

VALORACIÓN *in – vivo* DEL EFECTO TÓXICO, CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO
DEL VENENO DEL ESCORPIÓN *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841)

ROSA AMALIA DUEÑAS CUELLAR

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009

VALORACIÓN *in – vivo* DEL EFECTO TÓXICO, CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO
DEL VENENO DEL ESCORPIÓN *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841)

ROSA AMALIA DUEÑAS CUELLAR

Trabajo de Grado para optar por el título de Biólogo

Directora

LUZ STELLA HOYOS GIRALDO
Bióloga. M. Sc. Salud Ocupacional

Asesor

JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS
Biólogo. M. Sc. Biología Animal

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009

Nota de Aceptación

Director Mg.Sc.
Luz Stella Hoyos Giraldo

Jurado Mg. Sc.
José T. Beltrán Vidal

Jurado Mg. Sc.
Silvio M. Carvajal

Lugar y Fecha de Sustentación: Popayán, 2 de Septiembre de 2009

A mis padres Álvaro Dueñas y Mabel Cuellar

A mi hermano Juan Sebastián

A mi familia, compañeros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la sabiduría e inteligencia para salir adelante con todos mis sueños y metas, y bendecirme con personas maravillosas en cada camino que he transitado.

A mis padres Álvaro Dueñas y Mabel Cuellar, por ser los responsables de mi formación personal y académica; por brindarme fuerza, apoyo y alegría en todos los momentos de mi vida, y especialmente por ser el mejor ejemplo de familia y fe.

A mi hermano Juan Sebastian, por su silenciosa compañía, cuidado y cariño.

A mi gran familia, por ser tan especial; por crear lazos tan fuertes e indestructibles, y por demostrar amor, ternura y confianza en cada uno de sus actos.

A mis amigos y compañeros de batalla, Alejandro Jiménez, Isaac Cohen, Juan Fernando Riascos, Lina Villada, Nestor Fabian Leyton, Paolín Cáceres y Samir Chimborazo; por compartir conmigo las mejores y más lindas experiencias, a lo largo de todos estos años.

A la Mg. Luz Stella Hoyos, por su dedicación y exigencia a lo largo del desarrollo de mi carrera; por ser una mujer y profesional ejemplar, y por aportar grandes enseñanzas a todos los aspectos de mi vida.

Al Mg. Silvio Carvajal y al Mg. Jimmy Guerrero, por sus grandes aportes científicos y metodológicos en la asesoría de este estudio, y especialmente por su amistad, apoyo y tolerancia.

Al doctor Santiago Ayerbe y al Mg. José Beltrán, por brindarme confianza y apoyo absoluto, porque en ellos encontré a los mejores padrinos para mi carrera, y a grandes amigos para la vida.

A la Auxiliar de laboratorio Elsa Velasco, por ser mi gran colaboradora en las prácticas de laboratorio, y por iluminar siempre los días con su alegría.

Al grupo de investigación en Toxicología Genética y Citogenética, por su colaboración en el desarrollo de este estudio, especialmente a la Bióloga Ingrid Reyes por su instrucción, dedicación y amistad.

Al grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT), por su gran Colaboración en la formulación y desarrollo de este estudio; por enriquecer enormemente mi formación profesional, y por ser una pequeña gran familia; gracias a cada uno de sus integrantes.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), por su colaboración y enseñanza, y por brindarme la gran experiencia de ser monitora.

TABLA DE CONTENIDO

<i>INTRODUCCIÓN</i>	12
<i>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	15
<i>2. JUSTIFICACIÓN</i>	17
<i>3. ANTECEDENTES</i>	19
<i>4. MARCO TEÓRICO</i>	23
<i>4.1. ESCORPIONES</i>	23
<i>4.2. TOXINAS ESCORPIÓNICAS</i>	25
<i>4.3. INTERVENCIÓN DEL VENENO ESCORPIÓNICO EN LA DESPOLARIZACIÓN MEMBRANAL EN CÉLULAS EXCITABLES</i>	26
<i>4.3.1. Veneno escorpiónico y su acción sobre canales de calcio</i>	26
<i>4.4. DOSIS LETAL 50</i>	27
<i>4.5. SIGNOS LOCALES Y SISTÉMICOS CAUSADOS POR ENVENENAMIENTO ESCORPIÓNICO</i>	28
<i>4.6. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS</i>	29
<i>4.7. EL ERITROCITO</i>	31
<i>4.7.1. Proceso de eritropoyesis en ratones</i>	31
<i>4.8. CITOTOXICIDAD EN ERITROCITOS ASOCIADA A APOPTOSIS</i>	33
<i>4.8.1. La maduración de los eritrocitos como una apoptosis parcial</i>	34
<i>4.8.2. Características de la apoptosis en eritrocitos</i>	34
<i>4.8.3. Condiciones fisiológicas y fisiopatológicas que inducen la apoptosis en eritrocitos</i>	35
<i>4.8.4. Mecanismos moleculares involucrados en el inicio de la apoptosis en eritrocitos</i>	36
<i>5. HIPÓTESIS</i>	38

6. OBJETIVOS	39
6.1. Objetivo General	39
6.2. Objetivos Específicos	39
7. MATERIALES Y MÉTODOS	40
7.1. TIPO DE ESTUDIO	40
7.2. MANTENIMIENTO DE LOS RATONES	40
7.3. MANTENIMIENTO DE ESCORPIONES	40
7.4. EXTRACCIÓN DEL VENENO	41
7.5. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS DEL VENENO	41
7.6. RUTA DE ADMINISTRACIÓN	42
7.7. EFECTO TÓXICO	42
7.7.1. Determinación de la dosis letal 50 (dl_{50})	42
7.8. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS	44
7.8.1. Dosis administradas en los tratamientos	45
7.8.2. Toma de muestras de sangre periférica de ratón	45
7.9. FIJACIÓN DE CÉLULAS Y TINCIÓN DE PLACAS	46
7.10. ANÁLISIS AL MICROSCOPIO	46
7.10.1. Prueba de citotoxicidad	47
7.10.2. Prueba de genotoxicidad	47
7.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
8. RESULTADOS	48
8.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS	48
8.2. EFECTO TÓXICO	48
8.2.1. Dosis letal 50 (DL_{50})	48
8.2.2. Signos locales y sistémicos de envenenamiento	50
8.3. DOSIS ADMINISTRADAS DE VENENO, CONTROL NEGATIVO Y CONTROL POSITIVO	52

8.4.	BIOMARCADOR DE MICRONÚCLEOS	52
8.4.1.	Efecto citotóxico	53
8.4.2.	Efecto genotóxico	56
9.	DISCUSIONES	60
9.1.	EFFECTO TÓXICO	60
9.1.1.	Dosis letal 50 (DL ₅₀)	60
9.1.2.	Signos locales y sistémicos de envenenamiento	60
9.2.	BIOMARCADOR DE MICRONÚCLEOS	61
9.2.1.	Efecto citotóxico	62
9.2.2.	Efecto genotóxico	64
10.	CONCLUSIONES	67
	BIBLIOGRAFIA	69

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Síntomas de envenenamiento	43
Tabla 2. Información Grupos Experimentales para citotoxicidad.	44
Tabla 3. Información Grupos Experimentales para genotoxicidad.	44
Tabla 4. Tabla de Variables.	47
Tabla 5. Valores obtenidos para la determinación de la DL ₅₀ del veneno del escorpión <i>C. margaritatus</i> (concentración inicial: 42.83 µg/g. (Guerrero, 2002))	49
Tabla 6. Signos locales y sistémicos de envenenamiento por <i>C. margaritatus</i> evaluados en ratones <i>Albino suizo</i> durante del procedimiento de DL ₅₀ .	50
Tabla 7. Dosis de veneno administradas en una única dosis, calculadas a partir de la dosis letal 50 (LD ₅₀) establecida.	52
Tabla 8. Promedio de PCE/1000 células totales, al evaluar sangre periférica de cinco ratones por tratamiento, después de 20, 30, 40, 50 y 60 horas después de administradas las dosis.	54
Tabla 9. Promedio de MN/1000PCE, obtenidos al evaluar muestras de sangre periférica de cinco ratones por tratamiento, después de 20, 30, 40, 50 y 60 horas después de administradas las dosis.	58

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Morfología Externa de un Escorpión.	23
Figura 2: Eritrocito policromático micronucleado (MN PCE) de sangre periférica de ratón.	30
Figura 3: Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos por el método Wright's – Giemsa.	30
Figura 4: Frecuencia de Micronúcleos en PCE en médula ósea (x) y sangre periférica (■).	32
Figura 5: El proceso in-vivo de eritropoyesis y los mecanismos de formación de Micronúcleos.	33
Figura 6: Extracción de veneno por estímulo eléctrico.	41
Figura 7: Protocolo experimental de la toma de muestras de sangre periférica de ratón para identificar efectos citotóxicos y genotóxicos por medio de la prueba de micronúcleos.	46
Figura 8: Protocolo de fijación celular y tinción. Método Wright's – Giemsa (Marshall, 1978)	46
Figura 9. Ratón tratado con 46.65 µg/g de veneno del escorpión <i>C. margaritatus</i> durante el procedimiento de DL ₅₀ , con signos positivos de sialorrea.	51
Figura 10. Porcentaje de presencia de signos locales y sistémicos de envenenamiento por <i>C. margaritatus</i> evaluados en ratones <i>Albino suizo</i> .	51

Figura 11.	Eritrocitos policromáticos (teñidos de morados) y normocromáticos (teñidos de rosados) de sangre periférica de ratón <i>Albino suizo</i> .	53
Figura 12.	Índice de citotoxicidad para cada tratamiento, expresado en el número de eritrocitos policromáticos (PCE) en 1000 células totales a lo largo del tiempo.	56
Figura 13.	Eritrocitos policromáticos micronucleados de sangre periférica de ratón <i>Albino suizo</i> tratados con una dosis de 37.31 mg/Kg de veneno del escorpión <i>C. margaritatus</i> .	57
Figura 14.	Índice de genotoxicidad para cada tratamiento, expresado en el número de micronúcleos en 1000 eritrocitos policromáticos (PCE) a lo largo del tiempo.	59

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existen estudios que registran el daño citotóxico de los venenos escorpiónicos, sin embargo hasta el momento ninguno se ha interesado en el daño genotóxico producido por éstos. En Colombia no existe ningún reporte de este tipo, enmarcando una situación preocupante, puesto que como país tropical posee cuatro familias de escorpiones (Buthidae, Chactidae, Diplocentridae y Liochelidae) que se encuentran frecuentemente en algunas regiones, constituyendo un riesgo para la comunidad. Los escorpiones de la familia Buthidae comprenden aproximadamente 529 especies, divididas en 73 géneros, de los cuales solo cinco son peligrosos para los humanos (Flórez, 2001); uno de ellos, el género *Centruroides*, se encuentra ampliamente distribuido en Colombia, especialmente en el departamento del Cauca, donde la especie *Centruroides margaritatus*, ha venido siendo objeto de diferentes estudios (Guerrero-Vargas, 2008; Guerrero-Vargas et al., 2003; Guerrero, 2002). Dado que el envenenamiento escorpiónico por *C. margaritatus* la mayoría de las veces no termina en muerte, fue pertinente el estudio de sus consecuencias a corto y largo plazo, y contribuir con resultados que alienten a las organizaciones de salud del Cauca para crear estrategias de prevención en las poblaciones más afectadas.

En ese sentido, se propuso realizar la prueba de Micronúcleos, un validado biomarcador de efecto (Fenech et al., 1999), que ha sido usada en estudios *in-vitro* e *in-vivo* para evaluar daño genómico, detectando de forma indirecta daño o pérdida cromosómica y efectos citotóxicos (Bonassi et al., 2001). La identificación *in-vivo* (Krishna and Hayashi, 2000) del daño causado por el veneno del escorpión *C. margaritatus*, a eritrocitos jóvenes de sangre periférica de ratón (*Albino suizo*) permite extrapolar los efectos tóxicos a la población humana, e incrementar el conocimiento sobre los problemas, en este caso, de naturaleza toxinológica, que se pueden presentar a diario especialmente en las regiones de alta susceptibilidad.

Los venenos escorpiónicos contienen variedad de componentes biológicamente activos como péptidos, enzimas, nucleótidos, lípidos, mucoproteínas y otras sustancias todavía desconocidas (Valdez-Cruz et al., 2004). Los componentes más frecuentemente estudiados son los polipéptidos que reconocen canales iónicos voltaje dependientes (Na^+ , K^+ y Ca^+) (Soualmia et al., 2007) y otros receptores en las membranas celulares excitables y no excitables. De acuerdo con

los estudios realizados hasta el momento, los efectos citotóxicos de las toxinas escorpiónicas se encuentran asociados a un incremento significativo en la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) citosólica, lo que sugiere que esta toxina actúa a nivel de membrana causando apoptosis (Omran, 2003); además, de acuerdo con los marcadores apoptóticos: Fas soluble (sFas), y Fas ligando soluble (sFasL); se ha identificado un aumento en la regulación de los sistemas sFas/sFasL y el deterioro del equilibrio de Bcl-2, relacionado con el aumento de óxido nítrico (NO) y peróxidos lipídicos (LPO) (Meki et al., 2003). Otros autores afirman que el veneno escorpiónico puede actuar de forma tal que inhibe el crecimiento celular, además de mostrar características apoptóticas como “burbujas” membranales, condensación cromatínica y degradación del ADN. (Das Gupta et al., 2007). Todos los estudios citados anteriormente están relacionados con apoptosis, marco referencial para querer observar si ese mismo daño es observable en otro tipo celular y por medio de otra técnica citogenética.

El objetivo de esta investigación fue determinar *in-vivo* el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del veneno del escorpión *C. margaritatus*; donde, los aspectos tóxicos fueron bien diferenciables y repetitivos entre los animales experimentales; a nivel celular se observó una disminución significativa en el número normal de eritrocitos jóvenes con respecto al tiempo, lo que denota citotoxicidad, así como una apreciable genotoxicidad de la dosis más alta administrada de veneno. Los resultados que se observarán en el presente estudio tienen como propósito final concientizar a la comunidad de que el envenenamiento escorpiónico es un problema de salud pública (Gómez and Otero, 2007; Pineda Rivera and Castellanos, 1998) ya que en Colombia existen poblaciones expuestas a este tipo de toxinas y no se tienen programas de prevención, ni la información necesaria para su buen tratamiento. Además, este estudio da la información necesaria para inferir la potencial aplicación del veneno del escorpión *C. Margaritatus* en el tratamiento del cáncer dada su alta citotoxicidad, en ese sentido, hasta el momento se han adelantado “screenings” antitumorales de fracciones del veneno de *C. margaritatus* en dos cepas de células cancerígenas, obteniendo en algunas de ellas menos del 50% de sobrevivencia celular¹.

¹ Estudio adelantado en el Laboratorio de Bioquímica y Química de Proteínas de la Universidad de Brasilia – Brasilia DF.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los escorpiones se encuentran ampliamente distribuidos, localizándose en todos los continentes, exceptuando la Antártida (Polis, 1990), aunque la mayoría de las especies se circunscriben a las regiones tropicales y subtropicales, altitudinalmente, es posible encontrarlos desde el nivel de mar hasta los 5.000 m, con una mayor concentración de especies entre los 0 y 2.000 m (Flórez, 2001). En Latinoamérica, los países más afectados por el escorpionismo son México y Brasil con 200.000 y 8.000 casos al año, respectivamente (Gómez et al., 2002).

Hasta la fecha, se han descrito en el mundo cerca de 1.500 especies de escorpiones ubicadas en 21 familias (Lourenco and Von Eickstedt, 2003). La familia Buthidae, que constituye la familia de interés médico, está representada en Colombia por cuatro géneros: *Ananteris*, *Centruroides*, *Tityus* y *Rhopalurus*, con 35 especies (Flórez, 2001; Flórez, 2007). En Colombia no existen datos generales sobre la problemática del escorpionismo, pero existen estudios localizados (Barona et al., 2004; Gómez et al., 2002; Otero et al., 2004), que señalan las características epidemiológicas de este tipo de envenenamiento, y resaltan la necesidad de generar nuevos estudios que amplíen el conocimiento nacional en el campo del escorpionismo, que contribuyan a la creación de bases de datos específicas de la problemática, y que ayuden a combatirla de forma precisa a corto y largo plazo.

Colombia, y especialmente el departamento del Cauca, poseen una gran variedad de gradientes altitudinales en los cuales se encuentran representados casi todos los climas, esta característica posibilita el desarrollo de varias especies de escorpiones entre los que se encuentran los géneros *Tityus* y *Centruroides*, dos de los más venenosos en lo que concierne al nuevo mundo (Sissom and Lourenco, 1987). En la actualidad la estadística de accidentes escorpiónicos no es confiable, puesto que la población afectada en muchas ocasiones no acude a los centros hospitalarios, por el contrario, recurren a la medicina tradicional (compresas con el escorpión macerado, plantas medicinales, baños locales con orina o consumo de bebidas alcohólicas) (Gómez et al., 2002), lo que hace imposible obtener datos reales, así como realizar un seguimiento de los efectos secundarios a corto y largo plazo dado que la mayoría de estos casos no terminan en muerte. Por la tanto,

una comunidad más consciente mejorará la eficiencia en los registros, y permitirá a los médicos crear un manejo eficiente del envenenamiento escorpiónico.

Empleando el biomarcador de micronúcleos y pruebas complementarias (DL₅₀, observación de signos locales y sistémicos de envenenamiento) este estudio dio respuesta a las preguntas: ¿Puede tener el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* capacidad de inducir daño tóxico, citotóxico y genotóxico? y, ¿podría este daño desencadenar, a largo plazo, un proceso carcinogénico? Además, al ser el efecto citotóxico causado por este veneno significativo, a futuro, puede ser mejor estudiado y darle aplicabilidad biotecnológica en el tratamiento del cáncer, dado que es bien conocido que las sustancias empleadas en el tratamiento de éste, poseen propiedades altamente citotóxicas, por lo que estudios de este tipo adquieren gran relevancia.

Al revisar bases de datos como “ISI web of knowlege”, “science direct” y “Medline”, se pudo observar que no existe ningún estudio que indique el potencial citotóxico y genotóxico del veneno del escorpión *C. margaritatus*, ni de ningún otro en Colombia; se observó, además, que a nivel mundial se reporta una cantidad mínima de artículos relacionados, la mayoría de éstos reportan apoptosis (citotóxicidad) y dado que la apoptosis es entre otras, la consecuencia del daño incrementado en el material genético, se diseñó un método que permitió percibir la interacción del veneno con eritrocitos policromáticos de sangre periférica de ratón al hacer uso del biomarcador de efecto micronúcleos. Además, es de resaltar que ningún estudio ha tenido como objetivo la determinación genotóxica del veneno escorpiónico lo que indica la parcial desinformación que se presenta hasta el momento en lo referente a esta problemática, y destaca la importancia y pertinencia de realizar estudios que clarifiquen el panorama frente a una problemática tan común en países como Colombia.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la escasa información existente sobre los accidentes escorpiónicos en Colombia y más aún en la región del Cauca, es de vital importancia generar conocimiento acerca de los efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos del veneno del escorpión *C. margaritatus*. No hay estudios que se hayan interesado en observar los efectos a largo plazo generados por el veneno escorpiónico y en Colombia no existe ninguna investigación relacionada con el estudio citotóxico y genotóxico del veneno de escorpiones, por lo tanto, el presente estudio es el primero que se realiza al respecto en el país, y se une a los pocos realizados a nivel mundial sobre este objeto de estudio.

Los venenos escorpiónicos se caracterizan por presentar componentes farmacológicamente activos, destacándose los péptidos que causan actividad neurotóxica sobre células excitables (Loret and Hammock, 2001), además, este veneno tiene enzimas, nucleótidos, lípidos, aminas biogénicas, compuestos bioactivos y otros componentes no identificados aún (Batista et al., 2004; Das Gupta et al., 2007), la incógnita es, si estas sustancias de origen biológico y sus derivados metabólicos interactúan con el DNA causando daños irreparables, después de una exposición aguda por envenenamiento, y si estos son potencialmente terapéuticos.

La prueba de Micronúcleos (MN) realizada *in-vivo* es especialmente importante para evaluar riesgo de citotoxicidad y genotoxicidad en aquellos casos donde se quieran considerar factores como el metabolismo, la farmacocinética, y procesos de reparación del ADN (Krishna and Hayashi, 2000). Dado que la carcinogénesis es un proceso a largo plazo, es importante considerar todo este tipo de factores, pues influyen directamente en la facilidad que pueda tener el tóxico de interactuar con el ADN al desestabilizar el equilibrio celular (procesos de señalización celular, permeabilidad de membrana, etc.), y causar lesiones primarias que se puedan fijar y convertir en mutaciones; además la prueba de Micronúcleos es considerada como una herramienta precisa y sensible comparada con los métodos convencionales como las alteraciones cromosómicas y el intercambio de cromátidas hermanas, igualmente es un ensayo ampliamente usado para evaluar la presencia y el grado de daño cromosómico, considerándose un buen

biomarcador de riesgos de cáncer (Bonassi et al., 2001). Es de aclarar que el daño causado por el veneno escorpiónico, en cuanto a su citotoxicidad en individuos sanos, puede repercutir favorablemente en el tratamiento de individuos enfermos, con patologías como el cáncer, enfermedad caracterizada por la sobreproducción celular, que afecta a gran parte de la población mundial, y que tiene tasas elevadas de incidencia y mortalidad (Murillo and Gamboa, 2006).

El registro de los signos locales y sistémicos de envenenamiento permitirá brindar una mayor información del comportamiento del veneno escorpiónico dentro de un modelo biológico, y por tanto, estos datos serán extrapolables a la población humana, donde se podrá realizar un mejor manejo médico retomando esta nueva y confiable información, dado que Colombia ni siquiera cuenta con la producción de antiveneno escorpiónico.

La identificación de los signos locales y sistémicos de envenenamiento ayudará, en primer lugar, a reconocer el cuadro clínicos de un paciente que ha sufrido una picadura de escorpión y por tanto será más rápido su tratamiento, pues en este caso ya no se tendría como objetivo contrarrestar el dolor solamente, sino, contrarrestar el recorrido del veneno y evitar lesiones en órganos como páncreas, hígado, pulmón y corazón (Tamassone et al., 2003), y más relevante aún, al presentar el veneno actividad citotóxica y genotóxica, los datos de este estudio permitirán reflexionar y motivar a las entidades administradoras de salud para que se tomen medidas de vigilancia y prevención, además de hacer un llamado para que haya un mayor apoyo a las investigaciones de este tipo, que en primer lugar, favorecen al mejoramiento de la calidad de vida de la comunidad, y que en segundo lugar aportan conocimiento científico relevante para futuros estudios.

Por lo anterior se hace pertinente la realización de un estudio *in-vivo* que evalué el daño tóxico, citotóxico y genotóxico causado por el veneno de escorpión.

3. ANTECEDENTES

Desde hace un tiempo los venenos animales y sus compuestos han despertado un gran interés en los investigadores de distintas áreas del desarrollo científico. La toxicología animal es un nuevo concepto que se ha aplicado a la investigación que tiene como objetivo primordial el estudio de las sustancias elaboradas por los seres vivos que tienen efecto sobre otros organismos (Aiello et al., 2007). Sobre los venenos escorpiónicos existe variada bibliografía, pero muy poca de esta se relaciona directamente con el potencial efecto citotóxico y genotóxico causado por este tipo de venenos. Algunas de las investigaciones más destacadas, en los últimos tiempos, son aquellas que tienen que ver con los canales iónicos voltaje dependientes y aquellas implicadas en el desarrollo de posibles tratamientos anticancerígenos a partir de algunos de los compuestos activos de venenos escorpiónicos.

A nivel físico externo existen diversos reportes en los cuales ratones experimentales tratados con veneno escorpiónico presentaron sialorrea, piloerección, somnolencia, sudoración generalizada, taquipnea, cianosis, ataxia y convulsiones antes de morir, como signos predominantes de envenenamiento (Barona et al., 2004; Gómez et al., 2002). Algunos de estos síntomas han sido observados en humanos (Gordillo, 2000; Otero et al., 2004; Tamassone et al., 2003) además, por métodos farmacológicos, histológicos y bioquímicos (*in-vivo* e *in-vitro*) se observó que el veneno del escorpión *Hemiscorpius lepturus* tiene actividad nefrotóxica y hepatotóxica (Pipelzadeh et al., 2006).

En cuanto al veneno de *C. margaritatus*, en 2003, Escobar *et al.* separaron las proteínas del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*, mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25, a partir de ejemplares adultos capturados en el norte de Perú. El perfil cromatográfico mostró la presencia de 9 picos de proteína, concordando con los datos de Guerrero 2002; 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. En 2008 se publicó el análisis parcial del veneno del escorpión *C. margaritatus*, en el que se obtuvieron un total de 43

fracciones aisladas (RP-HPLC usando una columna C₈), estas fueron analizadas por MALDI-TOF/MS y se lograron caracterizar 91 compuestos distintos obteniendo que el 54% de las toxinas de este escorpión varían en un rango de masa molecular entre 2.5 a 6 kDa, 13% entre 6.5 y 8 kDa y por último 33% son péptidos menores de 2 kDa (Guerrero-Vargas et al., 2008).

Dado que existen reportes de apoptosis causada por venenos escorpiónicos, es importante resaltar que el proceso de muerte celular programada, además de ser un fenómeno necesario para la homeostasis, es el reflejo de que el material genético tiene daños exagerados, por lo que la célula prefiere morir antes de invertir energía en la reparación, si de alguna manera el proceso de apoptosis no se da de manera adecuada, y las células con defectos tienden a sobrevivir con daños excesivos en el ADN, la célula después del proceso de replicación fija las lesiones primarias y segrega a nuevas células los daños, causando mutaciones que contribuyen al comienzo de un proceso carcinogénico (Bernstein et al., 2002; Israels and Israels, 1999).

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 en la salud pública, hasta hoy existen diversos estudios que han tenido como objetivo clarificar el potencial citotóxico de los venenos escorpiónicos. Entre los casos que confirman las teorías sobre la apoptosis como resultado del incremento de calcio intracelular a causa de veneno escorpiónico, así como una activación de la liberación de los canales de calcio incorporados bilateralmente en la membrana lipídica, se encuentran las investigaciones desarrolladas por Valdivia 1991, 1992, y Nabhani T *et al.*, 2002.

Estudios que involucran otras especies escorpiónicas, pero que relacionan toxinas específicas a citotoxicidad, se han venido desarrollando durante mucho tiempo, a la vez que se ha querido dar una explicación valedera a este tipo de respuesta celular, entre los estudios de este tipo resaltan todos aquellos que verifican la apoptosis como consecuencia de la interacción de venenos escorpiónicos con determinados tipos celulares, entre estos el realizado en células tumorales pertenecientes a las líneas eucarióticas 293T y C2C12, donde se evaluó el veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus*; los resultados citotóxicos fueron notables, y la supervivencia celular fue altamente reducida a la concentración más alta probada (50 µg/ml). El aparente daño inicial al núcleo y la lisis del plasmalema y/o de las membranas de organelas fue evidente por un incremento significativo en la liberación de LDH citosólico, esto 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. (Omran, 2003).

Otros resultados importantes fueron los obtenidos por Meki y colaboradores, ellos realizaron un estudio en una población de niños menores de trece años, con el fin de identificar irregularidades en el proceso normal de apoptosis en individuos picados por escorpiones, utilizando los marcadores apoptóticos: sFas, sFasL y Bcl-2; y la medición de los niveles de óxido nítrico y peróxidos lipídicos, concluyendo que el envenenamiento escorpiónico puede incrementar la apoptosis, lo que se observa en el aumento de la regulación de los sistemas sFas/sFasL y el deterioro de la regulación de Bcl-2, relacionado con el aumento de LPO y NO (Meki et al., 2003); de la misma forma el veneno del escorpión *Buthus martensi* Karsch (BmK) que contiene bloqueadores y moduladores de canales iónicos, induce la apoptosis *in-vitro*, de células malignas (U251-MG) cuando es aplicado en dosis de 10mg/mL, es más, el veneno BmK puede inhibir significativamente el crecimiento del tumor *in-vivo*, disminuyendo hasta la mitad su peso (Wang and Ji, 2005); otro veneno escorpiónico que ha demostrado efectos citotóxicos es el del escorpión *Hemiscorpius lepturus* que fue evaluado con el test de exclusión con azul de tripan en cultivos de fibroblastos, concluyendo que este es un agente citotóxico y hemolítico (Pipelzadeh et al., 2006).

La actividad antiproliferativa y apoptótica del veneno del escorpión *Heterometrus bengalensis* Koch fue evaluada en dos líneas celulares (U937 y K562) de leucemia humana. Los estudios dieron como resultado que el veneno de este escorpión inhibe el crecimiento celular, además de mostrar características apoptóticas como "burbujas" membranales, condensación cromatínica y degradación del ADN. La fragmentación del ADN se evidenció por la formación de cometas, y la cantidad de células apoptóticas (tempranas y tardías) fueron evaluadas por citometría de flujo, la cual arrojó una alta significancia para las células tratadas. La detención del ciclo celular fue observada en la alta acumulación de células en la fase G₁. Concluyendo entonces que el veneno del escorpión *H.bengalensis* posee actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica en células de leucemia humana (Das Gupta et al., 2007).

El daño citotóxico reportado hasta el momento es de carácter apoptótico, pero no excluye que este pueda ser observado por medio de otras técnicas, o en diferentes estadios celulares, como en el posible daño inicial causado por el veneno escorpiónico al material genético, es por eso que el presente estudio

involucra la técnica citogenética de micronúcleos en la evaluación de los daños citotóxicos y genotóxicos causados por el veneno del escorpión *C. margaritatus*, dado que en búsqueda en diferentes bases de datos como ISI web of knowlege, Science Direct y Medline no se encontró ningún estudio que relacionara esta prueba con la evaluación citotóxica y genotóxica de venenos de escorpión.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. ESCORPIONES

Los escorpiones son quelicerados terrestres, incluidos dentro de la clase Arachnida (Polis, 2001), son animales fascinantes por la presencia de un conjunto sorprendente de adaptaciones bioquímicas, fisiológicas, comportamentales y ecológicas, que combinadas, les han permitido asegurar su ancestral supervivencia sobre el planeta. Son organismos depredadores que se alimentan de una amplia gama de animales, principalmente insectos, aunque entre sus presas se incluyen también pequeños vertebrados. Sus hábitos son generalmente nocturnos. Su cuerpo se encuentra dividido en dos regiones: el cefalotórax (prosoma) y el abdomen (opistosoma), aunque este último se encuentra subdividido en una porción anterior relativamente amplia, conformada por siete segmentos (el mesosoma), y una posterior angosta y muy flexible, constituida por cinco segmentos a manera de anillos (metasoma), denominada comúnmente como “cola”, que termina en una vesícula portadora de dos glándulas secretoras de toxinas, que porta en su extremo apical un ahusamiento a manera de aguijón (Flórez, 2001).

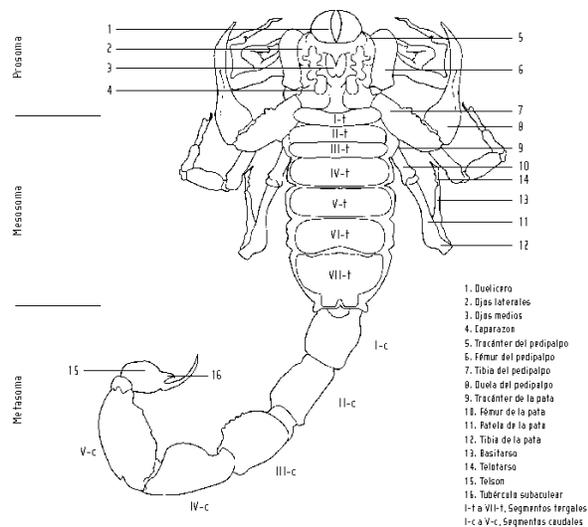


Figura 1: Morfología Externa de un Escorpión.

Fuente: Flórez, E. Los escorpiones: enigmáticas reliquias del pasado poco conocidas en Colombia.

Hasta hace tiempo, 50 o 60 años, los procedimientos médicos utilizados para la atención de la intoxicación por picadura de escorpión eran solo de tipo empírico, hoy en día se cuentan con sueros específicos para contrarrestar la sintomatología propia de los accidentes escorpiónicos, pero estos aún no son producidos en Colombia. Desgraciadamente muchas regiones de Colombia aún siguen recurriendo a las prácticas tradicionales, por lo que las cifras reales no se encuentran fácilmente. Antioquia y Tolima son los departamentos con mayor información reportada en aspectos toxinológicos, epidemiológicos y clínicos (Otero *et al.* 2004).

Las características propias del veneno de distintas especies han generado la investigación de diversas áreas de la epidemiología, la fisiología, la toxicología, inmunoistoquímica, entre otros, pero hasta ahora son muy pocas las investigaciones que se han centrado en el posible daño a nivel celular y genético que podrían causar este tipo de venenos; además es de resaltar que algunos autores (Lourenço, 1990, 1992; Polis, 1990) señalan a los escorpiones como “organismos ideales para el desarrollo de investigaciones” que van desde aspectos bioquímicos, de comportamiento, hasta ecología evolutiva y sumándole ahora aspectos genéticos, dado que en los últimos tiempos se han encontrado aplicaciones biotecnológicas en las toxinas aisladas de venenos de origen animal (Favreau *et al.*, 2006; Guerrero-Vargas *et al.*, 2008).

4.1.1. *Centruroides margaritatus*

Los escorpiones utilizados durante estudio fueron colectados en el departamento del Cauca, en el municipio del Patía, especialmente en el sector rural; sin embargo no es raro encontrarlos en continua interacción con los humanos.

La población de esta especie está muy bien establecida, es abundante y ha alcanzado el éxito reproductivo en este hábitat. En algunos casos, como en el municipio del Patía, es considerada como una plaga ya que se pueden encontrar varios especímenes en algunas casas en tan solo una semana. Se podría decir que si existe suficiente comida (cucarachas, por ejemplo), presencia de escombros, piedras, lotes abandonados, bodegas u otros objetos, se esperaría encontrar una alta población de estos escorpiones.

La especie es de tamaño mediano a grande, pudiendo llegar a alcanzar fácilmente los 11 cm de longitud. La coloración es variable. Las tenazas, al igual que los

segmentos terminales de la cola, son de color más oscuro que el resto del cuerpo, que por lo general es de café oscuro a negro. Las patas son amarillo claro, en algunos casos esta coloración puede variar drásticamente, presentando coloraciones rojizas o casi totalmente café oscuras.

Los machos son más delgados y largos que las hembras, aunque esto es difícil de determinar en algunas circunstancias. Esta es la especie que presenta las carinas (líneas de gránulos, principalmente en los apéndices de las tenazas y la cola) mejor marcadas y fáciles de distinguir. En el resto del cuerpo posee una mayor cantidad de gránulos y rugosidades.

4.2. TOXINAS ESCORPIÓNICAS

Los péptidos conocidos hasta el momento reflejan una gran diversidad por la presencia de cerca de 400 polipéptidos que pueden presentar o no enlaces disulfuro. Las toxinas escorpiónicas con puentes disulfuro presentan una variedad de secuencias y funciones farmacológicas que pueden afectar diferentes canales iónicos, mientras que los péptidos del veneno que no tienen enlaces disulfuro representan una nueva subfamilia, teniendo mucha más baja homología de secuencias entre uno y otros y diferentes funciones (Zhijian et al., 2006).

Los venenos escorpiónicos presentan una gran variedad de toxinas peptídicas que se dividen en dos grandes grupos de polipéptidos. El primero consiste en varias clases de toxinas de cadena larga que afecta principalmente los canales para Na⁺, y el segundo que incluye toxinas de cadenas cortas que afectan canales para K⁺ y Cl⁻ en membranas celulares. Todas estas toxinas están compuestas o subdivididas en α -, β -, y γ - hélices conectadas por una doble o triple hebra y por puentes disulfuro altamente conservados (Possani et al., 2000; Mao et al., 2007; Tytgat et al., 1999); aquellas tipo alfa son específicas para los procesos de inactivación de canales de sodio voltaje dependientes, las toxinas tipo beta alteran el mecanismo de apertura normal de los canales de sodio; péptidos de cadenas más extensas, cercanas a 130 residuos de aminoácidos que actúan sobre la permeabilidad de los iones calcio en membranas excitables (Loret and Hammock, 2001; Rodríguez de la Vega et al., 2003), mientras que los otros péptidos bloquean de manera específica los canales calcio sensibles a la rianodina (Olamendi-Portugal et al., 2002; Valdivia et al., 1991; Valdivia et al., 1992) ; Hasta el día de hoy se han reconocido 1500 especies de escorpiones alrededor del

mundo, al mismo tiempo que se han identificado cerca de 100.000 péptidos diferentes.

Entre las características más representativas de las neurotoxinas escorpiónicas están: su alta estabilidad molecular, por lo tanto son resistentes a cambios del medio ambiente, además, no se inactivan con cambios bruscos de pH, agentes desnaturizantes, enzimas proteolíticas, ni por altos rangos de temperatura. 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).

4.3. INTERVENCIÓN DEL VENENO ESCORPIÓNICO EN LA DESPOLARIZACIÓN MEMBRANAL EN CÉLULAS EXCITABLES

Una célula excitable es aquella célula que puede generar cambios en su potencial de membrana en respuesta a un estímulo físico o químico y responder a estos cambios a través de proteínas sensibles a los cambios en el voltaje de membrana, generando cambios en la polarización de la misma, logrando hiperpolarizaciones transitorias y/o depolarizaciones, es decir hacen respectivamente menos o más negativo el valor del potencial de membrana con respecto a su valor en el reposo. Estos cambios transitorios se generan en las células excitables gracias a sus complejos y específicos sistemas de transporte, para finalmente generar las señales eléctricas que viajan hacia su sitio efector (Quintanar-Escorza and Salinas, 2007).

4.3.1. Veneno escorpiónico y su acción sobre canales de calcio

En general, el incremento de calcio en el citoplasma es consecuencia de dos fenómenos, es decir la salida de calcio del retículo endoplasmático y la entrada de calcio del líquido extracelular al citoplasma, predominando uno u otro dependiendo de la célula o del estímulo que induce el incremento de calcio intracelular.

Por otro lado, los reservorios intracelulares del calcio pueden estar relacionados con el retículo endoplásmico mediante la acción de otros segundos mensajeros tales como el inositol trisfosfato (InsP3) y el mismo calcio, los cuales se unen con alta afinidad a sus respectivos receptores. De modo tal que cuando el calcio intracelular libre se incrementa al liberarse calcio del retículo endoplásmico, éste

es liberado por los canales de calcio que son operados por ligandos, los cuales son estructural y funcionalmente muy diferentes a los canales de calcio presentes en la membrana plasmática. El retículo endoplásmico posee dos tipos diferentes de canales liberadores de calcio los cuales están estructuralmente relacionados entre sí. Uno de ellos es el receptor a InsP3 y el otro es el canal liberador de calcio que es sensitivo a la rianodina, comúnmente conocido como receptor a rianodina (RRy), el cual fue identificado en el músculo como un mediador en el mecanismo de liberación de calcio inducida por el propio calcio (Quintanar-Escorza and Salinas, 2007; Saris and Carafoli, 2005).

La acción de los venenos escorpionicos sobre estos receptores fue estudiada por Valdivia (1991) quien identificó una péptido del veneno del escorpión *Buthus hottentota* que estimula la acción de los receptores de rianodina de manera altamente específica en el retículo sarcoplasmático cardíaco y en microsomas cerebrales. El veneno entero y las fracciones purificadas activan la liberación de Ca^{+2} de los receptores de rianodina incorporados en la bicapa lipídica. Según los resultados, el veneno además produjo un aumento de 10 veces en el tiempo medio de apertura del canal e indujo el aspecto de un estado de subconductancia duradero no observado en los controles (Valdivia et al., 1991). Posteriormente fueron aislados del veneno del escorpión *Pandinus imperator* otros dos peptidos, llamados "imperatoxina inhibidor" e "imperatoxina activador," específicos para la liberación de calcio por medio de los receptores de rianodina (Valdivia et al., 1992).

Otra toxina específica para canales de calcio es la aislada del escorpión chino *Buthus martensi Karsch* (BmK-PL) la cual estimula la liberación del calcio. En experimentos sobre canales de calcio, la toxina incrementa la actividad liberadora, así como incrementa la probabilidad de apertura del canal (P_o) de 0.019 a 0.043 (226% del control) (Kuniyasu et al., 1999)

4.4. DOSIS LETAL 50

Se conoce como Dosis Letal 50 a la cantidad en miligramos de un tóxico, químico o biológico, que al ser administrado a una población experimental, causa la muerte al 50% de la población. La dosis letal depende del peso corporal del animal y los resultados se expresan en términos de miligramos o microgramos de tóxico por kilogramo en peso del animal (mg/kg - μ g/kg).

La determinación de la DL50 es esencial para la estandarización de cualquier ensayo que pretenda utilizar químicos o venenos de origen natural en pruebas *in-vivo*. La determinación de la DL50 puede conllevar sufrimiento sobre los animales experimentales por lo que las razones éticas para que el número de animales usados en estos experimentos y la duración de los ensayos sean minimizados, crece cada día más (Ley 84 de 1989, estatuto nacional de protección de los animales).

En 1987 Sevcik discute los métodos existentes para la realización de la DL50 y resalta la necesidad de un análisis estadístico apropiado para los datos, dado que al ser una prueba *in-vivo* los datos pueden ser afectados por varios factores. Además resalta el método de Beccari modificado por Molinengo, 1979, como uno de los más relevantes, pues este afirma que se puede determinar la DL50 con un grupo mínimo de 8-10 ratones, y que los resultados son comparables con los obtenidos en las metodologías tradicionales, adicionalmente, el tiempo de observación se reduce a 30 min., siendo este el adecuado para evaluar la dinámica del veneno dentro del organismo (Sevcik, 1987).

4.5. SIGNOS LOCALES Y SISTÉMICOS CAUSADOS POR ENVENENAMIENTO ESCORPIÓNICO

Existen varias investigaciones conducidas a la descripción de los efectos causados por los venenos escorpiónicos y sus toxinas en el metabolismo, en el páncreas, a nivel cardiovascular, neuromuscular, respiratorio, renal, gastrointestinal y en el sistema nervioso central (Barão et al., 2008).

Los signos más frecuentes de envenenamiento presentados por ratones inyectados por vía i.p. son sialorrea, piloerección, sudoración generalizada y somnolencia. Con excepción de la sudoración generalizada, estos signos aparecen desde los 10–15 minutos posteriores a la inyección del veneno. A los 20-30 minutos, los ratones presentan taquipnea, ataxia y convulsiones. Además también se ha podido observar que en la medida en que se aumenta la dosis, también se incrementa la frecuencia de taquipnea, de cianosis y de compromiso neurológico, llegando a presentar sangrado por vía oral y anal 30 minutos post-inyección del veneno (Barona et al., 2004; Gómez et al., 2002; Gordillo, 2000; Otero et al., 2004; Tamassone et al., 2003).

4.6. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Los MNs son pequeños cuerpos citoplasmáticos de origen nuclear que se forman a partir de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas completos que quedan rezagados durante la anafase en la división celular y su presencia es un reflejo de rompimientos cromosómicos durante la mitosis (Rooney, 2001).

La evaluación *in-vivo* de la frecuencia de Micronúcleos es la prueba principal en una batería de pruebas genotóxicas y es recomendada por las agencias reguladoras alrededor del mundo como una prueba relevante por su significancia biológica y como una variante de la prueba de Alteraciones Cromosómicas que permite evaluar riesgo de cáncer. (Krishna, Hayashi, 2000).

El uso de la técnica de recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesta por primera vez por Countryman y Heddle (Countryman and Heddle, 1976), esta tenía como único requisito la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica. Más tarde, en 1985, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley, consiguiendo marcar cuales células ya han pasado por una división celular, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: cytokinesis-block micronucleus) cuyo fundamento es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B cuya función es impedir la citocinesis celular, lo que permite observar células binucleadas.

La prueba de Micronúcleos como medida de la inestabilidad genética se basa en que durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; cuando este proceso se produce de manera errónea debido a fallas durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas por efecto de las radiaciones y de sustancias genotóxicas, se produce pérdida cromosómica que hace que la segregación del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético no se adhiere a las fibras del huso mitótico, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado "Micronúcleo" (Figura 2), visible fácilmente al microscopio óptico (Fenech and Morley, 1985).

La prueba de Micronúcleos en ratón se realiza sobre eritrocitos de sangre periférica que han expulsado el núcleo, lo que hace que la identificación de los

Micronúcleos sea más fácil debido a su rápida identificación. La prueba de Micronúcleos se emplea para evaluar tanto exposición aguda, en eritrocitos policromáticos, como exposición crónica en eritrocitos normocromáticos. Esta diferencia se basa en el tiempo que los eritrocitos tardan en expulsar del todo el material ribosomal de su interior, por lo que se denominan eritrocitos jóvenes a los eritrocitos policromáticos (basófilos) y eritrocitos normocromáticos (acidófilos) a las células maduras, que pierden sus ribosomas solo 24 horas después de la enucleación (Marshall, 1978) (Figura 3).

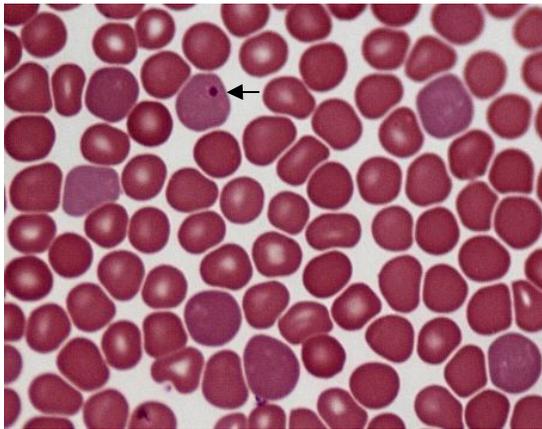


Figura 2: Eritrocito policromático micronucleado (MN PCE) de sangre periférica de ratón

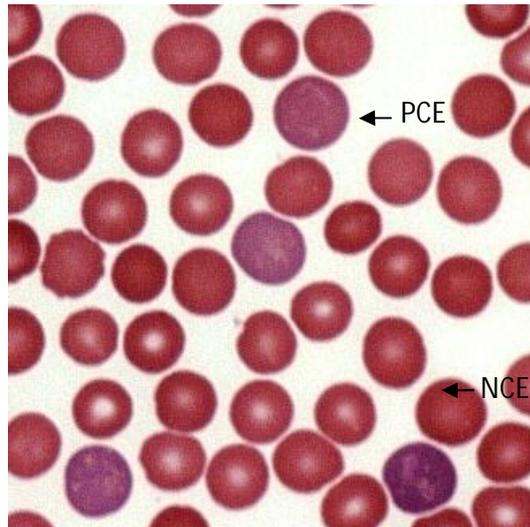


Figura 3: Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos por el método Wright's – Giemsa. PCEs Eritrocitos jóvenes que contienen RNA, basófilos, tiñen de azul; NCEs Eritrocitos maduros, de menor tamaño que los PCE, acidófilos, tiñen de rosado.

4.7. EL ERITROCITO

Los eritrocitos de mamíferos son células anucleadas en etapa terminal, con metabolismo, sistemas de transducción de señales, transportes activos y una serie de funciones celulares complejas. Los eritrocitos de mamíferos en etapa fetal, los eritrocitos de anfibios, de reptiles y de aves en la etapa adulta si tienen núcleo, lo que les da características morfológicas de células nucleadas. Aunque el material genético de estos eritrocitos si puede ser utilizado para realizar una rudimentaria síntesis *de novo* en estas células, no se han encontrado funciones extraordinarias dependientes del ADN nuclear, por lo que el transporte de oxígeno continúa siendo la función primordial; tampoco se presenta división celular en el torrente sanguíneo.

Los eritrocitos son la forma madura y terminal de los eritroblastos. El ciclo de vida de los eritrocitos puede ser dividido en tres fases: la primera que es la eritropoyesis, que consiste en la producción de eritrocitos en los órganos hematopoyéticos, como la médula ósea roja, mismos que se maduran a partir de los pro-eritroblastos policromatófilicos, los cuales se transforman en eritroblastos ortocromáticos y maduran finalmente a eritrocitos. La segunda fase es la concerniente a la salida de los eritrocitos maduros de los órganos eritropoyéticos hacia la sangre, y la tercera fase es la destrucción de los eritrocitos que han envejecido en el sistema retículoendotelial (Daugas et al., 2001).

4.7.1. Proceso de eritropoyesis en ratones

En 1999 Zetterberg *et al.* por medio de Citometría de flujo describe la trayectoria de los MPCE, estableciendo los tiempos exactos en los cuales estos pasan de médula ósea a sangre periférica en ratón, señalando que la frecuencia más alta de Mn en PCE de sangre periférica es 40 horas después del tratamiento, mientras que en médula ósea es de 28 h. como podemos observar en la figura 4.

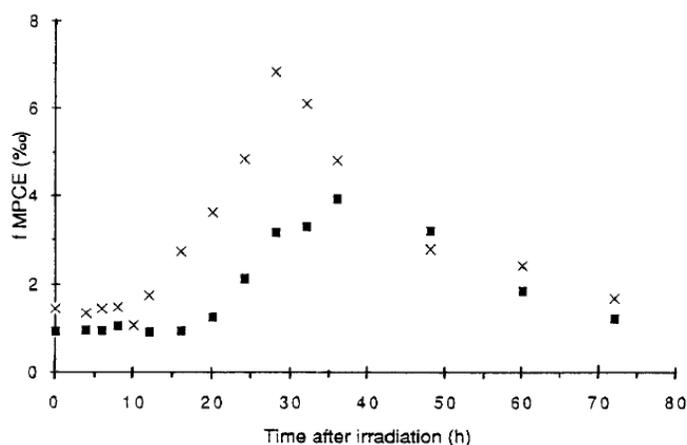


Figura 4: Frecuencia de Micronúcleos en PCE en médula ósea (x) y sangre periférica (■).

Fuente: The time-course of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood (Abramsson-Zetterberg et al., 1996)

En el roedor adulto, tanto la médula ósea como el bazo son órganos hematopoyéticos, en donde las células madre forman la base de la eritropoyesis pasando por estadios de proliferación y maduración. Durante la proliferación, las células continúan dividiéndose al mismo tiempo que el agente a evaluar ya administrado puede actuar y causar daños cromosómicos, tales como quiebres e intercambios, y pueden también actuar sobre macromoléculas relacionadas con funciones como la separación de las cromátidas, o disfunciones en el huso acromático, dependiendo del mecanismo de acción. Los cromosomas que han sufrido estos daños, o los fragmentos cromosómicos productos de rupturas se “retrasan” del ciclo celular normal, ya sea por una disfunción del huso mitótico, producto de la interacción del ADN con un agente aneugénico, o la ruptura cromosómica o cromatídica por agentes clastógenos (Figura 5), por lo tanto permanecen en el citoplasma celular mientras el proceso de división concluye, no entran a formar parte de los nuevos núcleos, y eventualmente forman un Micronúcleo, que podrá ser visto posteriormente en el citoplasma.

Durante la maduración, cuando el eritroblasto se desarrolla en un eritrocito policromático (PCE) que todavía contiene RNA, el núcleo principal es expulsado y cualquier Micronúcleo que se haya formado quedará en el citoplasma. Un incremento en la frecuencia de Micronúcleos en PCEs en los animales tratados con algún agente indica la inducción de daño cromosómico. Los PCEs, con el tiempo, pierden el RNA conteniendo principalmente hemoglobina, convirtiéndose así en Eritrocitos Normocromáticos (NCE), eritrocitos maduros, en su mayoría más pequeños que los PCE. Estos dos tipos de eritrocitos, teñidos diferencialmente

pueden ser observados tanto en médula ósea como en sangre periférica o en bazo. En la prueba de Micronúcleos, la proporción de los PCE frente a los NCE proporciona un índice de citotoxicidad al relacionar los cambios cuantitativos de los tratamientos con respecto al grupo control, mientras que la frecuencia de Mn en PCE señala la genotoxicidad debido al aumento del daño cromosómico traducido en el incremento de micronúcleos con respecto a la normal, en pruebas en las cuales el daño se ha inducido de forma aguda (Krishna and Hayashi, 2000).

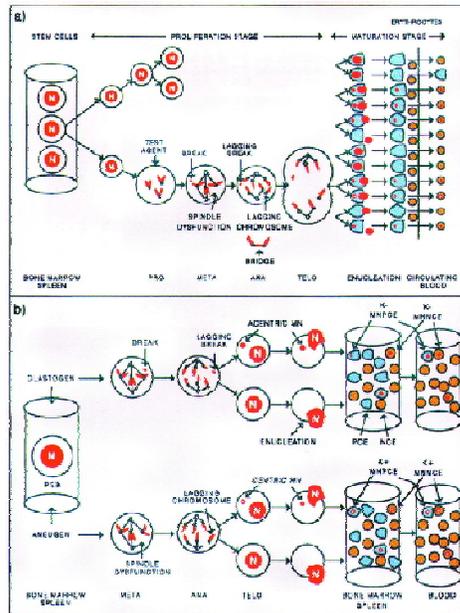


Figura 5: El proceso *in-vivo* de eritropoyesis y los mecanismos de formación de Micronúcleos.

Fuente: Krishna, G., and Hayashi, M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay

4.8. CITOTOXICIDAD EN ERITROCITOS ASOCIADA A APOPTOSIS

La mayoría de las células eucariotas superiores tienen la capacidad de auto-destrucción por la activación de un programa de suicidio celular intrínseco cuando ya no son necesarias, o se han dañado seriamente por estímulos internos o externos. La señal de apoptosis puede ser puesta en marcha por diversos estímulos como la toxicidad química, radiación, o el daño genotóxico. (Lyonel and Esther., 1999). A través de la apoptosis se eliminan células anormales, dañadas, infectadas o transformadas y se puede evitar la persistencia de mutaciones múltiples (Angosto, 2003; Lodish, 2003) que constituyen una amenaza para el normal funcionamiento del organismo.

4.8.1. La maduración de los eritrocitos como una apoptosis parcial

La primera fase para la maduración de los eritrocitos es una fase muy controlada, ya que la diferenciación de los eritroblastos lleva consigo lo que se podría considerar un mecanismo de apoptosis parcial que termina en la diferenciación hacia eritrocitos. La eritropoyetina, además de inducir eritropoyesis, también es capaz de detener la apoptosis de los eritroblastos, una vez que los dirige a su maduración. La eritropoyetina induce una serie de cambios moleculares, entre los que resulta una modulación positiva de la proteína antiapoptótica Bcl-XL y una disminución de la actividad de caspasas.

De manera muy interesante la maduración de estas células requieren de la activación de caspasas-3, -6 y -7 que están involucradas en la desaparición de orgánulos durante el proceso de formación de eritrocitos. Al inhibir a las caspasas se compromete la maduración, previniendo que los eritroblastos puedan llegar a eritrocitos. Las caspasas de manera característica se activan en el proceso apoptótico y su inhibición reduce o evita la apoptosis en células nucleadas, este paralelismo favorece la idea de un fenómeno secuencial de apoptosis parcial en la maduración y que se completa con la eliminación del eritrocito del torrente circulatorio.

El proceso de maduración también requiere la participación de enzimas hidrolíticas del ADN (ADNsas); la ADNasa II es necesaria en el eritroblasto para el proceso de enucleación en la maduración lo que llevará finalmente a una célula sin núcleo. Se ha reportado que la ADNasa II del eritroblasto proviene de macrófagos por un proceso llamado remoción heterofágica; es decir un proceso en el cual vesículas con enzimas digestivas y proapoptóticas secretadas por los macrófagos, se integran a eritroblastos para completar la Maduración y contribuir a la digestión del núcleo y culminar con esta etapa apoptótica (Conti et al., 2005; Daugas et al., 2001).

4.8.2. Características de la apoptosis en eritrocitos

Las diferencias entre la apoptosis común y la apoptosis que se lleva a cabo en los eritrocitos se encuentra, claramente, en la ausencia de núcleo y mitocondria en los eritrocitos. Sin embargo, las similitudes permiten identificar que se trata de un fenómeno similar adaptado a las características propias de los eritrocitos (Lang et al., 2005a).

Los primeros fenómenos de la apoptosis, tales como la lisis nuclear, la fragmentación del ADN, la translocación del citocromo-C, la depolarización y la lisis mitocondrial y nuclear no se presentan en la apoptosis de los eritrocitos, pero sí en el eritroblasto durante el proceso que da origen al eritrocito. El eritroblasto también presenta activación de caspasas y evidentemente cambios de la membrana plasmática que incluyen alteraciones de forma y contracción celular. Las etapas más avanzadas de la apoptosis se identifican claramente en la apoptosis del eritrocito, la pérdida de potasio intracelular, la activación de canales de calcio, la activación de escramblasas (enzimas translocadoras de fosfolípidos), la contracción celular, la activación de caspasas, la activación de esfingomielinasa y la externalización de fosfatidilserina; eventos que no se presentan en el eritroblasto y que para el eritrocito son mecanismos necesarios para su retención por macrófagos en el sistema retículo endotelial y así, llevar cabo su destrucción no inflamatoria con la formación de vesículas similares a las vesículas apoptóticas (Lang et al., 2006).

4.8.3. Condiciones fisiológicas y fisiopatológicas que inducen la apoptosis en eritrocitos

La apoptosis de los eritrocitos puede ser empleada fisiológicamente por el organismo para destruir eritrocitos envejecidos, sin daño necrótico (hemolítico), favoreciendo la identificación de los eritrocitos envejecidos por las células del sistema retículo endotelial (macrófagos). El envejecimiento del eritrocito se caracteriza por un incremento en las concentraciones de calcio intracelular libre. La apoptosis en eritrocitos es importante para prevenir la hemólisis dentro del sistema circulatorio, la destrucción de los eritrocitos dentro de los vasos sanguíneos provocaría alteraciones de las condiciones fisiológicas de la sangre, alteraciones en la coagulación, daño a la microcirculación y daños renales, entre otros (Hermle et al., 2006).

La apoptosis de los eritrocitos también puede iniciarse en el caso de infección de los eritrocitos con parásitos como la malaria o por virus hemolíticos como el parvovirus. También algunas enfermedades metabólicas pueden provocar un incremento de este tipo de apoptosis y reducir la vida media de los eritrocitos, estas enfermedades incluyen: la anemia sideroblástica ideopática adquirida, la deficiencia de hierro, la talasemia, la anemia falciforme, o las deficiencias de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa que es la deficiencia enzimática más frecuente

en humanos. Así mismo, es posible encontrar datos de apoptosis en eritrocitos en intoxicaciones con metales tales como mercurio y plomo (Quintanar-Escorza et al., 2007). En todos estos casos la externalización de fosfatidilserina permite que los eritrocitos sean identificados por macrófagos circulantes o por macrófagos del sistema reticuloendotelial que inician respuestas inmunológicas y terminan el proceso eritrotóxico del eritrocito afectado (Daugas et al., 2001; Hermle et al., 2006).

4.8.4. Mecanismos moleculares involucrados en el inicio de la apoptosis en eritrocitos

Los principales mecanismos moleculares involucrados en el inicio de la apoptosis en eritrocitos son la disminución de la carga energética de la célula (relación ATP/ADP, AMP) y la disminución del poder reductor del eritrocito a través de la relación ADP/NADPH y la de glutatión reducido/oxidado, así como por el estrés osmótico. Algunas de estas tres señales moleculares o las tres son el punto de convergencia de los factores que pueden provocar este tipo de apoptosis (envejecimiento, estrés metabólico, daño tóxico, infecciones, etc.) (Lang et al., 2005a).

Las tres formas de estrés metabólico que pueden inducir apoptosis en eritrocitos (energético, oxidativo y osmótico) producen un incremento de calcio intracelular libre, aun cuando lo hacen por diferentes vías. En el caso del estrés energético la reducción de ATP afecta a la ATPasa de calcio, reduciendo su actividad y con ello la salida de calcio, con el consecuente incremento de calcio intracelular. Para el caso del estrés oxidativo, la reducción de glutatión reducido incrementa la permeabilidad a calcio a través del canal de cationes, permitiendo una mayor entrada de calcio y con ello el incremento de este catión en el interior del eritrocito.

Por su parte el estrés osmótico, activa a la fosfolipasa A2, que libera ácido araquidónico de la fosfatidilcolina, dicho ácido es convertido por la enzima ciclooxigenasa a prostaglandina E2, la cual estimula al canal catiónico del que depende la entrada de calcio. Adicionalmente en diferentes experimentos se ha podido demostrar que los tres tipos de estrés (oxidativo, energético y osmótico) pueden activar a la ciclooxigenasa. El incremento de calcio intracelular libre activa al canal Gardós (canal de potasio dependiente de calcio), que provoca la salida de potasio, que a su vez induce la salida de agua y de cloro, generando una contracción del eritrocito. Tanto el incremento del calcio intracelular, la disminución

de potasio y la contracción de la célula, activan a una escramblasa de fosfatidilserina, lo que provoca la externalización de fosfatidilserina.

Otra enzima involucrada en la apoptosis de los eritrocitos y que es también una señal apoptótica en células nucleadas es la μ -calpaína, una proteasa de cisteína. Esta proteasa es activada por incrementos de calcio intracelular libre y después de sufrir autoproteólisis degrada proteínas del citoesqueleto, entre ellas a la espectrina y la fodrina desestabilizando con ello a las membranas e induciendo la formación de microvesículas ("blebbing"), características de la apoptosis, y causando modificaciones en la forma del eritrocito (Lang et al., 2003; Lang et al., 2005b).

5. HIPÓTESIS

Si el veneno del escorpión *C. margaritatus* ejerce un efecto tóxico en ratones, se espera que estos presenten signos locales y sistémicos de envenenamiento (Hi), de lo contrario se espera que los ratones no presenten ningún síntoma (Ho).

Si el veneno del escorpión *C. margaritatus* es citotóxico a nivel de células somáticas en Eritrocitos Policromáticos (PCE) y Eritrocitos Normocromáticos (NCE) de sangre periférica de ratón, se espera encontrar una alteración (aumento ó disminución) en la proliferación de Eritrocitos policromáticos con respecto a los Eritrocitos Normocromáticos (Hi), de lo contrario se espera que la frecuencia se PCE frente a NCE sea cercana o igual al control negativo (Ho).

Si el veneno del escorpión *C. margaritatus* es genotóxico a nivel de células somáticas en eritrocitos de sangre periférica (PCE y NCE) de ratón, se espera un incremento en la frecuencia de Micronúcleos (Hi), de lo contrario, se espera que la frecuencia sea igual o menor al control negativo (Ho).

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Determinar, *in-vivo*, el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* en ratones *albino suizo*, mediante la valoración de signos locales y sistémicos de envenenamiento y el Biomarcador de Micronúcleos.

6.2. Objetivos Específicos

Identificar el efecto tóxico del veneno del escorpión *C. margaritatus* valorando signos locales y sistémicos de envenenamiento en ratones Albino suizo tratados por vía intraperitoneal.

Evaluar el efecto citotóxico del veneno de *C. margaritatus* mediante la cuantificación de Eritrocitos Policromáticos en relación con Eritrocitos Normocromáticos en sangre periférica de ratón.

Establecer el efecto genotóxico del veneno de *C. margaritatus* mediante la cuantificación de la frecuencia de Micronúcleos en Eritrocitos Policromáticos de sangre periférica de ratón.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio experimental *in vivo* empleando ratones *Albino suizo* tratados con diferentes concentraciones (9.32, 18.65 y 37.31 mg/Kg) de veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* y se incluyeron los controles negativo (Solución salina 0.9 %) y positivo (Ciclofosfamida 50 mg/Kg). Se evaluaron los signos locales y sistémicos de envenenamiento, la cantidad de eritrocitos policromáticos (PCE) frente a los eritrocitos normocromáticos (NCE) y la frecuencia de Mn en eritrocitos policromáticos de sangre periférica.

7.2. MANTENIMIENTO DE LOS RATONES

Se emplearon ratones *Albino suizo* machos de una cepa ICR provenientes de los laboratorios de VECOL (Veterinaria de Colombia) con 9 semanas de nacidos y con un peso aproximado de 30-35 g. Fueron mantenidos en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), hasta el momento que cumplieron la edad apta para experimentación (9 semanas) en condiciones específicas: ciclos de 12h luz/12h oscuridad, temperatura ambiente (18 a 20 °C), se instalaron en cajas de acero inoxidable, las cuales estaban debidamente rotuladas, se les administró agua y alimento *ad libitum* cada día, siempre en horarios de la mañana.

7.3. MANTENIMIENTO DE ESCORPIONES

Los escorpiones proporcionados por el Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) fueron colectados en el Valle del Patía, en época lluviosa, fueron separados por sexo y mantenidos en cajas de plástico en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), fueron alimentados suministrándoles una cucaracha por cada dos escorpiones por semana y agua *ad libitum*, la limpieza se realizó cada tres días.

7.4. EXTRACCIÓN DEL VENENO

El veneno utilizado para la realización de la DL50 y para los diferentes tratamientos aplicados fue obtenido de un grupo de escorpiones de la especie *Centruroides margaritatus* (hembras y machos). La extracción del veneno se realizó cada 15 días durante tres meses, utilizando un generador de impulsos eléctricos JRM, 2000, para lo cual, se colocó cada escorpión en un inmovilizador dejando libre únicamente el metasoma, con una pinza larga se sostuvo el tercer segmento introduciendo el telson en el tubo eppendorf, con las pinzas del generador se aplicaron 50 voltios (corriente alterna) en la zona intermedia entre el cuarto y quinto segmento, para permitir que el impulso llegara adecuadamente a los músculos de las glándulas secretoras (Guerrero-Vargas, 2008). A cada escorpión se le aplicaron cinco impulsos, para obtener una adecuada extracción y garantizar el bienestar de los escorpiones. Después de cada extracción el veneno se conservó a -80°C .

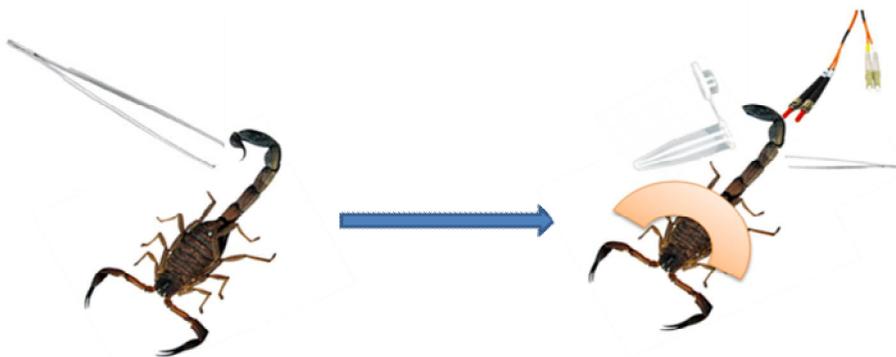


Figura 6: Extracción de veneno por estímulo eléctrico.

7.5. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DEL VENENO

El “pool” de veneno extraído fue centrifugado a 6000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 8°C , se recuperó el sobrenadante y se procedió a calcular la concentración de proteínas, para esto se tomaron $10\mu\text{l}$ de veneno y se diluyeron en $1990\mu\text{l}$ de Solución salina (NaCl 0.9%), esta muestra se colocó en una celdilla de cuarzo para espectrofotómetro donde se midió la absorbancia a 280nm ; para obtener la concentración real del veneno se aplicó la Ley de Lambert–Beer.

$$C_{fv}(\text{mg/mL}) = (A_{280})(Fd)(V_t)$$

Donde

Cfv = Concentración final del “pool” de veneno.

A₂₈₀ = Absorbancia a 280 nanómetros. (El blanco para la lectura fue NaCl 0.9%)

Fd = Factor de dilución.

Vt = Volumen total del pool de veneno.

7.6. RUTA DE ADMINISTRACIÓN

Las distintas dosis del veneno y soluciones control se administraron por vía intraperitoneal en una única dosis, utilizando una jeringa de 1mL para cada ratón, el volumen a inyectar se calculó según el peso de cada ratón. Se escogió esta ruta de administración con el fin de simular la picadura del escorpión, y poder observar las reacciones tóxicas producidas por el veneno.

7.7. EFECTO TÓXICO

7.7.1. Determinación de la dosis letal 50 (dl₅₀)

Para la prueba completa se utilizaron 13 ratones machos de 9 semanas de edad con un peso aproximado de 30-35 g. Después de establecer la concentración real del veneno extraído se realizó la determinación de la DL50 partiendo de una dosis letal previamente reportada: 42.83 µg/g. (Guerrero, 2002). Se empleó el método de Molinengo reportado por Sevcik (1987).

El veneno fue administrado por vía intraperitoneal (ip) en una sola dosis. Los efectos tóxicos se observaron durante 30 minutos, tiempo en el cual el ratón tratado podía o no morir, de acuerdo a esto, se calculó la dosis a administrar al siguiente ratón siguiendo el siguiente protocolo: Para encontrar el volumen inicial (λ), en µL, de veneno que debía ser inyectado al primer ratón, se multiplicó la dosis inicial por el peso del ratón 1 en g., el valor obtenido se dividió por la concentración del veneno disuelto en solución salina previamente cuantificado, luego se realizaron las observaciones del efecto del veneno en un tiempo de 30 minutos. El protocolo indica que si el ratón vive, a λ , dividido entre el peso del ratón, se le calcula el logaritmo y se le suma una constante de 0,04, y si el ratón muere, también a λ , dividido entre el peso del ratón, se le calcula el logaritmo pero se resta la constante 0,04; a este valor se le calcula el antilogaritmo (10^x) y se

multiplica por el peso del siguiente ratón y así se obtiene el volumen a aplicar al siguiente ratón. Para calcular la dosis aplicada a este siguiente ratón, el volumen agregado se multiplicó por la concentración del veneno y se dividió por el peso del ratón (Sevcik, 1987).

Los datos se registraron y posteriormente se ingresaron al programa estadístico Toxico. Durante el procedimiento de DL50 se realizó la evaluación de los signos locales y sistémicos del envenenamiento, los cuales fueron registrados de acuerdo a su aparición en el tiempo en función de la dosis única administrada correspondiente (Tabla 1).

Tabla 1. Síntomas de envenenamiento

SIGNOS	Presencia (+) / Ausencia (-)													% aparición
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Sialorrea														
Piloerección														
Sudoración generalizada														
Somnolencia														
Priapismo														
Taquipnea														
Disnea														
Cianosis														
Perdida de equilibrio														
tremor														
Convulsiones														
Muerte														
Aumento en excreción.														

7.8. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Tabla 2. Información Grupos Experimentales para citotoxicidad

Grupos de estudio	Tratamiento	Única Dosis	# ratones	Células por individuo		Células totales
				# PCE	Eritrocitos totales	
Control negativo	Sl'n salina 0.9 %	50 mg/Kg	5		1000	5000
Grupo experimental	Dosis baja 25% DMT	9.32 mg/Kg	5		1000	5000
	Dosis media 50% DMT	18.65 mg/Kg	5		1000	5000
	Dosis alta 80% DL ₅₀	37.31 mg/Kg	6		1000	5000
Control positivo	Ciclofosfamida	50 mg/Kg	5		1000	5000

Tabla 3. Información Grupos Experimentales para genotoxicidad

Grupos de estudio	Tratamiento	Única Dosis	# ratones	Células por individuo		Células totales
				MN PCE	PCE totales	
Control negativo	Sl'n salina 0.9 %	50 mg/Kg	5		1000	5000
Grupo experimental	Dosis baja 25% DMT	9.32 mg/Kg	5		1000	5000
	Dosis media 50% DMT	18.65 mg/Kg	5		1000	5000
	Dosis alta 80% DL ₅₀	37.31 mg/Kg	6		1000	5000
Control positivo	Ciclofosfamida	50 mg/Kg	5		1000	5000

Se establecieron cinco grupos de estudio: dos grupos controles (un control positivo (ciclofosfamida) y un control negativo (solución salina)), y tres grupos experimental de animales tratados con dosis baja, media y alta (veneno). Cada grupo contó con cinco animales.

El diseño realizado fue de bloques aleatorizados, empleando cinco jaulas. Para evitar variables intragrupos, se instalaron el mismo número de ratones por caja (uno por tratamiento) y fueron tomados al azar para la aplicación de los tratamientos. Al final se obtuvieron cinco repeticiones por cada tratamiento.

7.8.1. Dosis administradas en los tratamientos

A partir del dato de DL_{50} se establecieron tres dosis a aplicar, la Dosis Máxima Tolerada (DMT), empleada como dosis alta; la dosis media y la dosis baja equivalentes al 40% y el 20% de la DL_{50} , respectivamente.

Para el control positivo se utilizó ciclofosfamida (50 mg/Kg), reconocido mutagénico utilizado en pruebas *in-vivo* para inducir alteraciones cromosómicas y Micronúcleos, disuelta en solución salina (NaCl 0,9%). El control negativo fue solución salina (0,9%) la cual se utilizó como disolvente del veneno y del control positivo.

7.8.2. Toma de muestras de sangre periférica de ratón

La recolección de muestras de sangre para evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos se llevó a cabo a las 20, 30, 40, 50 y 60 horas después del tratamiento, para cada uno de los grupos de estudio (Figura 8).

Para el montaje de las preparaciones citogenéticas se colocó una gota de sangre periférica de ratón extraída de la arteria ventral de la cola, sobre la placa limpia y rápidamente, con la ayuda de un cubreobjetos se realizó un extendido muy fino sobre toda la superficie de la placa. Este procedimiento se efectuó por triplicado para cada uno de los ratones de los diferentes grupos de estudio (Hoyos et al., 2002).

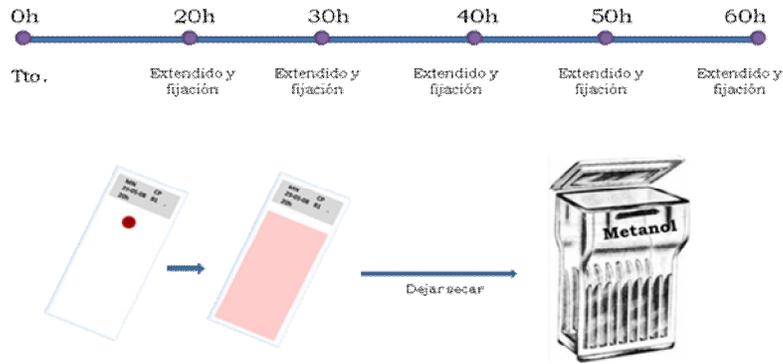


Figura 7: Protocolo experimental de la toma de muestras de sangre periférica de ratón para identificar efectos citotóxicos y genotóxicos por medio de la prueba de micronúcleos.

7.9. FIJACIÓN DE CÉLULAS Y TINCIÓN DE PLACAS

Después de obtenidas las preparaciones citogenéticas se realizó el proceso de prefijación sumergiéndolas en metanol durante 30 minutos, a continuación se dejaron secar durante 24 horas. Las placas secas fueron sumergidas en un coplin con metanol, durante 2 minutos, e inmediatamente fueron pasadas al colorante Wright's (filtrado) por 15 minutos; luego se realizó el primer lavado con agua destilada. Posteriormente se trasladaron a una solución de Giemsa al 10%, por 45 minutos y se realizó el segundo y tercer lavado de las placas en agua destilada. Las placas se dejaron secar en cámara de flujo laminar durante 24 horas, después de las cuales se montaron permanentemente con Entellan.



Figura 8: Protocolo de fijación celular y tinción. Método Wright's - Giemsa (Marshall, 1978)

7.10. ANÁLISIS AL MICROSCOPIO

Para la lectura de Micronúcleos, las placas previamente codificadas (doble ciego) se observaron en microscopio de luz a 10x para identificar campo, y con un

aumento de 100x para el análisis y registro total por el método de rastreo chino. Se leyeron un total de 2000 eritrocitos por ratón.

7.10.1. Prueba de citotoxicidad

Para evaluar el efecto citotóxico se registró el número de eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos totales.

7.10.2. Prueba de genotoxicidad

Para evaluar el efecto genotóxico se registró el número de Micronúcleos en 1000 eritrocitos policromáticos.

7.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la aplicación de los tratamientos se hizo un diseño de bloques completos aleatorizados con medidas repetidas, donde cada ratón fue una unidad experimental, y cada caja un bloque.

Inicialmente se empleó estadística descriptiva, y como los datos se ajustaron a la normal, se aplicó ANOVA para medidas repetidas. Para comparar los tratamientos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, y para comparar tiempos con respecto a los tratamientos se aplicó la prueba de Freedman. Todas las pruebas se realizaron usando el paquete estadístico SPSS versión 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences), y siempre se tuvo en cuenta un nivel de significancia máximo de 0.05 ($P < 0.05$).

Tabla 4. Tabla de Variables.

VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICIÓN	ANÁLISIS ESTADÍSTICO
Concentración de Veneno	Independiente	cuantitativa	Razón	ANOVA Factorial Multivarianza Ó Kruskal-Wallis
Signos locales y sistémicos de envenenamiento	Dependiente	Cualitativa (ordinal)	Razón	
PCE/cell Totales	Dependiente	Cuantitativa	Razón	
MN/ PCE	Dependiente	Cuantitativa		

8. RESULTADOS

8.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

Por medio del espectrofotómetro de masas y aplicando la fórmula para concentraciones finales de Lambert - Beer, se determinó que el veneno extraído tenía una concentración de 93.8 mg/mL de proteína. A partir de ésta se prepararon dos soluciones de trabajo, con concentraciones de 5 mg/mL y 2 mg/mL respectivamente, con el fin de medir los volúmenes administrados más fácilmente.

8.2. EFECTO TÓXICO

8.2.1. Dosis letal 50 (DL_{50})

Para calcular la Dosis letal 50 del veneno del escorpión *C. margaritatus* utilizado en este estudio, se administró la primera dosis de veneno escorpiónico, calculada al multiplicar el peso del ratón 1, por la dosis letal 50 previamente reportada (42.83 $\mu\text{g/g}$. (Guerrero, 2002)), el valor obtenido se dividió por la concentración del veneno disuelto en solución salina previamente cuantificado, después de 30 minutos de observación, el ratón continuaba con vida, por lo que de acuerdo al protocolo, el valor λ (225 μL) se dividió por el peso del ratón (29.66 g) dando como resultado 8.59, a este dato se le sacó el logaritmo (0.93) y se le sumó la constante 0.04, a este valor se le calculó el antilogaritmo y se multiplicó por el peso del siguiente ratón (30.42 g), así se obtiene el volumen a aplicar (283.8 μL) para el siguiente ratón (ratón 2). Para conocer cuál fue la dosis aplicada al ratón 2, se multiplicó el volumen de veneno agregado por la concentración del veneno, (5 mg/ml) y se dividió por el peso del ratón obteniendo la concentración del veneno dentro del ratón 2 (46.64 $\mu\text{g/g}$).

Este procedimiento se realizó para cada uno de los 13 ratones utilizados para todo el experimento como se observa en la tabla 5. 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 del respectivo ratón.

Tabla 5. Valores obtenidos para la determinación de la DL₅₀ del veneno del escorpión *C. margaritatus* (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	43	-
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	+

El promedio (mediana) obtenido, con base en los datos de la tabla 4, mediante el método Hodges y Lehmann a través del software estadístico de Carlos Sevcick (1998), fue de 46.64 µg/g con un intervalo de confianza del 95% de 46.32 a 46.92. Este valor se tomó como la DL₅₀ del veneno de *C. margaritatus*.

8.2.2. Signos locales y sistémicos de envenenamiento

El contenido de la Tabla 6 describe el comportamiento de los ratones durante media hora de observación, después de administrado el tratamiento. En la primera columna de la tabla encontramos los signos y síntomas de envenenamiento escorpiónico mas conocidos; observamos también cada uno de los 13 ratones estudiados, marcados con signos positivos y negativos, de acuerdo a la presencia o ausencia de signos y síntomas de envenenamiento, respectivamente. Durante la media hora de observación se fueron presentando diferentes signos y síntomas de envenenamiento, muchos de ellos presentes en todos los animales (sialorrea, taquipnea y disnea), y otros, como la sudoración generalizada y la cianosis no se presentaron, o fueron difíciles de reconocer a simple vista; por último, se reporta el porcentaje de aparición de cada uno de ellos. Es importante resaltar que los síntomas se evaluaron de acuerdo a la observación directa de los individuos y no por procedimientos específicos para cada uno de ellos.

Tabla 6. Signos locales y sistémicos de envenenamiento por *C. margaritatus* evaluados en ratones *Albino suizo* durante del procedimiento de DL₅₀.

SIGNOS	Presencia (+) / Ausencia (-)													% aparición
	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
Perdida de equilibrio	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	92,3
tremor	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	61,5
Convulsiones	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	23,1
Muerte	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	46,2
Aumento en excreción.	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	46,2



Figura 9. Ratón tratado con 46.65 µg/g de veneno del escorpión *C. margaritatus* durante el procedimiento de DL₅₀, con signos positivos de sialorrea.

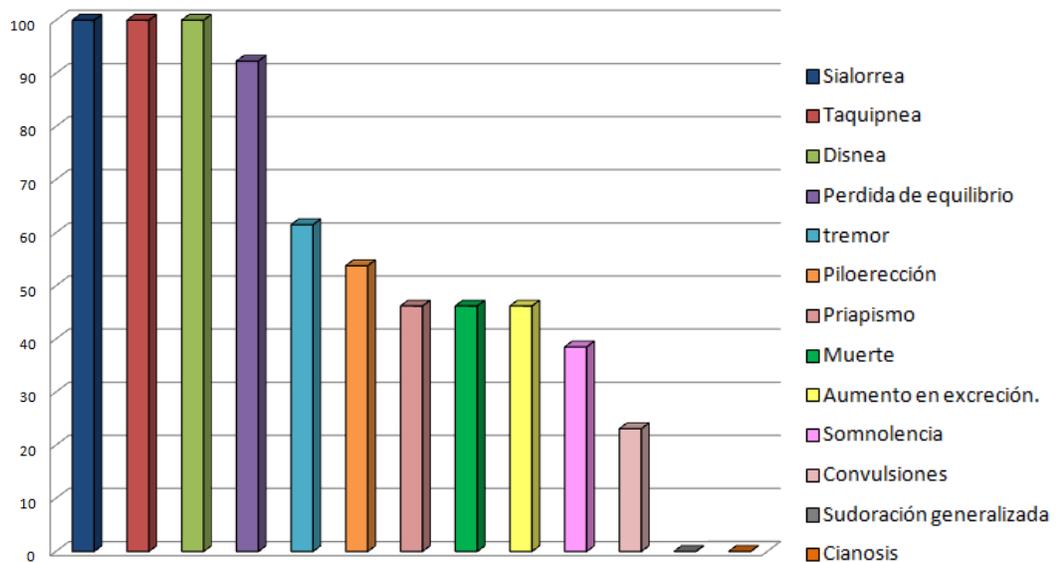


Figura 10. Porcentaje de presencia de signos locales y sistémicos de envenenamiento por *C. margaritatus* evaluados en ratones *Albino suizo*.

8.3. DOSIS ADMINISTRADAS DE VENENO, CONTROL NEGATIVO Y CONTROL POSITIVO

El veneno administrado en el estudio fue en una dosis única, procedimiento conocido como exposición aguda, en el cual, al tiempo 0 (cero), se inyectaron por vía intraperitoneal todos los ratones, y a partir de ese momento se realizaron muestreos a diferentes tiempos. Las dosis de veneno administradas fueron calculadas a partir de la DL_{50} establecida ($46.64 \mu\text{g/g}$), siendo la dosis alta, conocida también como dosis máxima tolerada (DMT), el 80% de esta (37.31 mg/kg), las dosis media y baja correspondieron al 50 y 25% de esta, respectivamente (18.65 mg/Kg y 9.32 mg/Kg). Los controles empleados se administraron en dosis reportadas en estudios *in-vivo* anteriores (tabla 7).

Tabla 7. Dosis de veneno administradas en una única dosis, calculadas a partir de la dosis letal 50 (LD_{50}) establecida.

Grupos de estudio	Tratamiento	Única Dosis
Control negativo	Sln salina 0.9 %	50 mg/Kg
Grupo experimental	Dosis baja 25% DMT	9.32 mg/Kg
	Dosis media 50% DMT	18.65 mg/Kg
	Dosis alta 80% DL_{50}	37.31 mg/Kg
Control positivo	Ciclofosfamida	50 mg/Kg

8.4. BIOMARCADOR DE MICRONÚCLEOS

Para el análisis estadístico se registraron el número de eritrocitos policrómicos observados en 1000 células totales (citotoxicidad), y el número de micronúcleos en 1000 eritrocitos policromáticos por ratón, para cada uno de los tratamientos, y para cada una de las horas de muestreo programadas. Posteriormente fueron ingresados al programa Excel y se transfirieron al paquete estadístico SPSS 11.5 (Statistical Package for to Social Scientific) donde se hicieron los análisis correspondientes, con un nivel de significancia máximo de 0.05.

8.4.1. Efecto citotóxico

En el ensayo de micrónúcleos el efecto citotóxico se detecta como una disminución del número de eritrocitos policromáticos con respecto al grupo control negativo (solución salina). Los PCE son eritrocitos jóvenes que contienen RNA, que es basófilo y tiñe de azul o morado con la coloración diferencial de Wright-Giemsa. Los eritrocitos policromáticos, con el tiempo, pierden el RNA, conteniendo principalmente hemoglobina, convirtiéndose en eritrocitos maduros o normocromáticos (NCE), de menor tamaño que los PCE, de figura más redondeada y de carácter acidófilo, por lo que tiñen de rosado (figura 11).

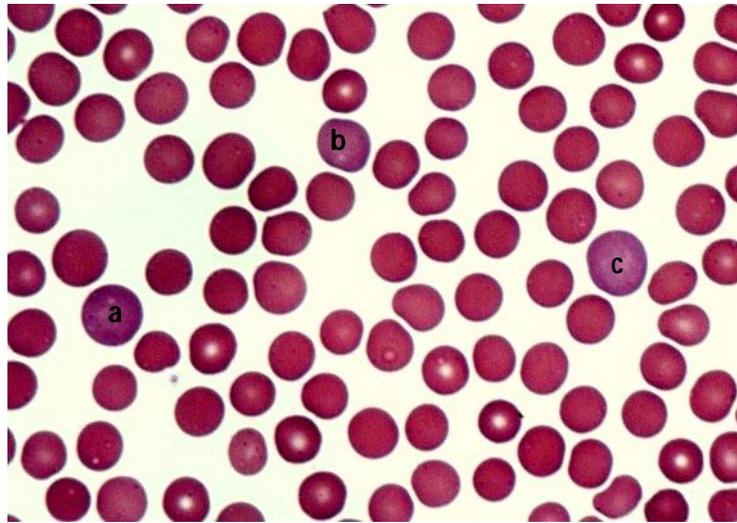


Figura 11. (a,b,c) Eritrocitos policromáticos (PCE) (teñidos de morados) y normocromáticos (NCE) (teñidos de rosados) de sangre periférica de ratón *Albino suizo*

Tabla 8. Promedio de PCE/1000 células totales, al evaluar sangre periférica de cinco ratones por tratamiento, después de 20, 30, 40, 50 y 60 horas después de administradas las dosis.

TRATAMIENTOS	TIEMPO (horas)					
		20	30	40	50	60
Control negativo (solución salina)	Media	35,72	35,38	36,26	36,05	35,83
	Desv. típ.	0,32	0,70	0,47	0,50	0,53
	Error típ.	0,14	0,31	0,21	0,23	0,24
Dosis baja (9.32 mg/Kg)	Media	34,80	33,25	26,75	23,05	21,25
	Desv. típ.	0,41	2,09	0,70	2,77	0,79
	Error típ.	0,18	1,04	0,35	1,39	0,40
Dosis media (18.65 mg/Kg)	Media	35,30	32,84	26,78	25,16	22,78
	Desv. típ.	0,75	1,84	1,19	0,65	1,45
	Error típ.	0,34	0,82	0,53	0,29	0,72
Dosis alta (37.31 mg/Kg)	Media	35,39	34,82	33,48	31,78	30,78
	Desv. típ.	0,75	0,60	0,86	1,39	1,35
	Error típ.	0,34	0,27	0,39	0,62	0,60
Control positivo (ciclofosfamida)	Media	32,02	28,94	26,00	23,22	20,22
	Desv. típ.	1,32	0,98	0,76	1,51	2,15
	Error típ.	0,59	0,44	0,34	0,68	0,96
Total	Media	34,65	33,04	29,98	28,05	26,53
	Desv. típ.	1,55	2,65	4,39	5,48	6,48
	Error típ.	0,31	0,54	0,90	1,12	1,35

p<0,001

p<0,001

p *= 0,001

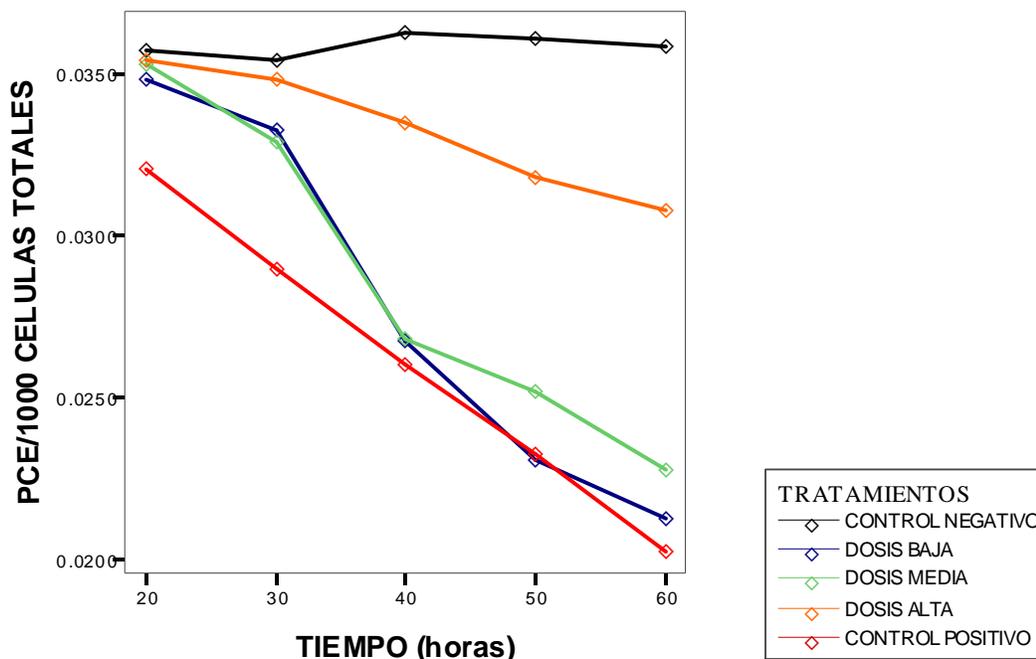
p: Significancia estadística obtenida mediante ANOVA factorial para medidas repetidas
p*: Significancia de la interacción o acción conjunta del tiempo y los tratamientos

Como los datos se ajustan a la distribución normal ($p < 0.05$ para todos los tiempos), para su análisis, se aplicó análisis de varianza para medidas repetidas. El resultado del ANOVA indica que, en la frecuencia de PCE/1000 células totales, influyen tanto el tiempo ($p < 0,001$; $f = 218,49$), como los tratamientos, (veneno escorpiónico y controles) ($p < 0,001$; $f = 172,78$). La interacción I efecto combinado entre tratamientos y tiempo, también fue significativa ($p = 0,001$; $f = 3$), indicando que el efecto de los tratamientos sobre la disminución de eritrocitos policromáticos, es dependiente del tiempo.

Con base en la figura 12 y la respectiva prueba de comparaciones múltiples, (Turkey), se puede concluir lo siguiente: Se identificó una diferencia significativa entre los tratamientos, para los diferentes tiempos analizados ($p < 0,05$), con tendencia a la disminución de la frecuencia de eritrocitos policromáticos en el conteo de células totales (PCE + NCE), a medida que transcurre el tiempo de tratamiento.

Al comparar los tratamientos entre sí, se observa que los de mayor citotoxicidad son las dosis media y baja de veneno escorpiónico, las cuales se comportan congruentemente con el control positivo, esto para todos los tiempos. La dosis alta muestra una citotoxicidad que se incrementa con el tiempo, la cual es significativamente mayor a la observada en el control negativo, pero que es significativamente menor, que la reportada en las dosis baja y media.

Figura 12. Índice de citotoxicidad para cada tratamiento, expresado en el número de eritrocitos policromáticos (PCE) en 1000 células totales a lo largo del tiempo.



8.4.2. Efecto genotóxico

En el ensayo de micronúcleos la genotoxicidad se expresa de acuerdo a la frecuencia de micronúcleos presentes en 1000 eritrocitos totales por cada ratón (PCE/1000 células totales). Durante la maduración, cuando el eritroblasto se convierte en eritrocito policromático, el núcleo principal es expulsado; si algún micronúcleo se ha formado como resultado del daño genético ejercido, éste queda rezagado en el citoplasma celular después de la interfase mitótica y forma su propia membrana. En la figura 13 observamos micronúcleos en eritrocitos policromáticos muestreados 40h después de aplicada una dosis única de 37.31 mg/Kg de veneno escorpiónico.

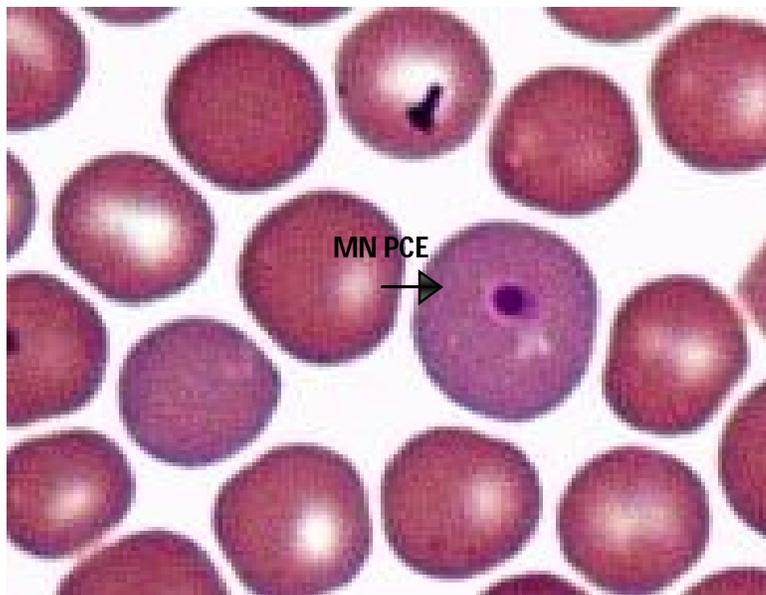
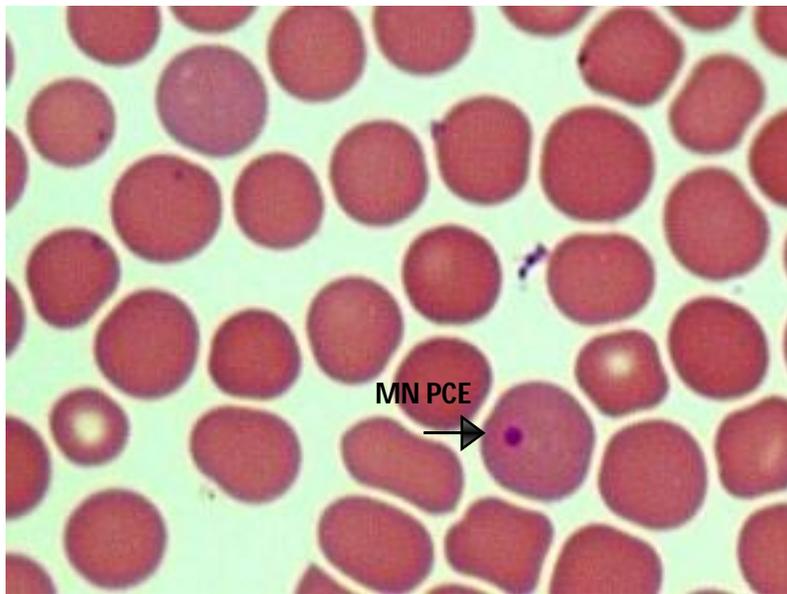


Figura 13. Eritrocitos policromáticos micronucleados de sangre periférica de ratón *Albino suizo* tratados con una dosis de 37.31 mg/Kg de veneno del escorpión *C. margaritatus*.

Tabla 9. Promedio de MN/1000PCE, obtenidos al evaluar muestras de sangre periférica de cinco ratones por tratamiento, después de 20, 30, 40, 50 y 60 horas después de administradas las dosis.

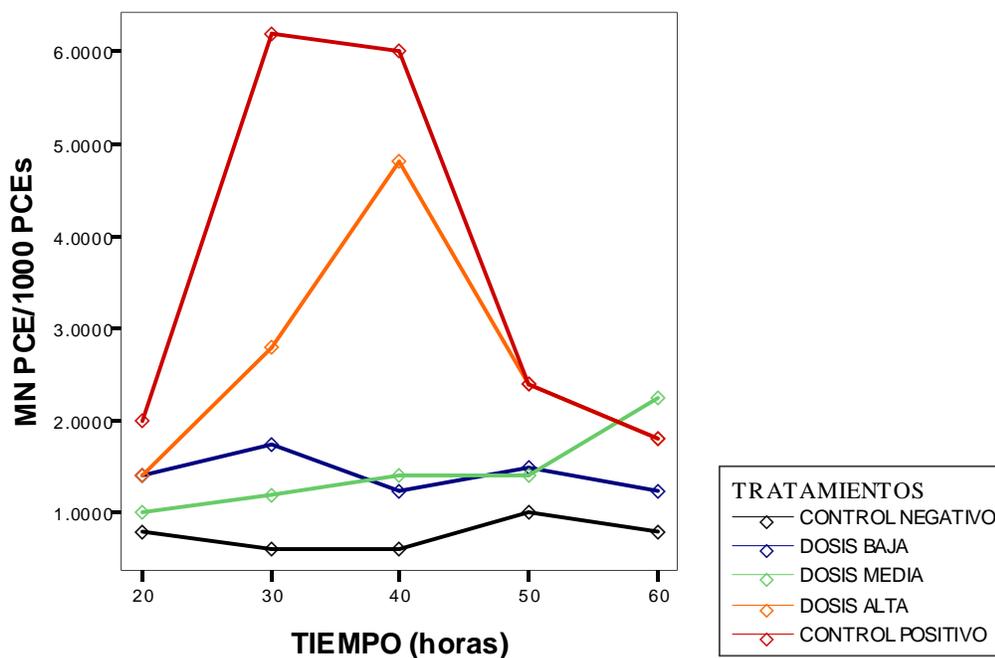
TRATAMIENTOS		TIEMPO (horas)					
		20	30	40	50	60	
Control negativo	Media	0,80	0,60	0,60	1,00	0,80	
	Desv. típ.	0,84	0,55	0,55	1,22	0,84	
	Error típ.	0,37	0,24	0,24	0,55	0,37	
Dosis baja	Media	1,40	1,75	1,25	1,50	1,25	
	Desv. típ.	1,14	1,50	0,96	2,38	1,26	
	Error típ.	0,51	0,75	0,48	1,19	0,63	
Dosis media	Media	1,00	1,20	1,40	1,40	2,25	
	Desv. típ.	1,00	1,10	1,14	1,67	1,26	
	Error típ.	0,45	0,49	0,51	0,75	0,63	
Dosis alta	Media	1,40	2,80	4,80	2,40	1,80	
	Desv. típ.	1,67	1,30	2,49	0,89	1,10	
	Error típ.	0,75	0,58	1,11	0,40	0,49	
Control positivo	Media	2,00	6,20	6,00	2,40	1,80	
	Desv. típ.	0,71	2,39	2,74	1,82	0,84	
	Error típ.	0,32	1,07	1,22	0,81	0,37	
Total	Media	1,32	2,54	2,88	1,75	1,57	
	Desv. típ.	1,11	2,47	2,79	1,59	1,08	
	Error típ.	0,22	0,50	0,57	0,33	0,23	
		p<0,001					p *= 0.065

p: Significancia estadística obtenida mediante ANOVA factorial para medidas repetidas
 p*: Significancia de la interacción o acción conjunta del tiempo y los tratamientos

Como los datos de genotoxicidad (MNPCE/1000PCE) se ajustan a la distribución normal ($p < 0,001$, para las 30 y 40h), para su análisis se aplicó una prueba de análisis de varianza para medidas repetidas. El resultado de la ANOVA indica que, en la frecuencia de MNPCE/1000PCE, influyen tanto el tiempo ($f = 0,085$; $p < 0,05$), como los tratamientos (veneno escorpiónico y controles) ($f = 9,33$; $p < 0,001$). La interacción o efecto combinado entre tratamientos y tiempo, no fue significativo ($f = 1,70$; $p > 0,05$), sin embargo, Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis teniendo en cuenta a los tratamientos como variable de agrupación, se observa una diferencia significativa en la genotoxicidad 30 y 40h después de aplicado el tratamiento ($f = 10,99$; $p < 0,001$ y $f = 8,52$; $p < 0,001$, respectivamente), esto, corroborado también por el análisis de Turkey para subconjuntos homogéneos.

Como se observa en la figura 14, el control positivo (ciclofosfamida), causa genotoxicidad en los eritrocitos de sangre periférica de ratón, expresándose ese daño a partir de las 30h después de la administración del tratamiento, y manteniéndose hasta las 40h, donde la dosis más alta administrada de veneno (37.31 mg/Kg), se expresa también como significativamente genotóxica. Después de las 50h, no hay diferencias entre los tratamientos con respecto al tiempo.

Figura 14. Índice de genotoxicidad para cada tratamiento, expresado en el número de micronúcleos en 1000 eritrocitos policromáticos (PCE) a lo largo del tiempo.



9. DISCUSIONES

9.1. EFECTO TÓXICO

9.1.1. *Dosis letal 50 (DL₅₀)*

La Dosis letal establecida en este estudio para el veneno de *C. margaritatus* fue de 46.63 µg/g, comparada a la reportada por Guerrero 2002 (42.83 µg/g). Esta diferencia que puede atribuirse a la edad y peso de los animales utilizados en el procedimiento, pues para la reportada por Guerrero 2002, se trataron ratones de un peso promedio de 20 g, mientras que para este estudio, los ratones utilizados fueron machos juveniles, de 9 semanas de edad, con un desarrollo sexual completo, y con un peso promedio de 35 g.

La muerte de los animales de experimentación durante el procedimiento de la DL₅₀ se produjo al parecer, como consecuencia del incremento de la tasa de latidos del corazón, dificultad para respirar y parálisis completa observada principalmente en las extremidades, todas estas causadas por el veneno escorpiónico, síntomas coherentes con los reportados por Zare *et al* 2007 en su estudio sobre las manifestaciones clínicas y bioquímicas producidas por el veneno del escorpión *Hemiscorpius lepturus* (Zare Mirakabbadi et al., 2007).

9.1.2. *Signos locales y sistémicos de envenenamiento*

Después de la administración del veneno, los ratones experimentales empezaron a presentar signos de envenenamiento como incremento en el ritmo respiratorio, salivación, taquipnea, piloerección, entre otros (Tabla 6). La toxicidad traducida en las manifestaciones locales y sistémicas de envenenamiento por *C. margaritatus* es debida al alto contenido de neurotoxinas en el veneno, con acción no enzimática, de las que se ha demostrado afectan la permeabilidad de las células excitables. Estas neurotoxinas actúan en distintos canales iónicos como los de sodio, potasio, cloro y calcio que aumentan la liberación de catecolaminas logrando la estimulación del sistema nervioso autónomo despolarizando las membranas axonales y por lo tanto sobre estimulando varios órganos, entre ellos corazón, intestino y tejidos vasculares (Bertazzi et al., 2005; Zare Mirakabbadi et

al., 2007). Los signos y síntomas de envenenamiento que fueron observados durante el proceso de DL₅₀ se aparecieron rápidamente después de cinco minutos de la administración del tratamiento, lo que también demuestra que el veneno es de rápida reabsorción, distribución y eliminación, indicando esto, para algunos autores, un caso de extrema urgencia, pues, si el veneno tiene igual comportamiento en humanos el tratamiento debiera ser lo más oportuno posible (Krifi MN et al., 2001; Otero, 2002).

Los síntomas de envenenamiento que se presentaron en un porcentaje del 100% fueron sialorrea, taquipnea y disnea, todas ellas se dieron de forma notable, y marcaron las etapas más críticas del envenenamiento. De la misma manera la pérdida de equilibrio equivalió al 92.3% y se caracterizó por la sobreposición de las patas delanteras al caminar, y el desplazamiento abrupto hacia los lados. El temblor y la piloerección se presentaron en un 61.5 y 53.8 % respectivamente. El priapismo se presentó en el 46,2% de los animales y en todos ellos apareció 15 minutos después del tratamiento. Una característica que presentaron el 46.2% de los ratones, fue un notable descontrol en la excreción, pues orinaban y defecaban en intervalos de tiempo muy cortos, y algunos llegaron a presentar heces acuosas, la somnolencia caracterizada por el cierre de los párpados y el decaimiento de la cabeza se presentó en el 38% de los animales. Por último el 23.1% de los animales presentó convulsiones, lo que indica que se presentó en la mitad de los animales que murieron (46.2%).

9.2. BIOMARCADOR DE MICRONÚCLEOS

La prueba de micronúcleos realizado *in-vivo* es especialmente relevante para la evaluación del riesgo de cito y genotoxicidad en aquellos casos donde se requiere considerar factores tan relevantes como el metabolismo, la farmacocinética y los procesos de reparación del ADN propios de los organismos (Krishna and Hayashi, 2000); si bien, dichos factores pueden variar según la especie y el tejido considerado, se debe recordar que los ratones comparten gran similitud con los humanos en muchos aspectos, principalmente los pertinentes al metabolismo de sustancias xenobióticas y procesos de reparación del ADN (Hayashi, *et al.*, 1994) por lo que el desarrollo de esta prueba *in-vivo* es un valioso aporte en el conocimiento del comportamiento de venenos escorpiónicos en los organismos.

Dado que el envenenamiento escorpiónico en humanos es un accidente que se da naturalmente en ciertos lugares de alta exposición, y del cual existe muy poca

información científica sobre sus consecuencias a largo plazo (Krifi et al., 2005), se aplicó la prueba de micronúcleos *in-vivo*, la más pertinente en el caso de observar las consecuencias a largo plazo del envenenamiento, y en ese mismo sentido, establecer si el veneno escorpiónico o sus derivados metabólicos interactúan con las células y el material genético, desestabilizándolo de alguna manera.

9.2.1. Efecto citotóxico

El efecto citotóxico causado por el veneno escorpiónico a las células de sangre periférica de ratón fue observado en la disminución del número de eritrocitos policromáticos en un total de 1000 células totales, con respecto al grupo control negativo (solución salina). La literatura muestra varias explicaciones ante la disminución de la cantidad de eritrocitos policromáticos, donde el análisis estadístico estableció que las tres dosis de veneno inyectado (9.32 mg/Kg, 18.65 mg/Kg y 37.31 mg/Kg) fueron citotóxicas en diferentes proporciones, siendo más citotóxicas la dosis media y baja que la dosis alta como se observa en la figura 12.

Es importante analizar el ciclo celular de estas células, el tipo celular evaluado, y las características del agente que se evalúa. Como se vio en el marco teórico (figura 5) (Abramsson-Zetterberg et al., 1996) los eritrocitos jóvenes micronucleados (MNPCE) en los cuales el tratamiento no ha alterado el ciclo celular, aparecen en sangre periférica de ratón después de las 20h de administrado éste, y alcanzan su máxima frecuencia cerca de las 40h, hasta agotar su vida joven y convertirse en NCE después de 55 h.. Si observamos la frecuencia de MNPCE/1000PCE (figura 14), apreciamos que los tiempo en que las frecuencias de MN son más altas coinciden con los citados anteriormente, por lo tanto el veneno del escorpión *C. margaritatus* no estaría causando un retraso en el ciclo celular y esta no sería la causa de la disminución en la frecuencia de PCE aquí reportada.

Por otro lado, los eritrocitos como la mayoría de las células eucariotas superiores tienen la capacidad de auto-destrucción por la activación de un programa de suicidio celular intrínseco (apoptosis) cuando ya no son necesarias, o se han dañado seriamente por estímulos internos o externos. Los reportes existentes sobre la acción apoptótica de otros venenos escorpiónicos (Meki et al., 2003; Omran, 2003; Pipelzadeh et al., 2006; Wang and Ji, 2005) sugiere, que la causa principal de la disminución en el tiempo del número de eritrocitos policromáticos con respecto a las dosis media y baja administradas, responde a la activación de

señales apoptóticas al entrar el veneno en contacto con la célula durante el proceso de diferenciación celular ocurrido en la médula ósea.

Si suponemos que la alta citotoxicidad encontrada en la dosis media y baja por el veneno del escorpión *C. margaritatus* obedece en primera instancia a una alta fagocitosis de eritrocitos en sangre periférica, y por eso su significativa disminución, estaríamos proponiendo que el veneno escorpiónico actúa directamente sobre los canales de calcio ayudando de forma prematura a que el proceso de apoptosis se lleve a cabo.

Como ya se había mencionado anteriormente el veneno escorpiónico es rico en componentes que afectan las membranas celulares voltaje dependientes, siendo capaces de desestabilizar la polaridad de las membranas celulares y hacer que los canales de distintos iones vitales para su normal funcionamiento sufran desequilibrio. El calcio, es un elemento crucial para la regulación, la función, la programación de muerte y remoción de los eritrocitos del sistema circulatorio, como pudimos observar en el marco teórico existe valiosa información que registra la interacción de las toxinas escorpiónicas con los canales de calcio, específicamente con los receptores de rianodina a los que se acoplan desencadenando un desequilibrio en el contenido intracelular de calcio, al contribuir a la liberación de este desde el retículo endoplasmático (Hermle et al., 2006; Kuniyasu et al., 1999; Valdivia et al., 1991; Valdivia et al., 1992). Como en otras células, el calcio intracelular libre en el eritrocito es regulado en forma muy precisa por un complejo sistema de homeostasis del calcio. Particularmente en los eritrocitos esta homeostasis requiere una regulación estrecha, debido a que pequeños incrementos en esta concentración citoplasmática y la activación de la liberación de los canales de calcio incorporados bilateralmente en la membrana lipídica de calcio ocasionan cambios que incluyen su muerte programada (Quintanar-Escorza and Salinas, 2007; Valdivia et al., 1991; Valdivia et al., 1992). Hacia el final del proceso la externalización de fosfatidilserina permite que los eritrocitos sean identificados por macrófagos circulantes o por macrófagos del sistema reticuloendotelial que inician respuestas inmunológicas y terminan el proceso apoptótico del eritrocito afectado.

El incremento de la actividad del calcio citosólico, a su vez estimula la escramblasa que expulsa fosfatidilserina en la superficie celular, favoreciendo el reconocimiento de los eritrocitos por macrófagos que poseen receptores específicos de fosfatidilserina, de forma rápida (Fadok et al., 2000; Henson et al., 2001; Hermle et al., 2006); y así limita la vida útil de la célula infectada. De manera

muy importante, la apoptosis puede servir para prevenir la hemólisis (Lang et al., 2005a), dato importante pues concuerda con la bibliografía existente para venenos escorpiónicos de la familia Butidae que en ningún caso reportan hemólisis.

9.2.2. Efecto genotóxico

Dado que el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, se han intensificado los estudios de diferentes compuestos, físicos, químicos o biológicos, que puedan tener esa consecuencia a largo plazo. En Colombia el problema del escorpionismo es más frecuente de lo que se cree, por eso fue importante asociar estas problemáticas, y determinar de manera eficiente, si existe la posibilidad de que el veneno escorpiónico o sus derivados metabólicos, interactúen con el ADN alterándolo, causando mutaciones que sean a largo plazo, las causantes del desarrollo del algún tipo de cáncer. La prueba de micronúcleos como biomarcador de efecto, marca un antecedente en el diagnóstico clínico, al observar el potencial genotóxico de la dosis más alta administrada de veneno, permitiendo elaborar una estrategia de prevención anticipadamente.

El propósito de la prueba de micronúcleos es identificar sustancias que causen la formación de micronúcleos como resultado de la formación de fragmentos cromosómicos (clastogenicidad) o, de cromosomas enteros (aneugenicidad) rezagados; no incluidos en las células hijas durante el proceso de anafase. Estudios en toxicología genética desarrollados con la prueba de Micronúcleos confirman que tanto en pruebas *in-vitro* como *in-vivo* se muestra el efecto causado por diferentes agentes en la información genética, y en consecuencia el riesgo de desarrollo de cáncer para los organismos, incluyendo los humanos, como consecuencia del incremento significativo de la tasa de micronúcleos, con respecto al grupo control. Además, este tipo de daños están asociados con la aparición y/o progresión de tumores, y con problemas reproductivos y de desarrollo (Krishna and Hayashi, 2000).

La ciclofosfamida (CP) disuelta en solución salina NaCl (0.9 %) fue usada como control positivo durante este estudio debido a que es un agente alquilante que induce gran variedad de cambios en el material genético incluyendo micronúcleos (IARC, 1981). La ciclofosfamida no es genotóxica por sí misma, pero por procesos de biotransformación metabólica se convierte en un conjunto de metabolitos con complejas funciones oxidadas (Colvin and Chabner, 1990; Moore et al., 1995); como se observa en la figura 14 la ciclofosfamida es altamente genotóxica entre

las 30 y las 40 horas, y difiere significativamente de la dosis alta, sin embargo las dos son significativamente genotóxicas con respecto al grupo control negativo y las dosis baja y media. La solución salina por otro lado, por ser altamente afín con los tejidos animales, fue el mejor vehículo para todos los tratamientos, y por lo tanto se utilizó como control negativo, por no existir ningún reporte que establezca un potencial tóxico en ella.

Para que un micronúcleo se exprese, se requiere que por lo menos haya transcurrido un ciclo de división celular, cuando los eritrocitos son tomados en sangre periférica, estos ya tienen expresado el daño que fue causado en médula ósea por la interacción de las toxinas con el material genético de los animales experimentales. El objetivo de realizar varios tiempo de muestreo tuvo varias razones, en primer lugar, observar si el ciclo celular estaba siendo afectado de acuerdo a los referentes bibliográfico basados en la frecuencia de MN a diferentes tiempo post tratamiento, en segundo lugar, observar y analizar el potencial genotóxico de tres diferentes concentraciones de veneno escorpiónico, y en tercer lugar realizar una curva por la cual se identifique de manera certera el mejor tiempo de muestreo como base para futuras investigaciones en el campo.

Para los daños cromosómicos originados por la exposición aguda al veneno del escorpión *C. margaritatus*, se analizaron los micronúcleos presentes en eritrocitos policromáticos (PCE); el aumento de la frecuencia de micronúcleos en los PCE de animales tratados indica la existencia de lesiones cromosómicas inducidas, no reparadas y expresadas como alteraciones cromosómicas, que en sangre periférica se observan como micronúcleos. Dado que por medio de la prueba de micronúcleos no se puede identificar si estos son causados por cromosomas enteros o por fragmentos, es importante clarificar que si fuera por cromosomas enteros la causa sería que el veneno o sus derivados actúan reaccionando con la tubulina, alterando la organización y dinámica microtubular, trastornando la formación del huso mitótico y como consecuencia dando lugar a cromosomas rezagados. Los micronúcleos inducidos así son formados por cromosomas que quedaron aislados durante la mitosis (Morales-Ramírez et al., 2004).

El análisis de la cinética de la inducción de MN hace posible obtener valiosa información sobre el comportamiento del veneno dentro del organismo, por lo que resalta la importancia del desarrollo de esta prueba *in-vivo*. La tasa genotóxica puede ser determinada mas adecuadamente basándose en el área bajo la curva de MN versus el tiempo, o en la máxima inducción de MN. Este tipo de estudios *in-vivo* sirven para inferir los mecanismos de genotoxicidad y citotoxicidad, y la

acción de los agentes que inducen micronúcleos así como su farmacocinética (Morales-Ramirez et al., 2004). Los resultados obtenidos indican que los eritrocitos de sangre periférica de ratón tratados intraperitonealmente no exhiben incrementos significativos en la incidencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) en las dosis baja y media con respecto al grupo control, mientras que la dosis alta muestra un incremento significativo observado principalmente 40h después del tratamiento.

A pesar de no alcanzar la genotoxicidad mostrada por la ciclofosfamida (control positivo), una concentración de 37.31 mg/Kg de veneno escorpiónico podría ser una cantidad de veneno alarmante por sus posibles consecuencias a largo plazo en el desarrollo de cáncer, debido a la alta frecuencia de daños cromosómicos que de no ser reparados podrían fijarse al material genético y causar mutaciones; respecto a lo anterior, sería importante establecer un promedio en cuanto a la cantidad de veneno y la concentración de éste en una sola picadura, y por lo tanto conocer si es posible que un individuo este expuesto a que la concentración mencionada.

10. CONCLUSIONES

La concentración de proteínas del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* equivale a 93.8 mg/mL.

La Dosis Letal 50 (DL50), establecida por el método de Beccari modificado por Molinengo, para el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* del Valle del Patía en ratones *Albino suizo* maduros es de 46.64 µg/g.

Los signos locales y sistémicos de envenenamiento, expuestos en el presente estudio, reafirman el carácter neurotóxico de los venenos escorpiónicos, y establecen parámetros de comportamiento útiles para el diagnóstico médico.

El índice de citotoxicidad determinado por la disminución de los eritrocitos policromáticos con respecto al número de células totales evaluado en eritrocitos de sangre periférica de ratón, demuestra una disminución significativa en las dosis media y baja con respecto al tiempo, y difieren significativamente del grupo control negativo, todo esto explicado por la apoptosis sufrida por los eritrocitos que al exponerse al veneno escorpiónico, sufren cambios importantes en los canales iónicos dependientes del calcio, lo cual altera la señalización celular y provoca su fagocitosis casi inmediata.

El efecto genotóxico observado en eritrocitos policromáticos de sangre periférica de ratón causado por la dosis más alta administrada (37.31 mg/Kg), demuestra que el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* o sus derivados metabólicos interactúan con el material genético induciendo rupturas en el ADN o afectando las fibras acromáticas, desencadenando la pérdida del material genético el cual se observó en el incremento significativo de micronúcleos en el tiempo, especialmente a las 40 horas después del tratamiento (tiempo de máxima frecuencia).

Las características genotóxicas presentadas por la dosis más alta administrada de veneno escorpiónico, tiene un impacto social importante, dado que muestra un precedente sobre los posibles problemas de desarrollo de cáncer, ocasionado por la interacción de éste con el ADN y la posible fijación de mutaciones; de manera

importante entonces, se hace un llamado a las entidades administradoras de salud junto con la comunidad médica, para que se desarrollen campañas de prevención y manejo del escorpiónismo, especialmente en las poblaciones más afectadas con este tipo de problemas.

El presente trabajo aporta material importante sobre el comportamiento del veneno escorpiónico en organismos vivos, y deja un importante precedente para futuras investigaciones que puedan encaminarse, como se mencionó en varias ocasiones, a explorar las características citotóxicas del veneno en células cancerígenas.

BIBLIOGRAFIA

- Abramsson-Zetterberg, L., Zetterberg, G., and Grawé, J. (1996). The time-course of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **350**, 349-358.
- Aiello, S. E., Mays, A., and Amstutz, H. E. (2007). "El manual Merck de veterinaria," Sexta/Ed. Océano.
- Angosto, M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. pp. 36.
- Barão, A. A. S., Bellot, R. G., and Dorce, V. A. C. (2008). Developmental effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rat offspring. *Brain Research Bulletin*.
- Barona, J., Otero, R., and Núñez, V. (2004). Aspectos toxicológicos e inmunológicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica* **24**, 42-49.
- Batista, C. V. F., del Pozo, L., Zamudio, F. Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., and Possani, L. D. (2004). Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *Journal of Chromatography B* **803**, 55-66.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., and Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* **511**, 145-178.
- 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., 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.
- Colvin, M., and Chabner, B. A. (1990). *Cancer Chemotherapy*. Philadelphia, Lippincott.
- Conti, A. A., Lippi, D., and Gensini, G. F. (2005). The historical evolution of the concept of apoptosis in rheumatic diseases. *Reumatismo* **57**, 57-61.
- Countryman, P. I., and Heddle, J. A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* **41**, 321-32.
- Das Gupta, S., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J. R., 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.
- Daugas, E., Cande, C., and Kroemer, G. (2001). Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. B., and Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85-90.
- Favreau, P., Menin, L., Michalet, S., Perret, F., Cheneval, O., Stöcklin, M., Bulet, P., and Stöcklin, R. (2006). Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon* **47**, 676-687.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., and Bonassi, S. (1999). The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **428**, 271-283.
- Fenech, M., and Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* **147**, 29-36.
- 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. *Innovación y Ciencia* **4**, 26-33.

- Gómez, J. P., and Otero, R. (2007). Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* **25**, 50-60.
- Gómez, J. P., Otero, R., Rangel, V. N., Córdoba, M. M. S., Cadavid, A. D., and Sandino, M. P. V. (2002). Aspectos toxicológicos, 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-Vargas (2008). Análise Proteômica Parcial da Peçonha do Escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841), Universidade de Brasília.
- Guerrero-Vargas, J., Ayerbe, S., Rada-Mendoza, M., Vélez, P., and D'suze, G. (2003). Estandarización de la extracción del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (Scorpionida: Buthidae) del municipio de El Patía, departamento del Cauca y determinación de su DL-50. pp. 17-19.
- Guerrero-Vargas, J. A., Da Silva, M., and De Souza, M. (2008). Aplicación biotecnológica de la toxicología: la importancia del veneno de escorpiones y la secreción cutánea de anuros. *Innovación y Ciencia*.
- Guerrero, J. (2002). Aislamiento, Purificación y Evaluación de Neurotoxinas del Escorpión *Centruroides margaritatus* (Buthidae) del Municipio del Patía. Departamento del Cauca, Colombia.
- Henson, P. M., Bratton, D. L., and Fadok, V. A. (2001). The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 627-633.
- Hermle, T., Shumilina, E., Attanasio, P., Akel, A., Kempe, D. S., Lang, P. A., Podolski, M., Gatz, S., Bachmann, R., and Bachmann, C. (2006). Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes. *American Journal of Physiology- Cell Physiology* **291**, C710.
- IARC (1981). Cyclophosphamide.
- Israels, L. G., and Israels, E. D. (1999). Apoptosis. *The Oncologist* **4**, 332.

- Krifi MN, M. K., M, A., and M, E. A. (2001). Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model en Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *Toxicon* **39**, 1317-1326.
- Krifi, M. N., Savin, S., Debray, M., Bon, C., El Ayeb, M., and Choumet, V. (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.
- Kuniyasu, A., Kawano, S., Hirayama, Y., Ji, Y. H., Xu, K., Ohkura, M., Furukawa, K., Ohizumi, Y., Hiraoka, M., and Nakayama, H. (1999). A new scorpion toxin (BmK-PL) stimulates Ca²⁺-release channel activity of the skeletal-muscle ryanodine receptor by an indirect mechanism. *Biochemical Journal* **339**, 343.
- Lang, F., Lang, K. S., Lang, P. A., Huber, S. M., and Wieder, T. (2006). Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiologica* **187**, 191-198.
- Lang, K., Lang, P., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S., and Lang, F. (2005a). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* **15**, 195-202.
- Lang, K. S., Duranton, C., Poehlmann, H., Myssina, S., Bauer, C., Lang, F., Wieder, T., and Huber, S. M. (2003). Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death & Differentiation* **10**, 249-256.
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., Lang, F., Wieder, T., and Huber, S. M. (2005b). PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death & Differentiation* **12**, 415-428.
- Lodish, H. F. (2003). "Molecular cell biology," WH Freeman.
- Loret, E., and Hammock, B. (2001). Structure and neurotoxicity of scorpion toxins. *Scorpion Biology and Research*. Oxford: Oxford University Press.
- Lourenço, W. (1990). Modèles de stratégie reproductrice chez les scorpions; corrélation avec des centres d'endémisme dans la région néotropicale.
- Lourenço, W. (1992). Biogéographie évolutive, écologie et les strategies biodemographiques chez les scorpions neotropicaux. **67**, 171-190.

- Lourenco, W., and Von Eickstedt, R. (2003). Escorpiones de importancia médica. Lyonel, and Esther. (1999). Apoptosis. *Stem Cell* **17**.
- Mao, X., Cao, Z., Yin, S., Ma, Y., Wu, Y., and Li, W. (2007). Cloning and characterization of BmK86, a novel K⁺-channel blocker from scorpion venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **360**, 728-734.
- Marshall, P. N. (1978). Reticulation, polychromasia and stippling of erythrocytes. *Microsc Acta* **81**, 89-106.
- 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.
- Moore, F. R., Urda, G. A., Krishna, G., and Theiss, J. C. (1995). An in vivo/in vitro method for assessing micronucleus and chromosome aberration induction in rat bone marrow and spleen 1. Studies with cyclophosphamide. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **335**, 191-199.
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T., and Cruz-Vallejo, V. (2004). Kinetics of micronucleated polychromatic erythrocyte (MN-PCE) induction in vivo by aneuploidogens. *Mut. Res.-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **565**, 79-87.
- Morales-Ramirez, P., Vallarino-Kelly, T., Cruz-Vallejo, V. L., Lopez-Iturbe, R., and Alvaro-Delgadillo, H. (2004). In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. *Mutagenesis* **19**, 207-213.
- Murillo, R., and Gamboa, O. (2006). Investigación y situación del cáncer en Colombia. *Innovación y Ciencias XVII (1)*, 39-47.
- Olamendi-Portugal, T., Inés García, B., López-González, I., Van Der Walt, J., Dyason, K., Ulens, C., Tytgat, J., Felix, R., Darszon, A., and Possani, L. D. (2002). Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **299**, 562-568.
- 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. (2002). Seroterapia Antivenenosa. Ventajas del uso de antivenenos del tipo IgG, F(ab')₂ o Fab en picaduras de escorpiones y mordeduras de

serpientes en Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin, Gómez et al 2002. *Pediatría* **37**, 8-16.

- Otero, R., Navió, 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.
- 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.
- Polis, G. A. (2001). Population and community ecology of desert scorpions. *Scorpion Biology and Research* (P. Brownell & G. Polis, eds.). Oxford University Press, Oxford, 302–316.
- Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., and Becerril, B. (2000). Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* **82**, 861-868.
- Quintanar-Escorza, M. A., González-Martínez, M. T., Navarro, L., Maldonado, M., Arévalo, B., and Calderón-Salinas, J. V. (2007). Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocytes of lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* **220**, 1-8.
- Quintanar-Escorza, M. A., and Salinas, J. V. C. (2006). Eriptosis, La Apoptosis del Eritrocito. *REB*, 85-89.
- Quintanar-Escorza, M. A., and Salinas, J. V. C. (2007). Calcio Y Eritrocitos. *REB*, 3-10.
- Rodríguez de la Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., and Possani, L. D. (2003). Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends in Pharmacological Sciences* **24**, 222-227.

- Rooney, D. E. (2001). "Human Cytogenetics: A Practical Approach," Oxford University Press.
- Saris, N. E. L., and Carafoli, E. (2005). A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Moscow)* **70**, 187-194.
- Sevcik, C. (1987). LD 50 Determination: objections to the method fo Beccari as modified by Molinengo. *Toxicon(Oxford)* **25**, 779-783.
- Sissom, W. D., and Lourenco, W. R. (1987). The Genus *Centruroides* in South America (Scorpiones, Buthidae). *Journal of Arachnology* **15**, 11-28.
- Soualmia, H., Abroug, F., and Djeridane, Y. (2007). Effect and mechanisms underlying scorpion toxin action from *Androctonus australis garzonii* on atrial natriuretic peptide in rat atria: An in vitro study. *Peptides*.
- Tamassone, R., Vainstub, V., and Peirano, S. (2003). Envenenamiento grave por escorpión en Pediatría. *Arch. argent. pediatr* **101**, 392-397.
- Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M. F., van der Walt, J. J., and Possani, L. D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Sciences* **20**, 444-447.
- 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., Dávila, S., Licea, A., Corona, M., Zamudio, F. Z., García-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.
- Valdivia, H. H., Fuentes, O., El-Hayek, R., Morrissette, J., and Coronado, R. (1991). Activation of the ryanodine receptor Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 19135-19138.
- Valdivia, H. H., Kirby, M. S., Lederer, W. J., and Coronado, R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 12185-12189.

- 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.
- 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.