la liberación de más calcio. Cuando el Citocromo c es liberado al espacio intracelular se une al promotor Apaf-1 y a la pro-caspasa 9 para formar el Apoptosoma, una vez formado, la pro-caspasa 9 se activa y actúa como activadora de las caspasas efectoras como la caspasa 3, para así iniciar la cascada apoptótica, de este modo, las células que han sido expuestas al veneno de escorpión son forzadas a iniciar el proceso apoptótico por vía intrínseca (Circu and Aw, 2010; Gewies, 2003; Wang and Ji, 2005), por consiguiente, no es posible realizar una medida del daño genotóxico total causado por el veneno del escorpión en estas dosis.

Otra de las causas probables de la disminución de las ACs observadas en las Dosis Media y Alta, puede ser el excesivo daño oxidativo causado por las EROs en el ADN. A estas dosis, la célula se encuentra tan afectada que activa sus sistemas de control, entre ellos el gen p53, el cual envía señales desde el núcleo a la mitocondria para promover la liberación del Citocromo c, e iniciar la cascada apoptótica por vía intrínseca (Engel and Evens, 2006; Gewies, 2003; Meki et al., 2003). Además como se mencionó, la liberación de catecolaminas es una de las características que se observan molecularmente cuando las neurotoxinas presentes en el veneno afectan las uniones sinápticas neuronales, esto genera un cambio en los potenciales de voltaje en las membranas de las células y algunos canales iónicos empiezan a presentar un mal funcionamiento en el transporte de iones y de alimento necesario para mantener la homeostasis celular, en este caso el cambio puede dar lugar a la unión de ciertos factores o ligandos en los receptores de muerte celulares membranales, lo que da lugar a la iniciación de la cascada apoptótica por vía extrínseca (Circu and Aw, 2010; Gewies, 2003; Jordan, 2003). Por estas razones, es probable que al presentarse una alta muerte celular causada por el mecanismo de apoptosis, la cantidad de daño genómico observable como Alteraciones Cromosómicas en metafase disminuye considerablemente.

Cuando el veneno del escorpión ingresa al organismo, experimenta los procesos naturales de biotransformación, los cuales se llevan a cabo principalmente en el hígado, en un principio durante la Fase I se da la bioactivación del veneno y la formación de metabolitos secundarios, los cuales pueden ser altamente reactivos con el ADN, posteriormente se da inicio al proceso de detoxificación, durante la Fase II, siendo en esta etapa la principal enzima detoxificante la Glutación S-transferasa (GST), la cual se conjuga con los metabolitos secundarios del veneno, generados durante la Fase I, inactivándolos y de esta manera inhibiendo la formación de enlaces covalentes con macromoléculas como el ADN, reduciendo de esta forma el daño inducido sobre el ADN (Buhler and Williams, 1988; Donato, 2000; Klinger, 1982; Nebbia, 2001). Es importante resaltar que todos estos efectos fueron más evidentes al tratar los ratones con la Dosis Alta, debido a que esta equivale al doble de la Dosis Media.

Los resultados obtenidos en este estudio no demuestran directamente ($p > 0.05$) que el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* ejerce un efecto genotóxico *in-vivo* en las células de médula ósea de ratón. Sin embargo el incremento en la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (ACs) de tipo Cromatídico, la Dosis Baja muestra la inducción de lesiones primarias como

rupturas de cadena sencilla o dobles, las cuales al no ser reparadas y pasar por la etapa de síntesis celular son duplicadas, percibiéndose finalmente como ACs de tipo Cromatídico, que indica que el modo de acción del veneno del escorpión *C. margaritatus* es S-dependiente.

Con las Dosis Media y Alta evaluadas se observa un efecto dosis-respuesta inversamente proporcional, donde se advierte que a mayor dosis la frecuencia de las ACs disminuye, siendo la dosis Alta la que presentó la frecuencia más baja, este efecto se pudo presentar por un alto daño a nivel del ADN, el cual activa el gen p53 e inicia el proceso apoptótico por vía intrínseca en las células afectadas (De Toro, 2006; Fink and Cookson, 2005; Gewies, 2003), otra posible causa es la activación de los procesos de biotransformación del veneno, aumentando la producción de proteínas del complejo P-450, haciendo que la inactivación del veneno fuera muy rápida y que no se indujera gran cantidad de daño genotóxico (Donato, 2000; Kenneth W, 2001).

Al comparar los resultados de este estudio con los resultados obtenidos por Dueñas (2009), con la misma especie de escorpión y en la misma cepa de ratones, encontramos que a dosis alta (37.31 µg/g), después de 40h de tratamiento, se presentó un daño genotóxico significativo ($p < 0.05$) en eritrocitos de sangre periférica, mediante la prueba de Micronúcleos (Mn) (Dueñas-Cuellar, 2009). Esta diferencia posiblemente es debida a los biomarcadores que se emplearon para determinar el daño genotóxico, Micronúcleos (Mn) y Alteraciones Cromosómicas (ACs), los cuales tienen principios biológicos diferentes. Tanto la prueba de Alteraciones cromosómicas como la de Micronúcleos permiten evaluar daño directo en el ADN (como rupturas de cadena). Adicional a esto la prueba de Micronúcleos permite determinar daños en estructuras celulares, como los microtúbulos (citotoxicidad), lo que hace posible observar tanto fragmentos cromosómicos, como cromosomas enteros rezagados, resultado de una mala disyunción celular (Bonassi et al., 2001; Hayashi et al., 2007; Hayashi et al., 1994). Por esta razón, basados en nuestros resultados, de disminución en la frecuencia de alteraciones cromosómicas en la dosis alta, podemos inferir que posiblemente la genotoxicidad observada por Dueñas (2009), se debe mayormente al daño generado por el veneno del escorpión a nivel de estructuras celulares, como los microtúbulos. Esto ratifica la inducción del daño celular y la posible activación de mecanismos apoptóticos por vía intrínseca, que disminuyen en la frecuencia de ACs a dosis alta del veneno del escorpión o sus derivados metabólicos.

El posible proceso apoptótico inducido por el gran daño causado a las células, puede ser un aspecto beneficioso para el organismo, ya que interrumpe el ciclo y la multiplicación de las células con lesiones primarias, no reparadas o mal reparadas, las cuales pueden duplicarse después de la etapa de síntesis, y fijarse en el ADN como mutaciones, y desencadenar a largo plazo un proceso carcinogénico, por esta razón, se puede inferir que el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* puede ser usado como droga terapéutica en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

8. CONCLUSIONES

La Dosis Letal 50 (DL₅₀) establecida para el veneno del escorpión *C. margaritatus*, del Valle del Patía (Cauca, Colombia), en ratones *Albino suizo* con una madurez sexual y un peso aproximado de 30 g, fue 46.64 µg/g.

Los síntomas más frecuentes de envenenamiento sistémico producidos por el veneno del escorpión *C. margaritatus*, fueron Sialorrea, Taquipnea y Disnea, con un 100% de ocurrencia, además de pérdida de equilibrio, tremor, piloerección y priapismo, entre otros. La sintomatología observada en los ratones durante envenenamiento sistémico, confirma el efecto neurotóxico de este veneno.

Este trabajo brinda información relevante acerca de los síntomas de envenenamiento causados por el escorpión *C. margaritatus*, lo cual puede ser de útil aplicación en el diagnóstico y tratamiento de los casos clínicos.

Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales dadas en este estudio, muestran que en la dosis baja, aunque no es significativo estadísticamente, permite inferir un posible efecto genotóxico del veneno de escorpión por la generación de EROs, que al interactuar con el ADN inducen rupturas de cadena, lo cual se vio reflejado en un aumento de la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas (ACs) de tipo Cromatídico. Además se puede inferir que la acción del veneno es S-dependiente.

Al aplicar la dosis media y alta, se evidenció una disminución en la frecuencia de ACs, posiblemente debido al incremento de la apoptosis celular, causada por los metabolitos secundarios, y por un incremento del daño oxidativo (EROs) provocado durante el envenenamiento, lo cual demuestra el gran daño citotóxico y genotóxico que puede inducir el veneno de escorpión *C. margaritatus* en una población humana expuesta.

Es necesario realizar más estudios sobre las diferentes tipos de toxinas que componen el veneno de escorpión *C. margaritatus*, para así poder determinar el mecanismo de activación de la muerte celular apoptótica inducida por este tipo de venenos. Es importante también incorporar biomarcadores de apoptosis, que permitan observar de forma más clara la acción del veneno sobre las células.

Este trabajo es importante, ya que abre las puertas para futuras investigaciones con el veneno del escorpión *C. margaritatus*, para el uso del veneno total o de sus fracciones, como droga terapéutica en el tratamiento de enfermedades como el cáncer en poblaciones humanas, debido a la posible acción apoptótica inducida por los metabolitos secundarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Adiguzel, S. (2010). In vivo and in vitro effects of scorpion venoms in Turkey: a mini-review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **16**, 198-211.
- Akaike, H., Shin, M.-c., Kubo, C., and Akaike, N. (2009). Effects of scorpion toxin on excitatory and inhibitory presynaptic terminals. *Toxicology* **264**, 198-204.
- Almeida Santos, M. F. M., Ferrari, I., and Luna, H. (2005). Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories. *Environmental Research* **97**, 330-334.
- Arencibia, D. F., Fernández Rosario, Luis Alfredo; Rodriguez, Yanet; López Feria, Yulieé; Díaz Rivero, Daiyana. (2009). Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos. *Retel* **23**.
- Aydemir, N., and Bilaloglu, R. (2004). The investigation of the genotoxic effects of fenarimol and propamocarb in mouse bone marrow in vivo. *Toxicology Letters* **147**, 73-78.
- Barona, J., Batista, C. V. F., Zamudio, F. Z., Gomez-Lagunas, F., Wanke, E., Otero, R., and Possani, L. D. (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 toxicológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica* **24**, 42-49.
- Bennett, M. R. (2001). Reactive Oxygen Species and Death : Oxidative DNA Damage in Atherosclerosis. *Circ Res* **88**, 648-650.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., and Di Lisa, F. (1999). Mitochondria and cell death. *European Journal of Biochemistry* **264**, 687-701.

- Bertazzi, D. T., de Assis-Pandochi, A. I., Talhaferro, V. L., Caleiro Seixas Azzolini, A. E., Pereira Crott, L. S., and Arantes, E. C. (2005). Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *International Immunopharmacology* **5**, 1077-1084.
- Bonassi, S., and Au, W. W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* **511**, 73-86.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., and Ban, S. (2001). HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **37**, 31-45.
- Brodská, B. H., Aleš (2011). Generation of Reactive Oxygen Species during Apoptosis Induced by DNA-Damaging Agents and/or Histone Deacetylase Inhibitors. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2011**.
- Buhler, D. R., and Williams, D. E. (1988). The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquatic Toxicology* **11**, 19-28.
- Circu, M. L., and Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 749-762.
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., and Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology* **320**, 1-11.
- Das Gupta, S., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J. R., Gomes, A., 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.
- De Toro, G. (2006). Muerte celular programada . Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Apoptosis* **3**, 1-6.
- Denault, J.-B., and Salvesen, G. S. (2002). Caspases: Keys in the Ignition of Cell Death. *Chemical Reviews* **102**, 4489-4500.

- Donato, M. T. (2000). ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? *Unidad De Hepatología Experimental*, 29-62.
- Dueñas-Cuellar, R. A. (2009). Valoración *in – vivo* del efecto Tóxico, Citotóxico y Genotóxico del veneno del escorpion *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841). *Tesis de grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca.*
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). MAMMALIAN CASPASES: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 383-424.
- Engel, R. H., and Evens, A. M. (2006). Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Frontiers in Bioscience* **11**, 300-312.
- Escobar, E., Velásquez, L., and Rivera, C. (2003). Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841)(Scorpiones: Buthidae). *Revista Peruana de Biología* **10**, 217-220.
- Fink, S. L., and Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907-1916.
- Flórez, E. (2001). Escorpiones de la familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. *Reporte.*
- Flórez, E. (2007). Los escorpiones: enigmáticas reliquias del pasado poco conocidas en Colombia. *Innovacion y Ciencia* **4**, 26 - 33.
- Floyd, R. A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 1447-1450.
- Gewies, A. (2003). Introduction to Apoptosis. *Review*, 1-26.
- Giri, A. K., Sai Sivam, S., and Khan, K. A. (1992). Sister-chromatid exchange and chromosome aberrations induced by paracetamol *in vivo* in bone-marrow cells of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **278**, 253-258.
- Gómez, J. P., Otero, R., Rangel, V. N., Córdoba, M. M. S., Cadavid, A. D., and Sandino, M. P. V. (2002). Aspectos toxinológicos, clínicos y epidemiológicos

del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *MEDUNAB* **5**, 159-65.

Gordillo, M. E. (2000). Escorpionismo en Pediatría. *Archivo Argentino de Pediatría* **98**, 296.

Guerrero, J. (2002). Aislamiento, Purificación y Evaluación de Neurotoxinas del Escorpión *Centruroides margaritatus* (Buthidae) del Municipio del Patía. Departamento del Cauca, Colombia.

Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Abramsson-Zetterberg, L., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., and Asano, N. (2007). In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mut. Res.-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **627**, 10-30.

Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., Oleson Jr, F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., and Shimada, H. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* **312**, 293-304.

Hernandez Betancourt, O., Casado Hernandez, I., Iglesias Huerta, E., Ramirez Labrada, A., del Risco Ramos, J., and Rodriguez Pargas, A. (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**, 0-0.

Hoffmann, A., and del Carmen Farias, M. (2003). "El maravilloso mundo de los aracnidos," Fondo de Cultura Económica.

Jackson, A. L., and Loeb, L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **477**, 7-21.

Jordan, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* **22**, 100 - 106.

Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (2000). Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Experimental Cell Research* **256**, 42-49.

- Kenneth W, R. (2001). Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* **92**, 147-163.
- Klinger, W. (1982). Biotransformation of drugs and other xenobiotics during postnatal development. *Pharmacology & Therapeutics* **16**, 377-429.
- Krifi, M. N., Savin, S., Debray, M., Bon, C., El Ayeb, M., and Choumet, V. r. (2005). Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon* **45**, 187-198.
- Krishna, G., and Hayashi, M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **455**, 155-166.
- Liou, S.-H., Lung, J.-C., Chen, Y.-H., Yang, T., Hsieh, L.-L., Chen, C.-J., and Wu, T.-N. (1999). Increased Chromosome-Type Chromosome Aberration Frequencies as Biomarkers of Cancer Risk in a Blackfoot Endemic Area. *Cancer Res* **59**, 1481-1484.
- Lourenço, G. A., Lebrun, I., and Dorce, V. A. C. (2002). Neurotoxic effects of fractions isolated from Tityus bahiensis scorpion venom (Perty, 1834). *Toxicon* **40**, 149-157.
- Lourenço, W. R., and Cloudsley-Thompson, J. L. (1996). Effects of human activities on the environment and the distribution of dangerous species of scorpion. *Envenomings and their treatments. Marcel Mérieux*, 49-60.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., and Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* **88**, 1515-1531.
- Meki, A., Hasan, H. A., Mohey El-Deen, Z. M., and Bakkar, S. (2003). Dysregulation of apoptosis in scorpion envenomed children: its reflection on their outcome. *Toxicon* **42**, 229-237.
- Natarajan, A. T., and Boei, J. J. W. A. (2003). Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. *Mutation Research* **544**, 299 - 304.
- Nebbia, C. (2001). Biotransformation Enzymes as Determinants of Xenobiotic Toxicity in Domestic Animals. *The Veterinary Journal* **161**, 238-252.

- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Stromberg, U., Rossner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R. J., Knudsen, L. E., Barale, R., and Fucic, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **600**, 37-45.
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A. T., Martínez-López, W., Folle, G. A., and Drets, M. E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **504**, 17-36.
- Omran, M. A. A. (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.
- Otero, R., Navío, E., Céspedes, F. A., Núñez, M. J., Lozano, L., Moscoso, E. R., Matallana, C., Arsuza, N. B., García, J., and Fernández, D. (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.
- Oukkache, N., Rosso, J. P., Alami, M., Ghalim, N., Saïle, R., Hassar, M., Bougis, P. E., and Martin-Eauclaire, M. F. (2007). New analysis of the toxic compounds from the *Androctonus mauretanicus mauretanicus* scorpion venom. *Toxicon*.
- P., G. J., and R., O. (2007). Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* **25**, 50-60.
- Palitti, F. (1998). Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **404**, 133-137.
- Petricevich, V. L. (2010). Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation* **2010**.
- Pineda Rivera, D., and Castellanos, J. A. (1998). Escorpionismo en Girardot Hospital San Rafael: Enero-Junio de 1994. *Tribuna Médica (Bogotá)* **98**, 19-28.

- Pipelzadeh, M. H., Dezfulian, A. R., Jalali, M. T., and Mansouri, A. K. (2006). In vitro and in vivo studies on some toxic effects of the venom from *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxicon* **48**, 93-103.
- Polis, G. A. (1990). "The biology of scorpions," Stanford University Press Stanford, CA.
- Raval, J., Lyman, S., Nitta, T., Mohuczy, D., Lemasters, J. J., Kim, J.-S., and Behrns, K. E. (2006). Basal reactive oxygen species determine the susceptibility to apoptosis in cirrhotic hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine* **41**, 1645-1654.
- Rössner, P., Boffetta, P., Ceppi, M., Bonassi, S., Smerhovsky, Z., Landa, K., Juzova, D., and Sram, R. J. (2005). Chromosomal Aberrations in Lymphocytes of Healthy Subjects and Risk of Cancer. *Environmental Health Perspectives* **113**, 517-520.
- Sevcik, C. (1987). LD 50 Determination: objections to the method fo Beccari as modified by Molinengo. *Toxicon(Oxford)* **25**, 779-783.
- Stowe, D. F., and Camara., A. K. S. (2009). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. *Antioxidants & Redox Signaling*. **11**, 1373-1414.
- Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**, L1005-L1028.
- Tudek, B., Winczura, A., Janik, J., Siomek, A., Foksinski, M., and Oliński, R. (2010). Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *American Journal of Translational Research* **2**, 254–284.
- Vainio, H. (1998). Use of biomarkers—new frontiers in occupational toxicology and epidemiology. *Toxicology Letters* **102**, 581-589.
- Valderrama, R. (1998). Envenenamiento por picadura de escorpiones. *Primer Simposio Colombiano de Toxinología: toxinas y envenenamiento por animales, plantas y microorganismos. Medellín: Ecográficas Ltda*, 169-78.
- Valdez-Cruz, N. A., Davila, S., Licea, A., Corona, M., Zamudio, F. Z., Garcia-Valdes, J., Boyer, L., and Possani, L. D. (2004). Biochemical, genetic and

physiological characterization of venom components from two species of scorpions: *Centruroides exilicauda* Wood and *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Biochimie* **86**, 387-396.

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

Waris, G., and Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* **5**, 14.

Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. k. M., Budinger, G. R. S., and Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 8788-8793.

Yasnó V., F. (2005). Determinación del efecto Citotóxico y Genotóxico del veneno de serpiente *Bothrops asper* (Viperidae) en eritrocitos de sangre periférica de ratones (*Mus musculus*) mediante la prueba de Micronúcleos. *Tesis de grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca.*

Zare Mirakabbadi, A., Zolfagharian, H., Hedayat, A., and Jalali, A. (2007). Clinical and biochemical manifestation produced by scorpion (*Hemiscorpius lepturus*) venom in experimental animals. *J. venom. anim. toxins incl. trop. dis* **13**, 758-765.

Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., and Wenxin, L. (2006). Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon* **47**, 348-355.