



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**EVALUACION DE LA DIVERSIDAD ANTIGÉNICA DE VENENOS DE  
ESCORPIONES DE IMPORTANCIA MÉDICA EN VENEZUELA  
EMPLEANDO TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS**

**Autores:**

Br. Aranguren, Ámbar

Br. Calzadilla Néstor

**Tutor:**

Dr. Adolfo Borges

Caracas, Enero 2014



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**EVALUACION DE LA DIVERSIDAD ANTIGÉNICA DE VENENOS DE  
ESCORPIONES DE IMPORTANCIA MÉDICA EN VENEZUELA  
EMPLEANDO TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS**

**Trabajo que se presenta para optar al título de Licenciado en Bioanálisis**

**Autores:**

Br. Aranguren, Ámbar

Br. Calzadilla Néstor

**Tutor:**

Dr. Adolfo Borges

Caracas, Enero 2014



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
CÁTEDRA DE PASANTÍAS HOSPITALARIAS



## EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD ANTIGÉNICA DE VENENOS DE ESCORPIONES DEL IMPORTANCIA MÉDICA EN VENEZUELA EMPLEANDO TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS.

Autor (es): Aranguren Ambar, Calzadilla Néstor

Tutor(a): Dr. Borges Adolfo

Año: 2014

### RESUMEN

En Venezuela, varias especies del género *Tityus* son responsables de la mayoría de los accidentes graves y/o fatales por escorpionismo que se han producido en cuatro regiones endémicas del país. El antiveneno disponible es producido contra *Tityus discrepans*, especie endémica de la región norte costera. Estos anticuerpos neutralizan solo parcialmente los venenos de especies de la Región Andina y de Perijá, por lo que se ha sugerido la existencia de un polimorfismo antigénico entre las toxinas de las especies venezolanas. En este trabajo se evaluó la diversidad antigénica de diferentes venenos del género *Tityus* con la finalidad de contribuir con la delimitación del país en áreas de reactividad hacia el antiveneno anti-*T. discrepans*.

**Metodología:** Se analizaron los venenos de *T. zulianus* (Andes), *T. falconensis* (Macizo Coriano), *T. discrepans* (centro-norte), *T. perijanensis* (Perijá), *T. gonzalespongai* y *T. tenuicauda* (oriente), evaluando su reactividad frente al antídoto comercial empleando métodos inmunoquímicos (“Inmunoblot” y ELISA).

**Resultados:** Pruebas de SDS-PAGE indicaron la presencia de componentes de masa molecular elevada. En el ensayo de “inmunoblot” los anticuerpos anti-*T. discrepans* produjeron un reconocimiento diferencial de los componentes más abundantes de estos venenos (60-95%) que son las neurotoxinas de baja masa molecular (alrededor de 6.5 kDa), cuya intensidad de reconocimiento (por densitometría) no superó el 50% de la intensidad de la fracción equivalente en *T. discrepans*: *T. zulianus* ( $46 \pm 1,3\%$ ), *T. falconensis* ( $36 \pm 2,6\%$ ), *T. perijanensis* ( $27 \pm 2,3\%$ ), *T. tenuicauda* ( $8,2 \pm 1,8\%$ ) y *T. gonzalespongai* ( $9,1 \pm 0,9\%$ ). Ensayos de ELISA en donde se adsorbieron 100 ng de los distintos venenos, mostraron, a una dilución 1/2400 del antiveneno, una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en la reactividad con respecto a *T. discrepans* en el orden: *T. zulianus* > *T. tenuicauda* = *T. gonzalespongai* > *T. falconensis* > *T. perijanensis*.

Ensayos de ELISA de competencia diseñados para mostrar la reactividad de los venenos en condiciones nativas corroboraron las diferencias en reactividad observadas en los ensayos previos. **Conclusiones:** Los resultados de este trabajo corroboran evidencias previas que sugieren diferencias cuantitativas y/o cualitativas entre los epítopes antigénicos de las toxinas de los venenos analizados, señalando que la reactividad hacia el único antiveneno disponible es especie-específica, lo cual demanda la preparación de antídotos de más amplio espectro.

**Palabras claves:** escorpionismo, venenos, reactividad, diversidad antigénica.

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	v
<b>Agradecimientos</b> .....	vii
<b>Resumen</b> .....	viii
<b>Lista de figuras</b> .....	x
<b>Lista de tablas</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPITULO I: EL PROBLEMA</b>	
<b>Planteamiento del problema</b> .....	4
<b>Objetivos</b> .....	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
<b>Justificación de la investigación</b> .....	8
<b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO</b>	
<b>Antecedentes</b> .....	10
<b>Bases teóricas</b> .....	11
Los escorpiones: morfología y sistemática.....	13
La composición del veneno de los escorpiones y el síndrome derivado de su envenenamiento.....	14
Toxinas presentes en los venenos de escorpión.....	16
El polimorfismo de las toxinas escorpiónicas y la terapia basada en sueros inmunes .....	
Escorpionismo en Venezuela .....	20
Diferencias funcionales e inmunológicas entre venenos de escorpiones de importancia médica en Venezuela.....	23

### CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

<b>Tipo de población</b> .....	27
<b>Población</b> .....	27
Obtención de especímenes.....	27
Clasificación de especímenes.....	27
<b>Muestra</b> .....	28
Extracción del veneno de escorpión.....	28
<b>Antiveneno</b> .....	29
<b>Plan de trabajo</b> .....	29
<b>Materiales y métodos</b> .....	29
<b>Determinación de proteínas (Método Directo)</b> .....	29
<b>Métodos electroforéticos</b> .....	30
Electroforesis.....	30
Electrotransferencia.....	31
<b>Inmunodetección</b> .....	32
Inmunoblot.....	32
ELISA de titulación.....	32
ELISA de competencia.....	33
<b>Análisis Densitométrico</b> .....	34
<b>Análisis Estadístico</b> .....	35

### CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Resultados</b> .....	38
Fraccionamiento de los venenos mediante SDS-PAGE...	38
Inmunodetección de las proteínas de los venenos de las especies en estudios reactivas hacia las inmunoglobulinas anti- <i>T. discrepans</i> .....	41
<b>Discusión</b> .....	46

**CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

<b>Conclusiones</b> .....	52
<b>Recomendaciones</b> .....	53
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Morfología general de los escorpiones. Vista dorso del animal.....	14
2. Estructura tridimensional de toxinas escorpiónicas.....	17
3. Distribución de <i>Rhopalurus laticauda</i> en Venezuela.....	20
4. Distribución geográfica de algunas de las especies venezolanas del género <i>Tityus</i> .....	22
5. Áreas endémicas de envenenamiento por escorpión del Género <i>Tityus</i> .....	22
6. Mapa de ubicación regional de las especies de escorpiones en estudio.....	37
7. Electroforesis de las proteínas de venenos de escorpiones del género <i>Tityus</i> en SDS-poliacrilamida (15%) coloreado con Azul de Comassie.....	39
8. Intensidad relativa (en relación a las proteínas totales fraccionadas mediante SDS-PAGE) de las bandas correspondientes a las proteínas de baja masa molecular de los venenos de escorpiones estudiados, evaluada mediante densitometría....	40
9. Curva de calibración para la migración electroforética de marcadores de masa molecular mostrada en la Figura 7 ...	43



10. Ensayo de inmunodetección en papel de nitrocelulosa o “inmunoblot” al enfrentar los venenos de las diferentes especies en estudio contra el antiveneno anti-*T. discrepans* .....41
11. Análisis densitométrico de la reactividad obtenida por la técnica de “Western Blot” al enfrentar venenos de diferentes especies de escorpiones del género *Tityus* contra el antiveneno anti-*T. discrepans*, tomando en cuenta para el análisis las bandas de baja masa molecular que aparecen en la Figura 10..... 42
12. Ensayo de ELISA de titulación para conocer la reactividad de los venenos totales (100 ng de proteína/pozo) en estudio hacia diluciones seriadas del antiveneno anti-*T. discrepans*.....43
13. ELISA de inhibición de los venenos totales de los escorpiones estudiados a diferentes concentraciones al reaccionar con la concentración óptima (1/2400) del antiveneno anti *T. discrepans*.....44
14. Mapa de la República Bolivariana de Venezuela mostrando las provincias toxinológicas sugeridas por Borges y col. (2010)<sup>22</sup> para la escorpiofauna de importancia médica en el país, tomando en consideración afinidad filogenética, reactividad antigénica y manifestaciones clínicas..... 51

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>1.</b> Masas moleculares de las proteínas de menor migración electroforética en cada uno de los venenos de las especies estudiadas.....	40

## INTRODUCCIÓN

*Tityus* es el género más especioso de escorpiones, con casi 170 especies conocidas. El género es exclusivamente Neotropical, con especies que habitan desde Costa Rica y las Antillas Menores además de Puerto Rico hasta el norte de Argentina. *Tityus* alcanza su mayor diversidad en el noroeste de América del Sur, con aproximadamente la mitad de las especies descritas en Colombia, Ecuador y Venezuela. Las especies de este género con frecuencia presentan hábitos domiciliarios. La co-distribución con los seres humanos, junto a la toxicidad de las especies de este género explica el hecho de que los casos más graves y letales de envenenamiento por escorpión en América del Sur y el Caribe se deben a especies pertenecientes a este género, incluyendo los principales sistemas montañosos de Venezuela, en donde se concentra la mayoría de los centros urbanos del país<sup>1</sup>.

El diseño del muestreo de esta investigación fue escogido incluyendo especies que son tóxicas para el ser humano y que habitan las cuatro macro regiones endémicas de escorpionismo (como se denomina al accidente derivado del encuentro con estos artrópodos) en el país, incluidas en las provincias toxinológicas propuestas por Borges y col. (2010)<sup>22</sup>. Los antivenenos específicos siguen siendo la única medida terapéutica eficaz para el tratamiento de envenenamiento por escorpión a nivel mundial. Las manifestaciones clínicas que se suceden a raíz del envenenamiento incluyen la exacerbación funcional de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático, lo cual produce la liberación masiva de neurotransmisores colinérgicos, catecolaminérgicos y peptidérgicos, alterando numerosos mecanismos de homeostasis en el organismo. Los estudios anteriores han reconocido que las especies de *Tityus* son altamente diversas desde el punto de la antigenicidad de sus componentes del veneno. Los componentes neurotóxicos del veneno son proteínas de bajo peso molecular con alta afinidad hacia sus receptores farmacológicos en los

tejidos excitables y células inmunes, que necesitan ser neutralizados, rápidamente en los seres humanos envenenados por *Tityus* spp<sup>1</sup>.

Las autoridades de salud, abocadas a la fabricación de antivenenos eficaces para el tratamiento de envenenamientos por fauna tóxica, como las serpientes, reconocen el problema de que la neutralización de los componentes responsables de la letalidad está supeditada, entre otros factores, a la procedencia geográfica del animal ofensor y a la especificidad de los anticuerpos neutralizantes. En el caso de los escorpiones, la reactividad cruzada antigénica del veneno depende de la especie, y por lo tanto existe la necesidad de catalogar la fauna en términos del reconocimiento antigénico de los veneno por los antivenenos disponibles comercialmente<sup>1</sup>.

Esto se fundamenta en que se han observado diferencias en severidad y en la clínica manifestada por los pacientes entre las diversas especies de *Tityus* en el país, así como en la respuesta al antiveneno disponible, lo cual podría ser consecuencia de la existencia de diferentes toxinas regionales y/o de la abundancia de componentes compartidos entre especies. De hecho, diversos estudios en donde se ha comparado la reactividad frente a anticuerpos anti-*T. discrepans* (la especie prevalente en el centro-norte de Venezuela) de venenos de especies pertenecientes al mismo grupo morfológico, indican que la reactividad cruzada inmunológica será mayor entre las especies que están más estrechamente relacionadas geográfica y genéticamente, indistintamente de su pertenencia a un determinado grupo taxonómico<sup>1</sup>.

Algunos datos sugieren que los venenos de *T. zulianus* (prevalente en la región Andina de Venezuela) y *T. perijanensis* (prevalente en el oeste del estado Zulia y la región fronteriza con Colombia) contienen menores cantidades de las proteínas antigénicamente compartidas con *T. discrepans*, y/o contienen componentes tóxicos diferentes. Se ha determinado que el antiveneno anti-*T. discrepans* neutraliza *in vivo*, sólo parcialmente el efecto tóxico de los venenos de *T. zulianus* y *T. perijanensis*, corroborando otros estudios donde mediante espectrometría de masas se obtuvo que los venenos de *T. zulianus* y *T. discrepans* difieren en composición y actividad

farmacológica. Lo anterior sugiere la existencia de variaciones en la secuencia de los epítopes antigénicos de las toxinas de estas especies, alterando su unión hacia anticuerpos potencialmente neutralizantes.

Una clasificación de especies de *Tityus* representativas de las áreas macroendémicas de escorpionismo en Venezuela basada en el grado de reactividad cruzada de sus venenos podría constituir un criterio adicional a ser tomado en cuenta por las autoridades sanitarias encargadas de adaptar la sueroterapia existente a los requerimientos de cada área en el país<sup>1</sup>.

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA

#### Planteamiento del problema

En Venezuela, la picadura por escorpión es causa de muerte en varias áreas del país. El escorpionismo, como se denomina al accidente derivado del envenenamiento por estos artrópodos, es prevalente en cuatro macroregiones endémicas del país, las cuales coinciden con las áreas de distribución de las especies del género *Tityus*, las cuales provocan casos registrados de envenenamiento severo y de muertes<sup>2,3</sup>.

Estos venenos son mezclas complejas que contienen entre 100 y 200 componentes, incluyendo proteínas de bajo peso molecular que son agonistas o antagonistas específicos de varios canales iónicos, resultando en la des polarización de terminales pre- y post ganglionares del sistema nervioso autonómico, provocando una descarga masiva de neurotransmisores, así como también mediadores de la inflamación, produciéndose, entre otros efectos, pancreatitis y alteraciones cardiovasculares incluyendo el síndrome del “distrés” respiratorio agudo. Las responsables de estas acciones son las toxinas de bajo peso molecular que poseen en su estructura secundaria tres láminas beta plegadas y una alfa hélice entrelazada por tres a cuatro puentes disulfuro<sup>3,5,6</sup>.

Los determinantes antigénicos de estas toxinas están ubicados en las asas que conectan las anteriores estructuras. Si tales determinantes fuesen idénticos entre toxinas de diferente origen, se esperaría la completa reactividad cruzada de las toxinas escorpiónicas frente a diferentes antivenenos. Sin embargo, se ha demostrado que dichas asas son variables en términos de longitud y secuencia aminoacídica, lo que conlleva que algunas toxinas presenten una reactividad diferencial frente a anticuerpos neutralizantes. Esta situación dificulta la preparación de un antisuero con

un espectro de reactividad lo suficientemente amplio como para reconocer simultáneamente epítopes antigénicos en toxinas de diferentes especies<sup>3,7</sup>.

El único suero anti escorpiónico disponible en Venezuela se produce en contra de la especie *T. discrepans*, escorpión prevalente en las zonas montañosas que rodean la capital del país, Caracas, y es muy eficaz en contra de su envenenamiento y para el tratamiento de los casos de picaduras por especies del Oriente del país. Sin embargo, se ha demostrado la incompleta neutralización *in vivo* de veneno de *T. zulianus*, una especie letal que habita la región sur del lago de Maracaibo, por este antiveneno anti-*T. discrepans*. Por otro lado, este antiveneno no pudo rescatar a los ratones desafiados con una dosis letal de veneno de la especie occidental *T. perijanensis*, prevalente en el occidente del estado Zulia. También este suero resultó ineficaz en la neutralización del veneno de *T. pachyurus*, una especie que habita en Antioquia y Tolima, al oeste de Colombia. Así mismo, la dosis efectiva del antiveneno, en el caso de *T. zulianus* (región Andina), que neutraliza los síntomas y signos en niños de corta edad, es superior a la sugerida por el fabricante para la neutralización de los efectos producidos por *T. discrepans*<sup>8,9</sup>. Para el veneno de *T. perijanensis* (región Zuliana) la dosis neutralizante es tres veces aquella obtenida en el caso de *T. discrepans*. Adicional a esto, una prueba de neutralización *in vivo* mostró que el antiveneno anti-*T. discrepans* es dos veces menos eficaz en la neutralización del efecto letal de veneno de *T. zulianus*<sup>10,11</sup>, en comparación con su alta eficacia en el caso de *T. discrepans* en pruebas de envenenamiento experimental. Por ejemplo, los ratones inyectados con 3,77 mg de proteína de antiveneno por ratón resistieron el desafío letal por una cantidad de veneno de *T. discrepans* equivalente a la LD100 mientras que un dosis similar (3,57 mg) no proporcionó protección alguna en el caso de una inyección similar en el caso de *T. zulianus*<sup>3, 10,11</sup>.

Así mismo, se ha observado que existen diferencias entre los cuadros clínicos que manifiestan los pacientes que presentan envenenamiento por escorpión en el país, presentándose un síndrome cardiorespiratorio en el caso de *Tityus zulianus*, mientras que las complicaciones son de naturaleza predominantemente gastrointestinal en el

caso de *Tityus discrepans*. Tomadas en conjunto, estas evidencias sugieren la existencia de variaciones regionales (por especie) en los epítopes neutralizables de toxinas de los venenos del género *Tityus* del norte de América del Sur, e indica que, en paralelo a la diversidad taxonómica de las especies existen diferencias en la actividad, composición, y en la antigenicidad entre las toxinas de especies de importancia médica. Por lo tanto, existe la necesidad de investigar la reactividad antigénica de los venenos de las especies *Tityus* prevalentes en el país, representativas de las diferentes áreas endémicas, frente al antiveneno comercial, con la finalidad de establecer una clasificación por región de prevalencia en Venezuela con base en el grado de reactividad de los venenos hacia el antídoto disponible <sup>2,9</sup>.

En el presente trabajo, se evaluó la reactividad cruzada de los venenos de especies de *Tityus* representativas frente al antiveneno anti-*T. discrepans* mediante el uso de métodos inmunoquímicos, tales como el ensayo de inmunoabsorción mediado por enzimas (ELISA) y la inmunodetección en papel de nitrocelulosa (“Western blot”), los cuales permiten la evaluación del reconocimiento antigénico de cada veneno por anticuerpos potencialmente neutralizantes, con la finalidad de delimitar el país en áreas de reactividad hacia el antídoto disponible. De existir diferencias en los epítopes antigénicos de las toxinas existentes en los venenos evaluados, entonces es probable que varíe el grado de reactividad cruzada que presente cada uno de los venenos analizados frente al antiveneno anti-*T. discrepans*. La aplicación de la anterior metodología igualmente podría resultar de utilidad para el mapeo de la eficiencia del antiveneno en el caso de otras especies del país de potencial importancia médica, pero que aún habitan áreas no pobladas o industrializadas.



## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la diversidad antigénica de venenos de escorpiones de importancia médica en Venezuela empleando técnicas inmunoquímicas con el propósito de delimitar el país en áreas de reactividad frente al antiveneno comercialmente disponible.

### **Objetivos específicos**

1. Cuantificar la reactividad cruzada entre venenos de escorpiones del genero *Tityus* en Venezuela empleando la metodología del ensayo de inmunoadsorción mediado por enzimas (ELISA).
2. Identificar los componentes proteicos de los venenos reconocidos por anticuerpos antiescorpiónicos empleando la metodología de la inmunodetección en papel de nitrocelulosa (“Western Blot”).
3. Sugerir un mapa del país basado en la reactividad antigénica de las especies de escorpiones analizadas con base en el grado de reconocimiento que presentan sus venenos frente al antisuero anti *T. discrepans*.

## Justificación de la investigación

El envenenamiento por escorpiones del género *Tityus* es causa de emergencia pediátrica por lo menos en cinco áreas endémicas localizadas en la franja norte de Venezuela, coincidiendo con los principales sistemas montañosos y sus áreas de piedemonte, donde se ubican las regiones más densamente pobladas del país<sup>3</sup>.

En Venezuela, se han descrito 90 especies, endémicas de las regiones Andina, Macizo Coriano, Cordillera Central y el Macizo Oriental<sup>12</sup>. *T. discrepans*, *T. nororientalis*, *T. isabelceciliae*, *T. perijanensis*, *T. falconensis* y *T. zulianus* han sido identificadas como responsables de casos fatales.<sup>3, 4, 10, 12, 13,14</sup>

La efectividad terapéutica de las inmunoglobulinas anti-toxina se restringe a la fase aguda del envenenamiento (hasta 2 horas), durante la cual los componentes tóxicos que aún se encuentran en circulación pueden ser neutralizados efectivamente<sup>15</sup>.

La composición del veneno, las manifestaciones clínicas y la severidad de las mismas pueden variar de una región a otra, afectando la eficacia del tratamiento con un determinado antiveneno. Existe un único antiveneno antiescorpiónico disponible en el país (anti-*T. discrepans*) el cual es eficaz en la neutralización de los venenos de las especies de *Tityus* distribuidas en las regiones Centro-Norte Costera y Nororiental-Insular. Sin embargo, su eficacia disminuye en el occidente del país, particularmente en el caso de *T. perijanensis*<sup>3</sup>. Estos hallazgos sugieren la existencia de un polimorfismo antigénico entre las toxinas de las especies de *Tityus* analizadas hasta el momento en Venezuela.

Este trabajo pretende evaluar la diversidad antigénica de diferentes venenos, con la finalidad de delimitar el país en áreas de reactividad hacia el antídoto disponible comercialmente en Venezuela, ayudando a establecer un mapa de la distribución de los *Tityus* de importancia en Venezuela de acuerdo a la reactividad antigénica de sus venenos. Tal mapeo puede resultar de utilidad para las autoridades sanitarias

encargadas de ajustar las medidas terapéuticas en base a las necesidades de cada área endémica, mediante el ajuste de las dosis de sueros inmunes a usar en cada región.

De hallarse especies de *Tityus* que habiten zonas pobladas o en vías de expansión que difieran significativamente en inmunoreactividad y que expresen toxinas únicas, podrá sugerirse la inclusión de estos venenos en la preparación del suero polivalente para mejorar su efectividad en las mencionadas zonas.

Los beneficiarios directos serán los pobladores de las áreas endémicas de Escorpionismo en Venezuela.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes

En 1994, Nishikawa y col. evaluaron la reactividad cruzada existente entre los venenos de varias especies de escorpiones brasileños. Los venenos de siete especies de escorpiones que viven en diferentes regiones de Brasil se analizaron con respecto a su letalidad, reactividad cruzada antigénica y la capacidad para inducir la producción de anticuerpos. En cuanto a la reactividad cruzada, en la electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), los venenos mostraron bandas de proteínas de alto y bajo peso molecular, la mayoría de las cuales presentaron reacción cruzada en inmunolectroforesis e inmunotransferencia utilizando el antisero preparado en caballos en contra de *T. serrulatus* y *T. bahiensis*, especies prevalente en el sureste de Brasil. Estos resultados se interpretaron como indicativo de que los antivenenos preparados en caballos contra una mezcla de venenos de *T. serrulatus* y *T. bahiensis* o sólo contra el veneno *T. serrulatus* producen una población de anticuerpos capaces de neutralizar los efectos tóxicos producidos por todos los venenos estudiados<sup>16</sup>.

En otro estudio, Borges y col. (1999), investigaron la existencia de diferencias antigénicas entre los venenos de la especie brasileña *Tityus serrulatus* y la especie venezolana *Tityus discrepans*, frente al antiveneno anti-(*Tityus serrulatus* + *Tityus bahiensis*) y al antiveneno anti-*Tityus discrepans*. En este estudio se obtuvo que el antiveneno anti-*T. discrepans* reaccionó sólo débilmente con la fracción neurotóxica de *T. serrulatus* mientras que el antiveneno brasileño reconoció más significativamente la fracción equivalente del veneno venezolano<sup>17</sup>.

En una recopilación de información realizada por Borges y De Sousa (1994), publicada en la revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, se discute la diversidad toxinológica y filogenética de los *Tityus*

venezolanos, y se comenta que existen reportes que señalan una menor eficacia del suero antiescorpiónico, disponible comercialmente en Venezuela, en el tratamiento de los envenenamientos ocurridos en la región occidental de nuestro territorio. Este antiveneno es altamente efectivo para el tratamiento de los envenenamientos acaecidos en la región Centro-Norte-Costera<sup>18</sup> y en la Nororiental e Insular.

La dosis efectiva del antiveneno comercial, en el caso de *T. zulianus* (región Andina), que neutraliza los síntomas y signos en niños de corta edad, es superior a la sugerida por el fabricante para la neutralización de los efectos producidos por *Tityus discrepans*<sup>8,9</sup>. Esta observación ha sido corroborada en el modelo murino, hallándose una dosis efectiva 50% neutralizante 1,5 veces superior a la requerida en el mismo modelo para neutralizar el efecto de *T. discrepans*<sup>3</sup>. Para el veneno de *T. perijanensis* (región Zuliana), la dosis neutralizante es tres veces la obtenida en el caso de *T. discrepans*<sup>19</sup>.

En un estudio realizado en Colombia donde se evaluó la neutralización del veneno de *Tityus pachyurus* por tres antivenenos antiescorpiónicos producidos en Latinoamérica: Alacramyn del Instituto Bioclón de México; el suero antiescorpiónico del Instituto Butantán de São Paulo, Brasil, y el antiveneno antiescorpiónico del Centro de Biotecnología de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Se evidenció que en el caso de los antivenenos de México y Brasil, la dosis efectiva 50% neutralizante del efecto letal fue de 330 y 292 µg de veneno por ml de antiveneno, respectivamente. El antiveneno de Venezuela (anti-*T. discrepans*) no neutralizó el veneno. Mediante electroforesis en presencia de SDS se demostró que el veneno contiene proteínas desde menos de 14 kDa hasta 97 kDa. Pruebas de “Western blot” indicaron reactividad inmunológica de los tres antivenenos con los diversos componentes del veneno, incluso las proteínas de baja masa molecular (<14 kDa). Estos resultados permiten concluir que el veneno de *T. pachyurus* es neutralizado eficientemente por los antivenenos contra picaduras de escorpiones producidos en México y Brasil<sup>20</sup>.

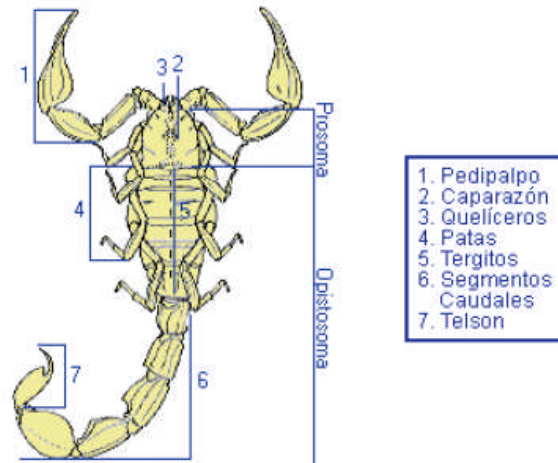
La reactividad cruzada antigénica de venenos de escorpiones también fue estudiada por D'Suze y col. (2007), utilizando dieciséis venenos de escorpiones pertenecientes a seis géneros, comparando su reactividad cruzada antigénica específica con F (ab') 2 en contra del antiveneno anti *Tityus discrepans*. Los resultados muestran que los venenos del género *Tityus* presentan una reactividad similar entre ellos lo que se pudiera deberse a que poseen epítopes compartidos. Sin embargo, los venenos de las especies de otros géneros como *Centruroides*, *Broteas*, *Diplocentrus*, *Chactas* y *Rhopalurus* no presentaron reacción cruzada contra el antiveneno anti-*Tityus discrepans*<sup>21</sup>.

En otro estudio realizado por Borges y col. (2010)<sup>22</sup>, se reporta un caso de envenenamiento escorpiónico por *Tityus breweri* en la región de Guayana y se discute la eficacia y reactividad del antiveneno anti-*Tityus discrepans* en el tratamiento de este caso, así como la evaluación de la reactividad del antisuero frente al veneno de *Tityus zulianus*. Se obtuvo que el antisuero comercial reconoció significativamente al veneno de *Tityus breweri* y que no hubo diferencia significativa en la reactividad de éste frente al antisuero y la observada con el veneno de *T. discrepans*. Sin embargo, se observó que la reactividad obtenida para *Tityus zulianus* fue significativamente menor a la obtenida para *T. discrepans*, lo cual permite corroborar la menor eficiencia de este antisuero para neutralizarla toxicidad *in vivo* del veneno de *T.zulianus* en comparación con *T. discrepans*, al menos en el caso del modelo murino<sup>22</sup>.

## **Bases teóricas**

### ***Los escorpiones: morfología y sistemática.***

Los escorpiones son los artrópodos venenosos más antiguos de nuestro planeta, los cuales están ampliamente distribuidos en las regiones tropical y sub-tropical del mundo. La letalidad de los venenos de algunas especies de importancia médica (y de las toxinas aisladas de los mismos), permite colocarlos entre los taxa más tóxicos del Reino Animal. El cuerpo del escorpión se encuentra dividido en dos regiones: cefalotórax (prosoma) y abdomen. El cefalotórax está dorsalmente cubierto por el caparazón, en el cual se encuentran los ojos medios y laterales. En la porción delantera del cefalotórax se encuentran (1) los quelíceros, los cuales sirven para la alimentación y acicalamiento, y (2) los pedipalpos, que le sirven para la inmovilización de la presa, defensa, percepción sensorial, cortejo y apareamiento. Además, en el cefalotórax se articulan cuatro pares de patas. El abdomen se encuentra diferenciado en dos subregiones: tiene 7 segmentos en el Mesosoma y 5 segmentos en el Metasoma. La parte dorsal de cada segmento sea del Mesosoma o del Metasoma se denomina tergito y la ventral esternito. En la porción ventral del mesosoma se observa la placa esternal que puede ser pentagonal, triangular o transversal y es considerada una clave taxonómica importante a nivel de familia; además, se encuentran las válvulas genitales, los peines que son estructuras sensoriales y los espiráculos que son las aperturas externas de los pulmones. La cola está formada por 5 segmentos caudales y una dilatación terminal denominado telson, que contiene dos glándulas venenosas conectadas a un aguijón con un pequeño orificio a través del cual el veneno es inyectado<sup>23</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Morfología general de los escorpiones. Vista dorsal del animal (González-Sponga, 1984)<sup>23</sup>.

Con respecto a su posición sistemática, los escorpiones pertenecen al Phylum Arthropoda, subphylum Chelicerata, clase Arachnida y orden Scorpiones, con 12 familias (Buthidae, Ischnuridae, Diplocentridae, Chactidae, Vaejovidae, Bothriuridae, Chaerilidae, Iuridae y Scorpionidae, Scorpionsidae, Urodacidae y Heteroscorpionidae). La familia Buthidae es la que tiene importancia médica en el mundo, especialmente por los accidentes ocasionados por las especies de los géneros *Tityus* y *Centuroides* en América, debido a la letalidad de sus venenos.

***La composición del veneno de los escorpiones y el síndrome derivado de su envenenamiento.***

El veneno producido por los escorpiones, es una secreción apocrina, que es expulsada violentamente por el orificio del acúleo o aguijón. Dependiendo de la toxicidad de sus venenos, los escorpiones pueden dividirse en dos grupos; aquellos cuyo veneno produce solamente reacción local y aquellos cuyo veneno interfiere con el funcionamiento normal del individuo y que puede ser letal, ya que existen varios grados de toxicidad hacia mamíferos, insectos o crustáceos<sup>24</sup>.

Este veneno es una mezcla muy compleja de más de 300 componentes, que generalmente contiene aminoácidos libres, sales orgánicas, lípidos, pequeñas cantidades de hialuronidasa y fosfolipasa, siendo su componente principal péptidos y



proteínas de bajo peso molecular (3-7 kDa). Algunas de estos últimos componentes ya han sido aislados y caracterizados y, a grandes rasgos, se pueden dividir en dos tipos según el efecto que tienen sobre los seres humanos: neurotóxicas y citotóxicas<sup>24</sup>.

Las toxinas neurotóxicas afectan a las uniones neuromusculares y son capaces de bloquear con gran especificidad los principales canales iónicos (sodio, potasio, cloro y calcio) de las células. Se caracterizan por estar muy plegadas gracias a la formación de tres o cuatro puentes disulfuro, lo que les da una apariencia compacta, estas se unen a los 4 sitios de unión de los canales iónicos. Por otra parte, las toxinas citotóxicas están formadas en su mayoría por péptidos citolíticos y serino-proteasas que causan necrosis en los tejidos dejando cicatrices que son difíciles de disimular<sup>24</sup>.

Las toxinas neurotóxicas tienen como blancos farmacológicos a los canales sensibles al voltaje que median el paso de iones sodio, potasio, cloruro y calcio. En vista que estos receptores principalmente se expresan a nivel de las membranas de los tejidos excitables, la acción de estos componentes tóxicos determina la exacerbación de las funciones de los órganos inervados, dando origen a los signos y síntomas que se presentan tras el envenenamiento por escorpiones en humanos y animales de experimentación<sup>3</sup>.

El envenenamiento escorpiónico en humanos produce una clínica compleja denominada “síndrome de envenenamiento escorpiónico” cuya magnitud depende de la composición del veneno, de la ruta de inoculación, y de la edad de la víctima, entre otros factores. Los componentes peptídicos mencionados anteriormente son los responsables de los efectos fisiopatológicos locales y sistémicos que caracterizan este tipo de envenenamiento. A consecuencia de la asociación de las toxinas a sus receptores, se produce la estimulación y liberación de neurotransmisores pre- y post-ganglionares del sistema nervioso autónomo del tipo catecolaminérgico y colinérgico, con manifestaciones tóxicas y cardiovasculares, acompañada igualmente de trastornos respiratorios y neurológicos, estos últimos particularmente en niños envenenados. La liberación masiva de acetilcolina es la responsable de los síntomas muscarínicos que

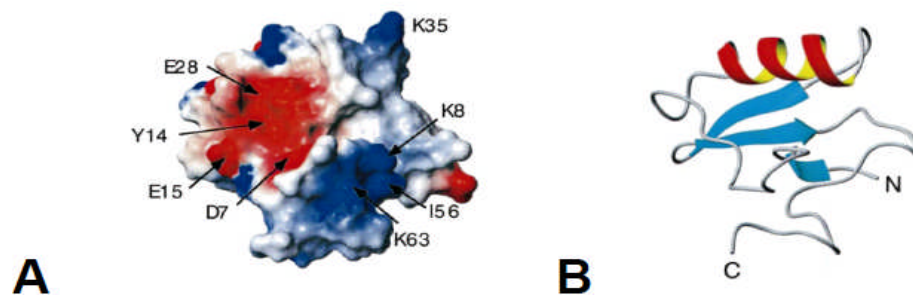
presentan los pacientes, tales como bradicardia, hipotensión, frialdad, miosis, sudoración, sialorrea, contracción del músculo traqueobronquial, hipersecreción bronquial, vómitos, incremento de la motilidad y tonos de fibras musculares del estómago y dolor abdominal. Este último empeora con el desarrollo de la pancreatitis aguda que comúnmente ocurre con el envenenamiento por escorpiones del género *Tityus*. La liberación masiva de adrenalina produce irritabilidad, convulsiones, rubicundez, oliguria, midriasis, palidez, hipertensión arterial, taquicardia, arritmia cardíacas y priapismo. Mientras más intensos son los signos y síntomas adrenérgicos y colinérgicos más grave es el cuadro y peor el pronóstico del paciente<sup>17</sup>.

### ***Toxinas presentes en los venenos de escorpiones***

Existe en la literatura amplia evidencia que demuestra que estos venenos son de composición compleja, conteniendo numerosas proteínas y péptidos neurotóxicos, exclusivos para cada especie en análisis. Las neurotoxinas más letales son aquellas que afectan a los canales de sodio voltaje-dependientes, provocado por una despolarización de la membrana celular. Tal despolarización es el resultado de la acción combinada de: (1)  $\alpha$ -toxinas, que tienen la capacidad de retardar el proceso de inactivación de las corrientes de  $\text{Na}^+$  voltaje-dependientes; (2)  $\beta$ -toxinas, las cuales promueven la disminución del potencial umbral del proceso de activación, facilitando el proceso de apertura del canal de  $\text{Na}^+$ , y (3) toxinas (~3 kDa) que bloquean el filtro de selectividad de canales de  $\text{K}^+$  voltaje-dependientes, dificultando la repolarización. Las  $\alpha$ - y  $\beta$ -toxinas son los componentes más letales del veneno y poseen elementos de estructura secundaria comunes, tales como la presencia de 2-3 bandas beta-plegadas y anti paralelas, unidas a una  $\alpha$ -hélice mediante 3-4 puentes disulfuro (Figura 2)<sup>3</sup>.

Existen en estas toxinas áreas bioactivas, con predominio de aminoácidos hidrofóbicos conservados en la región de estas moléculas que están involucradas en el reconocimiento de su receptor. Las regiones sin estructura secundaria que conectan a la hélice y las hojas  $\beta$ -plegadas entre sí son las regiones más expuestas al solvente y constituyen las áreas más antigénicas de estas neurotoxinas. Estas regiones presentan

un alto grado de variabilidad, en términos de su secuencia aminoacídica y de su longitud, entre especies de importancia médica, e incluso varían en estructura entre toxinas de una misma especie. En vista que estas regiones son las más expuestas y, por ende, las más antigénicas de las neurotoxinas tipo  $\alpha$  y  $\beta$ , se dificulta la preparación de inmunoglobulinas con la capacidad de reconocer simultáneamente epítopes en toxinas de diferentes especies y/o de distintas procedencias geográficas. Tal diversidad antigénica también ha sido hallada en el caso de las toxinas que afectan a los canales de  $K^+$ . Asimismo, es posible la existencia de diferencias geográficas en la concentración de los principios activos que coadyuvan en la difusión de las toxinas *in vivo*. Los resultados de investigaciones recientes indican que tal diversidad taxonómica en los escorpiones venezolanos del género *Tityus* está acompañada por una diversidad tanto o más compleja, en términos de la composición y actividad de los venenos de cada una de las especies. De hecho, la efectividad del único suero antiescorpiónico disponible en el país depende, entre otros factores, de la especie responsable del accidente<sup>3</sup>.



**Figura 2.** Estructura tridimensional de toxinas escorpiónicas. A) Modelo de la toxina Cn2 del escorpión *Centruroides noxius*, mostrando su superficie bioactiva (resíduos en rojo corresponden a aminoácidos cargados negativamente; en azul se indican los residuos cargados positivamente); B) Modelo de la misma toxina Cn2, mostrando las regiones de alfa hélice (rojo) y hojas beta-plegadas (azul)<sup>16,2</sup>.

***El polimorfismo de las toxinas escorpiónicas y la terapia basada en sueros inmunes.***

Polikarpov y col. (1999), trabajando con la toxina Ts1 del *Tityus serrulatus*, han explicado que la especificidad de la unión de esta toxina al canal de sodio se debe a la combinación de áreas con potencial electrostático (constituídas por residuos con carga negativa y positiva a pH fisiológico) junto con regiones hidrofóbicas<sup>25</sup>. Devaux y col. (1996), realizando investigaciones con anticuerpos elaborados en contra de toxinas de escorpión específicas, han hallado que una de las razones del fracaso de los sueros anti escorpiónicos en el tratamiento de envenenamientos producidos por especies heterólogas es producto de la variabilidad anteriormente mencionada en la secuencia aminoacídica en las regiones variables, en familias de toxinas aisladas de diversos escorpiones. Por otra parte, la existencia de residuos conservados en ciertas regiones de las toxinas puede jugar un papel crucial en las propiedades farmacológicas comunes de estas proteínas, al interactuar con sus receptores de manera similar<sup>25</sup>. Aun así, la sueroterapia continúa siendo la piedra angular del tratamiento de los envenenamientos causados por escorpiones. El tratamiento específico del envenenamiento escorpiónico se basa en la administración del antiveneno, compuesto por la fracción F(ab')<sub>2</sub> (fracción variable) de inmunoglobulinas equinas (IgG), desprovista del fragmento Fc (constante), responsable de las reacciones de hipersensibilidad por activación de la vía clásica del complemento. Este se administra por vía endovenosa, lo más precozmente posible con el fin de neutralizar el veneno. Este es elaborado por el Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela<sup>15</sup>.

Para su producción se utiliza veneno extraído de escorpiones del Género *Tityus*, especie *discrepans*, que es inyectado en equinos los cuales producen los anticuerpos específicos capaces de neutralizar los efectos nocivos de estos venenos. El proceso de elaboración del suero se inicia con la extracción del veneno de los escorpiones. En este proceso se estimula a los ejemplares para que descarguen el veneno

repetidamente sobre un vidrio de reloj recubierto por una membrana plástica, la cual será lavada para disolver el veneno del animal<sup>15</sup>.

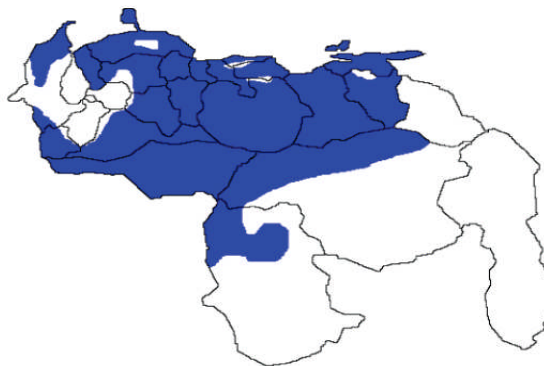
Una vez disuelto, el líquido resultante se lleva a un liofilizador, para eliminar el agua de la solución. Al momento de la administración, el veneno liofilizado se resuspende y se inyecta en los caballos, previa determinación de la potencia letal en ratones. Después de 10 a 12 días de inyectar al caballo, se le extrae la sangre, la cual se deja coagular, se centrifuga para separar el sobrenadante, y luego de varios procesos de purificación se obtiene el suero terminado<sup>15</sup>.

El suero anti escorpiónico es una solución de inmunoglobulinas específicas, purificadas por digestión enzimática, concentradas y posteriormente titulado de forma tal que cada mililitro de suero neutraliza un mínimo de 0,2 mg. de veneno de escorpión del género *Tityus*<sup>24</sup>.

Algunos de los factores involucrados en la neutralización *in vivo* del veneno son: a) la dosis inoculada y la farmacocinética del veneno en el organismo afectado; b) el tiempo transcurrido entre la inoculación de la toxina y la administración del anticuerpo anti-toxina o anti-veneno; c) la dosis, ruta y potencia del anticuerpo administrado; d) la disponibilidad (en las inmunoglobulinas antitoxina) de sitios de unión específicos de alta afinidad (un antiveneno monoespecífico puede ser más eficiente cuando se identifica la especie responsable del envenenamiento; cuando no hay certeza de ello, es mejor utilizar un antiveneno poliespecífico); e) la redistribución de las moléculas de la toxina de los compartimentos profundos al compartimiento del anticuerpo (vascular); f) la razón eliminación de la toxina / eliminación del anticuerpo; y g) la recirculación del anticuerpo en cada órgano. Además de las neurotoxinas, existen otros componentes que pueden coadyuvar con el efecto tóxico del veneno crudo del escorpión, permitiendo su difusión y penetración a nivel tisular, entre los cuales se encuentran diversas enzimas tales como la fosfolipasa, proteasas y la hialuronidasa<sup>1</sup>.

### *Escorpionismo en Venezuela.*

En Venezuela es conocida desde el siglo XIX la presencia de escorpiones y ya se sabía de la existencia de ejemplares venenosos de gran talla en las selvas de Imataca, en el estado Bolívar, cuya aguijoneadura era intensamente dolorosa, acompañada de fiebre alta y vómitos. Sin embargo, era creencia que tal envenenamiento no revestía importancia patológica, generando un cuadro clínico de cierta gravedad solo en infantes de corta edad o en sujetos hipersensibles. En la actualidad se sabe que dicha creencia se deriva del hecho que *Rhopalurus laticauda* Thorell (*Buthidae*), de amplia distribución en el país (Figura 4), envenena con mucha frecuencia pero la acción del veneno no va más allá de dolor local y otros síntomas pasajeros. Por el contrario, accidentes por ejemplares del género *Tityus* han sido causa comprobada de intoxicación grave y de muerte en niños y jóvenes adultos en los estados Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Falcón, Carabobo, Miranda, Distrito Capital, Sucre, Monagas y Delta Amacuro. En los últimos años se ha demostrado un marcado incremento de los casos de envenenamiento en el país por escorpiones de éste género, lo que obedece al crecimiento de los principales centros urbanos, tradicionalmente situados en la Cordillera de los Andes, Cordillera de la Costa y el Macizo Oriental<sup>3</sup>.



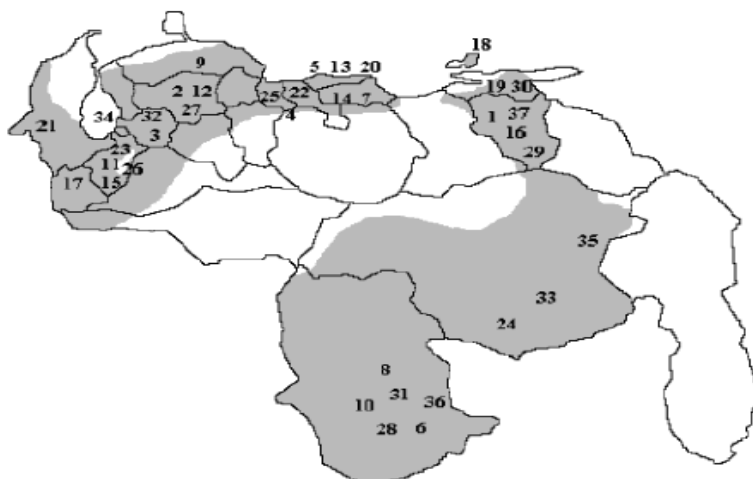
**Figura 3.** Distribución de *Rhopalurus laticauda* en Venezuela

Hasta los momentos han sido descritas cerca de 80 especies de escorpiones pertenecientes al género *Tityus* en Venezuela, identificadas en su mayoría por González-Sponga (Figuras 5 y 6)<sup>23</sup>. Su hábitat corresponde a las zonas de bosque

húmedo tropical, ubicadas en los principales sistemas montañosos del país. Las especies responsables de accidentes severos y fatales presentan tendencia a ocupar viviendas humanas, en búsqueda de los insectos que se reproducen en las mismas a raíz de la acumulación de desechos.

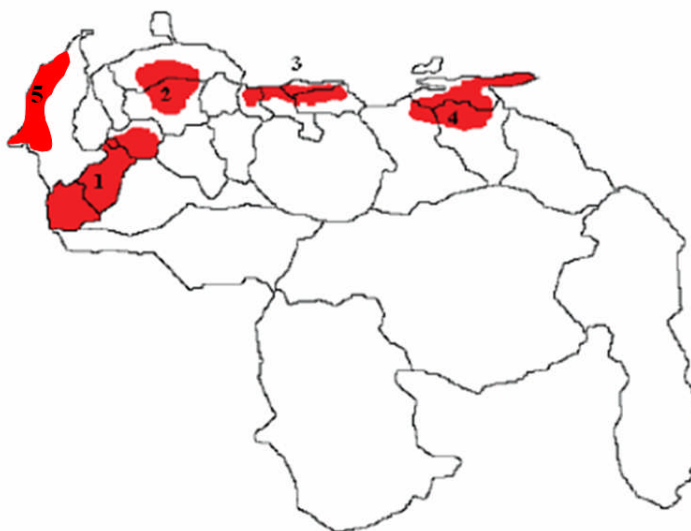
En Venezuela, se han descrito cuatro regiones macro endémicas de escorpionismo 1) Región Andina, comprendiendo los estados Mérida, Táchira, Trujillo e incluyendo sectores de los piedemontes de los estados Zulia (cuenca sur del Lago de Maracaibo), Lara y Barinas; 2) Región Centro-Occidental, abarcando el macizo coriano, e incluyendo la depresión de Barquisimeto y la Serranía de San Luis, en la frontera Lara-Falcón; 3) Región Centro- Norte Costera, desde el macizo de Nirgua (estado Yaracuy) hasta Barlovento (estado Miranda); y 4) Región Nororiental (Sucre, Monagas, Anzoátegui) e Insular (Nueva Esparta)<sup>3</sup>.

A estas cuatro macro regiones se agregarían: 5) Serranía de Perijá, en el estado Zulia; 6) la Deltana (estado Delta Amacuro); y 7) la Guayano-Amazónica, abarcando los estados Amazonas (Subregión Amazónica) y Bolívar (Subregión Guayanesa). A la Región Andina debería incorporarse el territorio norte del estado Portuguesa, para el cual se ha descrito recientemente el *Tityu simeii*, Similarmente, para la macro región Nororiental se incorporan *Tityus gonzalespongai* (Anzoátegui) y *T. quirogae* (Sucre y Monagas), especies que producen componentes neurotóxicos en sus venenos. La macro región Guayano-Amazónica, territorialmente la más extensa y la menos poblada (ubicada fundamentalmente en la franja sur del territorio venezolano), aportaría la menor proporción de casos a nivel nacional, los cuales poseen, sin embargo, relevancia clínica significativa<sup>3</sup>.



**Figura 4.** Distribución de las especies del género *Tityus* en Venezuela<sup>9</sup>

01. *T. arellanoparraí*, 02. *T. barquisimetanus*, 03. *T. boconoensis*, 04. *T. carabobensis*, 05. *T. clathratus*, 06. *T. culebrensis*, 07. *T. discrepans*, 08. *T. dupouyi*, 09. *T. falconensis*, 10. *T. filodendron*, 11. *T. funestus*, 12. *T. ivic-nancor*, 13. *T. lancinii*, 14. *T. melanostictus*, 15. *T. meridanus*, 16. *T. monaguensis*, 17. *T. nematochirus*, 18. *T. neoespartanus*, 19. *T. nororientalis*, 20. *T. osmanus*, 21. *T. perijanensis*, 22. *T. pittieri*, 23. *T. pococki*, 24. *T. riocauensis*, 25. *T. rojasi*, 26. *T. rugosus*, 27. *T. sanarensis*, 28. *T. shiriana*, 29. *T. surorientalis*, 30. *T. tamayoi*, 31. *T. urbinai*, 32. *T. valerae*, 33. *T. venamensis*, 34. *T. zulianus*, 35. *T. breweri*, 36. *T. anduzei*, and 37. *T. caripitensis n. sp.*



**Figura 5.** Áreas endémicas de envenenamiento por escorpión del género *Tityus* en Venezuela de acuerdo a Borges y De Sousa (2006)<sup>3</sup>. Área 1. Táchira, Mérida y Trujillo. Área 2. Lara y Falcón. Área 3. Carabobo, Aragua, Miranda y Distrito Capital. Área 4. Anzoátegui, Monagas y Sucre. Se añade la Sierra de Perijá (Área 5), zona habitada por el escorpión *Tityus perijanensis*, según Borges y Rojas-Runjaic (2007)<sup>36</sup>.



***Diferencias funcionales e inmunológicas entre venenos de escorpiones de importancia médica en Venezuela.***

La especie *T. discrepans* ha sido la más estudiada desde el punto de vista bioquímico y farmacológico por ser la responsable de la mayoría de los accidentes reportados en la zona Centro-Norte del país, que incluye a la ciudad capital, Caracas. El veneno producido por esta especie posee un título letal comparable al de otros escorpiones de alta peligrosidad en el mundo (DL50 = 2.51 mg/kg), determinada por vía intravenosa en ratones, el cual es 12 veces más potente que el correspondiente al veneno de la especie de amplia distribución en el país, *Rhopalurus laticauda*. Además, el veneno de *T. discrepans* posee componentes de toxicidad comparables a otras toxinas aisladas a partir de otros géneros de la especie *Tityus*, capaz de inducir pancreatitis en dosis sub-letales. Sin embargo, el resto de las especies de *Tityus* que habitan el país (Figura 4) han sido poco estudiadas desde los puntos de vista toxicológico e inmunológico, a pesar de su importancia médica y de la conocida variabilidad estructural en los epítopes antigénicos de las toxinas escorpiónicas<sup>1</sup>.

El escorpionismo, como se denomina al envenenamiento grave que se produce por la inoculación del veneno de escorpión (o alacrán), tiene, en el caso de las especies del género *Tityus*, características particulares que lo diferencian del cuadro clínico producido, por ejemplo, por ejemplares pertenecientes al género *Centruroides*, endémico de América Central y América del Norte. Los venenos de las especies de *Tityus* son capaces de inducir microembolias y una reacción inflamatoria generalizada que ha llevado a proponer el término “Síndrome de dificultad respiratorio por escorpionismo (SDRE)” como una mejor caracterización del cuadro que se instala tras el envenenamiento, por lo menos en el caso de *T. discrepans*<sup>8,9</sup>.

Otro escorpión de importancia epidemiológica recientemente analizado ha sido *Tityus zulianus*, cuyo veneno posee un título letal (DL50) de 1,75 mg/Kg (determinada por vía intravenosa). Este escorpión ocupa un área de distribución que se extiende desde el Sur del Lago de Maracaibo hasta el norte de los estados Mérida y

Táchira. De acuerdo a lo referido por los médicos tratantes en la zona endémica ocupada por *T. zulianus*<sup>9</sup>, para el tratamiento de las víctimas envenenadas por este escorpión es necesario el uso de dosis superiores del único suero antiescorpiónico disponible en el país, anti-*T. discrepans* (3-4 ampollas del antiveneno en relación a 1-2 ampollas sugeridas por el fabricante para el tratamiento). Este antiveneno es fabricado en caballos por la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela<sup>26</sup>. Además, el cuadro tóxico que se presenta tras el envenenamiento por *T. zulianus* incluye principalmente complicaciones cardiorrespiratorias, en contraposición al cuadro gastrointestinal y pancreático observado tras el accidente con *T. discrepans*. De hecho, la causa de la mayoría de las muertes debidas a envenenamiento por *T. zulianus* se reporta como edema agudo de pulmón<sup>8</sup>. Es conocida la existencia de diferencias en la composición y en la actividad del veneno entre diferentes especies del género *Tityus*. Por ejemplo, trabajos realizados con el suero polivalente producido a partir de las especies brasileñas *T. serrulatus* y *T. bahiensis* han mostrado que éste no neutraliza completamente los efectos tóxicos de los venenos de las especies venezolanas. Así mismo, el suero anti-*T. discrepans* no es capaz de reconocer los componentes de bajo peso molecular, entre los que se encuentran las neurotoxinas, del veneno de la especie brasileña *T. serrulatus*<sup>17</sup>.

Igualmente, estudios *in vivo* han revelado la existencia de diferencias en los mecanismos de acción de los venenos de *T. zulianus* y *T. discrepans*. Borges y colaboradores (2004) han mostrado que la pancreatotoxicidad en ratones (evaluada mediante el incremento en los niveles de amilasa sérica y del edema tisular) del veneno del *T. zulianus* es significativamente superior al generado por el veneno de *T. discrepans*, aplicados ambos a las mismas dosis. Las evidencias anteriormente expuestas indican que los venenos de dos de las especies de escorpiones de mayor peligrosidad en Venezuela, *T. zulianus* y *T. discrepans*, difieren en el proteoma de sus glándulas del veneno. Tales diferencias podrían ser de naturaleza cuantitativa (en términos de la abundancia de toxinas compartidas) y/o cualitativas (toxinas heterólogas con estructura/función diversa)<sup>14</sup>.

En el caso de *T. perijanensis*, especie endémica de la Sierra de Perijá, en el oeste del estado Zulia, Borges y colaboradores (1995) demostraron que en el caso de este veneno se requieren 6 veces la cantidad de proteína del suero antiescorpiónico comercial para su neutralización *in vivo* (en ratones inyectados por vía intravenosa)<sup>4</sup>. Borges y col. (2010) señalaron que en el caso de la especie *T. breweri*, endémica de la zona oriental del estado Bolívar, su veneno era efectivamente neutralizado por el antiveneno disponible en el país (anti-*T. discrepans*)<sup>1</sup>.

Estas evidencias, tomadas en conjunto con las diferencias funcionales arriba indicadas, señalan la existencia de una variabilidad antigénica entre las toxinas producidas por los escorpiones venezolanos de importancia médica. Dicha variabilidad conlleva a una diferencia en la reactividad cruzada por parte de los diversos venenos hacia el único antisuero. Tal reactividad cruzada se refiere al grado de reactividad que exhibe un nuevo antígeno por el anticuerpo que fue preparado originalmente empleando un inmunógeno distinto al antígeno que se está ensayando. Esto puede ser causado por la baja avidéz o especificidad del anticuerpo o por antígenos que tienen múltiples distintos epítopes como para permitir un reconocimiento tan eficiente como en el caso del inmunógeno original. En la terapia a base de sueros hiperinmunes, la reactividad cruzada es deseable cuando se pretende una unión general a un grupo relacionado de antígenos. Los métodos de evaluación de reactividad cruzada son útiles cuando, por ejemplo, se intenta clasificar especies cruzadas cuando la secuencia del epítope del antígeno no está muy altamente conservada en la evolución<sup>26</sup>.

En este trabajo de investigación se evaluó la reactividad cruzada que presenta el antisuero anti-*T. discrepans* frente a diferentes especies del género *Tityus* representativos en Venezuela responsables de numerosos accidentes graves y fatales, en vista de la potencial diversidad estructural existente entre las toxinas producidas por dichas especies. Las especies analizadas serán: *T. discrepans* (región central), *T. zulianus* (región andina), *T. falconensis* (Macizo coriano), *T. perijanensis* (Sierra de Perijá), *T. tenuicauda* (Península de Paria) y *T. gonzalespongai* (Macizo Nor-oriental)

(ver Figura 4). La reactividad cruzada puede ser evaluada por diferentes ensayos inmunológicos en los que se incluye:

ELISA (Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas): esta técnica se basa en el hecho de que antígenos o anticuerpos pueden ser inmovilizados sobre superficies sólidas manteniendo su capacidad de combinarse con sus ligandos correspondientes y específicos después de lo cual el complejo antígeno-anticuerpo formado queda fijado en la fase sólida; al agregar a la reacción un conjugado o sonda marcada con una enzima, que tenga la propiedad de ligarse con el componente más superficial del complejo antígeno-anticuerpo, dicha reacción puede evidenciarse añadiendo el sustrato de la enzima marcadora, con un cromógeno adecuado<sup>27</sup>.

La actividad de la enzima sobre el sustrato cataliza la formación de un producto coloreado, cuya intensidad de color será proporcional a la cantidad de anticuerpo secundario ligado a la enzima que se fijó en la reacción.

Ensayo de inmunodetección en papel de nitrocelulosa o “immunoblots”: es una técnica usada para detectar proteínas específicas en una mezcla compleja. Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS se separan las proteínas en relación a su masa molecular. Luego son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa) para poder identificar la proteína de interés empleando anticuerpos específicos elaborados contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia entre otros métodos<sup>28, 29</sup>.

El fin último es el de indagar la posibilidad de delimitar el territorio nacional en áreas de reactividad hacia al único antiveneno disponible. Paralelamente, los hallazgos obtenidos podrían contribuir a la mejora de los protocolos de sueroterapia existentes en el país y/o la adopción de nuevas estrategias terapéuticas.

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### **Tipo de estudio**

Consiste en un estudio experimental *in vitro*, en el que se procede a evaluar la reactividad cruzada de venenos de diferentes especies del género *Tityus* en Venezuela frente al antiveneno anti-*T. discrepans* empleando técnicas inmunoquímicas.

#### **Población**

El presente trabajo se realizó a partir de poblaciones de especies de escorpiones del género *Tityus* provenientes de diferentes áreas endémicas del país y responsables de accidentes graves y/o fatales, listadas a continuación:

- Adultos de *T.zulianus* (alrededores de Santa Cruz de Mora, estado Mérida)
- Adultos de *T. discrepans* (cerca de San Antonio de los Altos, estado Miranda)
- Adultos *T. falconensis* (Sierra de San Luis, estado Falcón)
- Adultos *T. perijanensis* (Rio Cachirí, estado Zulia)
- Adultos *T. tenuicauda* (Las Melenas, estado Sucre)
- Adultos *T. gonzalespongai* (Macizo del Bergantín, estado Anzoátegui)

Se indica la localización geográfica de estas poblaciones en el mapa que se presenta a continuación:



**Figura 6.** Mapa de la República Bolivariana de Venezuela indicando la localización geográfica de cada una de las especies cuyos venenos fueron evaluados en este trabajo.

### ***Obtención de especímenes***

Los escorpiones en su momento fueron recogidos durante la noche con la ayuda de lámparas de luz ultravioleta, la cual permite reconocer a estos arácnidos mediante la fluorescencia verde intensa que emite el exoesqueleto de estos animales al ser irradiados con estas lámparas (Stachel y col., 1999)<sup>30</sup>.

### ***Clasificación de especímenes***

Los ejemplares fueron clasificados de acuerdo a criterios taxonómicos y distribución de las especies de escorpiones ya descritas (González-Sponga, 1996)<sup>31</sup> y mantenidos en cautiverio en el bioterio del Instituto de Medicina Experimental, Caracas, Universidad Central de Venezuela, en recipientes de plástico con agua *ad libitum* y se alimentan con larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) o con grillos *Acheta domesticus* (Orthoptera, Gryllidae) cada semana.

## **Muestra**

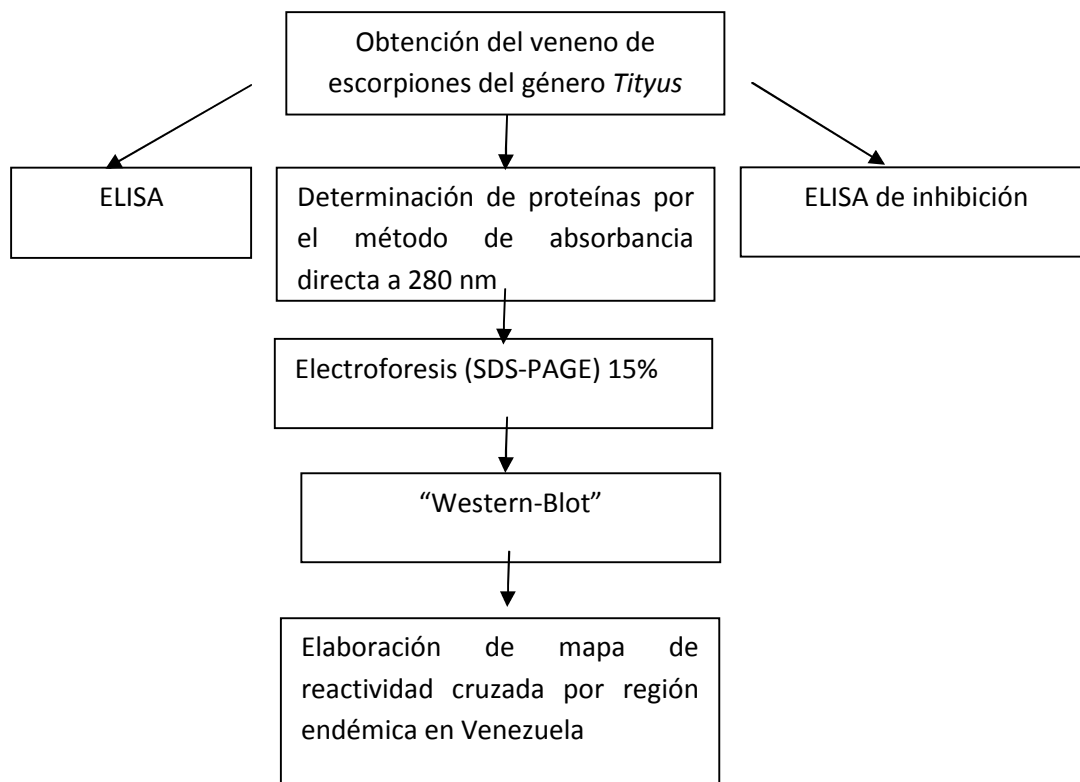
### ***Extracción del veneno de escorpión***

El veneno de los escorpiones empleado durante este trabajo fue suministrado por el Laboratorio de Biología Molecular de Toxinas y Receptores, Instituto de Medicina Experimental, el cual fue extraído por estimulación manual del telson de las especies en estudio, al forzar a los animales a emponzoñar repetidamente láminas de papel Parafilm® de acuerdo al método de Shulov y Zlotkin (1969)<sup>32</sup>. Luego de obtenidos, los venenos eran sujetos a liofilización y almacenados a -20°C hasta su uso, en cuyo momento eran resuspendidos en agua desionizada antes de proceder a la determinación de la concentración de proteínas, en preparación para otros ensayos.

### **Antiveneno**

El antiveneno anti-*T. discrepans*, derivado de caballos inmunizados, se obtuvo del Centro de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. El producto final para uso humano, el cual consiste en ampollas de 5 mL conteniendo inmunoglobulinas IgG tratadas con pepsina a fin de generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, posee una concentración de proteínas de 10 mg/mL<sup>15</sup>.

## Plan de trabajo



## Materiales y métodos.

### *Determinación de proteínas*

Se llevó a cabo la determinación de la concentración de proteínas presente en la fracción soluble de los venenos de escorpiones mediante lectura de absorbancia en un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf) a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de absorbancia (a esta longitud) representa una concentración de 1 mg/ml (Possani y col., 1977)<sup>37</sup>.

$$D.O = \epsilon_{280} \cdot l \cdot c$$

D.O= Densidad Óptica

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar a la longitud de onda de 280 nm

l= longitud del paso óptico



c= concentración

### *Métodos electroforéticos*

#### Electroforesis

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) usando el sistema discontinuo de amortiguadores de Tris/glicina de Laemmli (1970)<sup>34</sup> para el fraccionamiento de las proteínas por tamaño tomando en cuenta que para los posteriores ensayos inmunoquímicos las proteínas deben ser cargadas en el gel con la misma cantidad (15 µg), estos cálculos se hicieron a partir de los resultados de concentración de proteínas obtenidos por el método de absorbancia directa. Los geles de pre-corrída fueron preparados al 5% acrilamida (Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0,3%, Buffer Tris 1,0 M pH 6.8, SDS 10% (p/v), Persulfato de Amonio (APS) 10% (p/v), TEMED (N,N,N,N'-tetrametilenediamina), mientras que los geles de corrída fueron elaborados entre 15% y 20% de acrilamida (Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0,3%, Buffer Tris 1,5 M pH 8.8, SDS 10%, APS 10% TEMED). Las muestras fueron diluidas en buffer conteniendo mercaptoetanol, incubadas en baño de agua a 100°C por 3 minutos y centrifugadas 1 minuto a 5000 rpm, y posteriormente cargadas en el gel para llevar a cabo la electroforesis a 20 mA durante 1.5 h. Como estándares de masa molecular se usaron proteínas de masa molecular conocida (en kilodaltons, kDa): Fosforilasa b (103 kDa), Sintetasa de almidón (77 kDa), Ovoalbúmina (50), Anhidrasa carbónica (34,3 kDa), Mioglobina (28,8 kDa), Inhibidor de Tripsina de Soya (20,7 kDa) y Aprotinina (6,5 kDa).

Una vez culminada la electroforesis, se procedió a colorear el gel con solución de Coomassie Blue (0,1% (p/v) Coomassie Blue R, 10% (v/v) Acido Acético, 50% (v/v) Metanol, 40% (v/v) Agua) y decolorarlo con solución de ácido acético (10% (v/v) Acido Acético, 20% (v/v) Metanol, 70% (v/v) Agua destilada) con el fin de teñir las bandas de proteínas correspondientes a cada veneno.

Determinación de las masas moleculares de los componentes de los venenos en estudio.

Una vez teñido el gel con Coomassie Blue, se procedió a la elaboración de una curva de calibración con el fin de calcular las masas de los componentes presentes en los venenos fraccionados electroforéticamente. A tal fin, se determinó la distancia relativa (Rf) correspondiente a la migración electroforética de cada marcador calculada como la migración (en cm) de cada banda dividida por la migración del frente de corrida (para el azul de bromofenol). Tomando en cuenta la masa molecular de cada marcador (en kiloDaltons, kDa), se calculó el logaritmo de las masas moleculares individuales y se graficaron tales valores contra la distancia relativa recorrida por cada uno de ellos. Posteriormente se determinó la ecuación de la línea de tendencia obtenida mediante el programa Microsoft Excel a fin de hacer posible el cálculo de las masas moleculares de las bandas de proteínas presentes en cada veneno.

Electrotransferencia

Este método consiste en la transferencia de proteínas fraccionadas mediante SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa conservando su posición relativa, para su posterior exposición al suero anti *T. discrepans* de acuerdo a Borges y col. (1999)<sup>17</sup>

Los geles fueron corridos en las mismas condiciones que las descritas en la sección “Electroforesis”, sin ser coloreados dichos geles. Se procedió a montar el sándwich en este estricto orden (separador de goma espuma + papel de filtro + gel de electroforesis + membrana de nitrocelulosa + papel de filtro + separador de goma espuma) y se colocó en la cámara de electroforesis con solución tampón para la electrotransferencia (Tris-HCl 50 mM; glicina 380 mM; SDS 0,1%; MeOH 20%), realizándose la misma a 350 mA por 60 minutos.

Se verificó el éxito de la transferencia mediante el empleo de marcadores de peso molecular pre-teñidos (Bio –Rad) el cual se detecta en el papel de nitrocelulosa.

## ***Inmunodetección***

### ***Inmunoblot***

Se utilizó la metodología empleada por Borges y col. (1999)<sup>17</sup> en donde, una vez realizada la electrotransferencia se incubó la membrana de nitrocelulosa en la solución de bloqueo (PBS, 0,3% de Tween) durante una hora con agitación. Posteriormente se realizaron tres lavados con solución de lavado (PBS-Tween al 0,05%) 5 minutos cada lavado con agitación. Luego se procedió a incubar con el anticuerpo primario (suero anti *T. discrepans*) diluido 1/1000 en PBS durante una hora y media con agitación y se efectuaron tres lavados en las condiciones anteriormente descritas. Seguido a esto se incubó con el conjugado (IgG anti-Fc de equino conjugada a peroxidasa de rábano) diluido 1/1500 durante una hora con agitación. Se procedió a lavar con solución de lavado 3 veces, 5 minutos cada una con agitación y luego lavar con PBS 2 veces durante 5 minutos con agitación cada lavado. Finalmente se incubó con el sustrato (A: 10 mg (0.01 g) Diaminobenzidina en 10 ml de PBS. B: 5 mg cloronaftol + 1,66 ml de metanol en 8,32 ml de PBS) y se dejó colorear unos 10 a 15 minutos. Una vez detectadas las bandas producto de la tinción la solución del sustrato era descartada y la membrana lavada con agua bidestilada.

### ***ELISA ("Enzyme-linked Immunosorbent Assay") de titulación para la evaluación de la reactividad cruzada entre venenos totales.***

Se empleó la técnica de ELISA de titulación a fin de evaluar la inmunoreactividad de los venenos de escorpión en estudio frente el suero anti-*T. discrepans* y determinar la dilución óptima a la cual reacciona el antígeno con el anticuerpo en preparación para los experimentos de ELISA de competencia.

Con este propósito, se sensibilizaron placas tipo Falcon de 96 pozos con los diversos venenos en estudio descritos en el punto 2.1, empleando 100 ng de proteína por pozo por cada veneno, en triplicado (100  $\mu$ L, a partir de una solución de 1 ng/ $\mu$ L) y se incubó a 4°C en cámara húmeda durante toda la noche. Las placas con veneno

adsorbido fueron bloqueadas con 200  $\mu$ L de solución de caseína 2% (p/v) (20 g de caseína en 1 litro de buffer fosfato salino, PBS) durante 2 horas, con el fin de reducir la unión inespecífica de proteínas del suero. Luego se realizaron cuatro lavados con la solución de lavado (0,05% Tween- PBS). La placa sensibilizada se hizo reaccionar con 100  $\mu$ l/pozo de diluciones seriadas (de 1/100 a 1/25600) de anticuerpo de anti-*T. discrepans* según el protocolo de Nishikawa y col. (1994)<sup>16</sup> e incubadas a 37°C con agitación (250 rpm) por una hora. Posterior a esto se hicieron seis lavados con PBS Tween y se agregaron 100  $\mu$ l por pozo de una dilución 1/1500 en buffer de incubación de anticuerpo secundario (el mismo conjugado empleado en los experimentos de inmunotransferencia) durante una hora en oscuridad a 37°C. Se efectuaron seis lavados con PBS Tween y se agregó 100  $\mu$ l/pozo del sustrato orto-fenilendiamina (2 mg OPD (Sigma) en 10 mL de buffer citrato y 12  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) y se incubaron a 37°C protegido de la luz durante 20 minutos. La reacción fue interrumpida con 75  $\mu$ l en cada pozo de solución de ácido sulfúrico 2 N. Finalmente, se determinó la absorbancia de cada uno de los pozos a 492 nm a fin de evaluar la concentración del complejo antígeno-anticuerpo formado a través de un lector de placas de ELISA (Titertek Multiscan).

#### ELISA de competencia

Luego de conocer la dilución óptima del antiveneno en estudio por el método de ELISA de titulación, se realizó un ELISA de competencia con la finalidad de conocer la concentración inhibitoria de los venenos analizados sobre el enlazamiento del antiveneno comercial al veneno adsorbido de *T. discrepans*, según el método descrito por De Sousa et al. (2010)<sup>37</sup>.

El veneno de *T. discrepans* fue adsorbido (100 ng de veneno por pozo) en placas de microtitulación de 96 pozos durante 12 a 14 horas en cámara húmeda a 4°C. Posterior a esto se realizaron cuatro lavados con la solución de lavado (0,05% Tween-PBS) y seguidamente se agregaron 200  $\mu$ L de solución de bloqueo e incubado a 4 °C durante dos horas.

Se realizaron diluciones de manera de obtener 1 mL de una solución de 20 µg/mL de proteína de cada uno de los venenos analizados en este trabajo. A partir de la dilución anterior se realizaron once diluciones seriadas con concentraciones de proteínas desde 20 µg/mL hasta 0,02 µg/mL y para cada uno de estos tubos se prepararon 200 µL de suero anti-*T. discrepans* diluido 1/2400 en amortiguador de incubación (dilución óptima resultante). Se incubaron las diferentes diluciones de los venenos durante 10 minutos a 37°C con agitación. Se agregó inmediatamente a cada tubo 200 µl de antiveneno diluido 1/2400 y se incubó por una hora a 37 °C en placa de agitación a 500 r.p.m. Se utilizó esta mezcla como anticuerpo primario (por triplicado), agregando 100 µl de la misma por pozo en la placa sensibilizada con el veneno de *T. discrepans* y se incubó durante una hora a 37°C con agitación. Se lavó 6 veces con solución de lavado y se agregaron 100 µL de anticuerpo secundario diluido 1/1500 con amortiguador de incubación. Posteriormente, se incubó a 37 °C en oscuridad y con agitación por una hora. Luego se hicieron 6 lavados y la actividad enzimática fue revelada usando una solución de ortofenilenodiamina (OPD) agregando 100 µL de este sustrato durante 20 minutos, en oscuridad a 37°C. Esta reacción fue interrumpida agregando 75 µl de solución de ácido sulfúrico 2N en cada pozo. Finalmente se realizó la lectura de las absorbancias a 492 nm.

Los valores fueron expresados como el porcentaje del antiveneno libre de unirse al veneno adsorbido en las placas de ELISA, correspondiendo el 100% a la absorbancia de la reacción a 492 nm debida a la reacción del anticuerpo (dilución 1/2400) con el antígeno de *T. discrepans* adsorbido, en ausencia de veneno en competencia.

### ***Análisis densitométrico***

A fin de cuantificar la intensidad de la coloración de bandas de proteína lograda a través de tinción con Azul de Coomassie o mediante reacción enzimática en “Western Blots”, se procedió a la digitalización de las bandas y posterior cuantificación mediante el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), el cual permite asignar

valores en número de píxeles por cada banda reconocida según lo sugerido por Borges et al (2010)<sup>22</sup>.

### *Análisis estadístico*

Durante los ensayos de ELISA y “Western Blot” cada muestra se analizó por triplicado y provienen de al menos tres experimentos ejecutados independientemente.

En el caso de los resultados de ELISA, se obtuvieron los valores de reactividad que correspondan a la porción lineal de la curva de titulación con anticuerpo anti-*T. discrepans* frente a cada veneno evaluado. Los resultados serán expresados como la media de tres valores en tres experimentos independientes, calculando para cada punto el error estándar.

Media aritmética:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

Error estándar:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

La determinación de la existencia de diferencias significativa entre los valores obtenidos por los diferentes venenos y la obtenida por el veneno *T. discrepans* tanto en “Western Blot” como en ELISA se hizo mediante comparaciones de valores promedios más o menos el error estándar ( $\pm 1ES$ ) usando la prueba estadística “*t*” de Student debido que el tamaño de la muestra es reducido, empleado previamente por Borges y col. (2008)<sup>10</sup>. Para estos cálculos se utilizó el paquete estadístico implementado en Microsoft Excel.

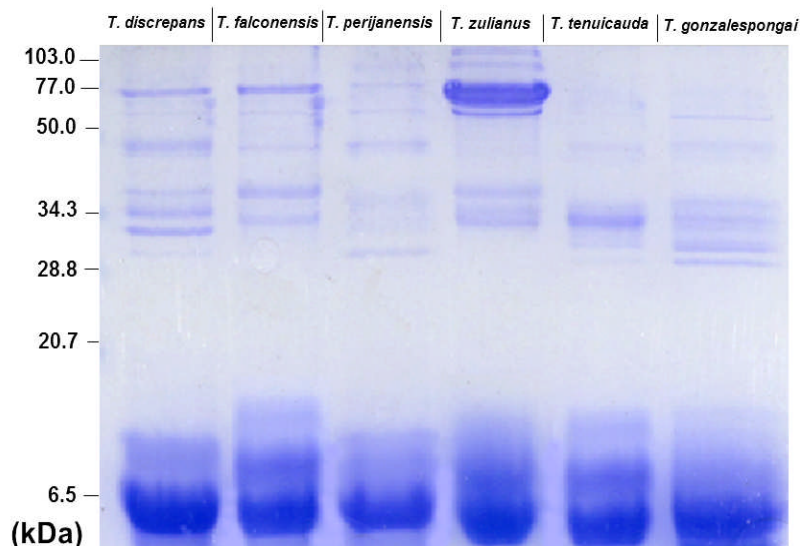
## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

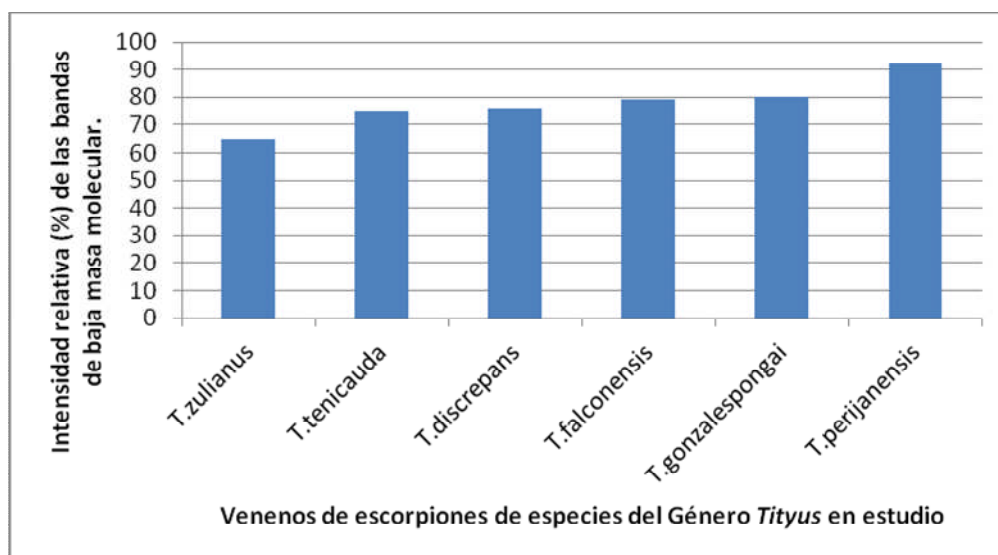
#### Resultados

##### *Fraccionamiento de los venenos mediante SDS-PAGE*

Se evaluó la composición de los venenos totales luego de haber sido sometidos a SDS-PAGE. En la Figura 7 puede observarse que los componentes mayoritarios para todos los venenos (mayor intensidad de coloración con Azul de Coomassie) corresponden a aquellos con masas moleculares alrededor de 6,5 kDa. Esta observación fue confirmada al determinar densitométricamente la intensidad relativa obtenida de las bandas de baja masa molecular tomando como referencia el total de bandas para cada uno de los venenos. La Figura 8 muestra los resultados de tal cuantificación empleando el programa ImageJ. Se obtuvo para *T. perijanensis* un 92% de intensidad para las bandas de baja masa molecular (6-8 kDa) en comparación con el resto de los componentes, seguido por: *T. gonzalespongai* (80%), *T. falconensis* (79%), *T. discrepans* (76%), *T. tenuicauda* (75%) y *T. zulianus* (65%) (Figura 8). Es notable la abundancia de un componente de aproximadamente 77 kDa en el veneno de *T. zulianus*.



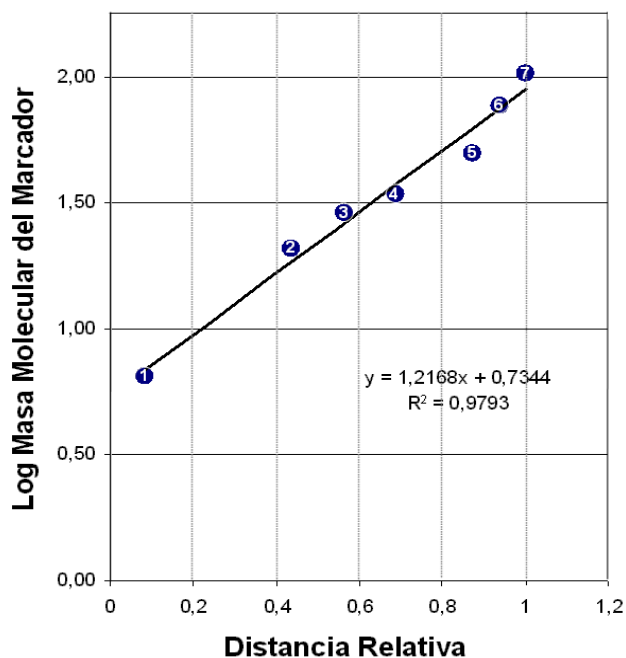
**Figura 7.** Electroforesis (gel al 15%) en condiciones disociantes (SDS-PAGE) de los venenos totales (15 µg de proteína por bolsillo) de las especies analizadas. Se muestra un gel representativo de tres corridas independientes. La porción izquierda del gel muestra la migración de los marcadores de masa molecular empleados, usados para generar la curva de calibración mostrada en la Figura 9.



**Figura 8.** Intensidad relativa (en relación a las proteínas totales fraccionadas mediante SDS-PAGE) de las bandas correspondientes a las proteínas de baja masa molecular de los venenos de escorpiones estudiados, evaluada mediante densitometría.

Posteriormente, se procedió a determinar la masa molecular de los componentes de menor migración electroforética, con masas entre 103 y 28,8 kDa, cuya composición varía entre los venenos analizados, como se observa en la Figura 7. Con este propósito, se generó una curva de calibración elaborada a partir de la migración de los marcadores de masa molecular conocida, en donde se graficó la distancia relativa recorrida por el marcador (distancia recorrida por el marcador / distancia recorrida por el frente de migración electroforética) en contra del logaritmo decimal de la masa molecular. En la Figura 9 se ilustra esta gráfica, junto con la ecuación que define la línea de tendencia, empleada para el cálculo de las masas desconocidas de los componentes de los venenos. La Tabla 1 presenta las masas calculadas para los componentes de menor migración en base a la ecuación presentada en la Figura 9. Se observa que todos los venenos, a excepción de *T. zulianus*, comparten el componente de 54,9 kDa, seguida de las bandas correspondiente a 76,7 kDa (compartido entre *T. discrepans*, *T. perijanensis*, *T. falconensis* y *T. zulianus*), 40 kDa (entre los venenos de *T. discrepans*, *T. falconensis* y *T. zulianus*) y 29,1 kDa (entre *T. discrepans*, *T. perijanensis* y *T. gonzalespongai*).





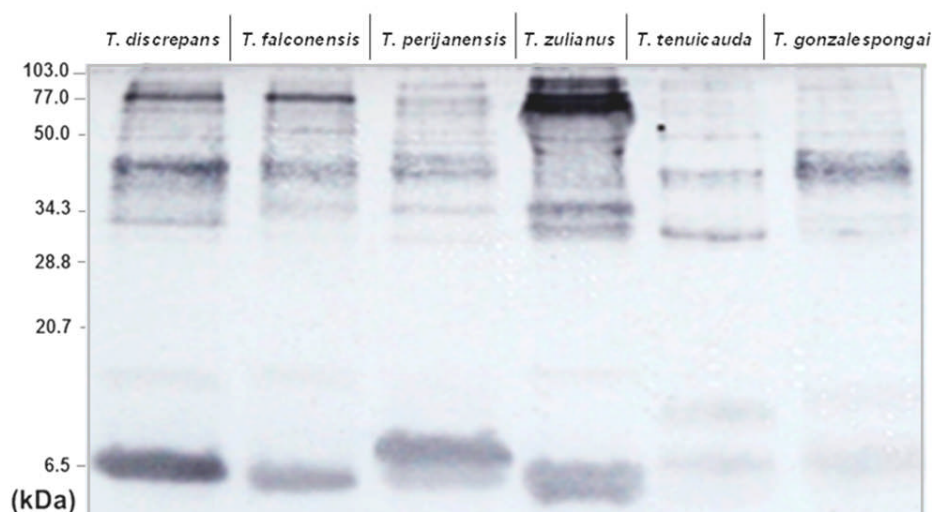
**Figura 9.** Curva de calibración para la migración electroforética de marcadores de masa molecular mostrada en la Figura 7. La distancia relativa corresponde al cociente de la migración de cada marcador y la distancia correspondiente al frente de migración, correspondiente al colorante azul de bromofenol. La identidad de los marcadores es como sigue: 1. 6,5 kDa; 2. 20,7 kDa; 3. 28,8 kDa; 4. 34,3 kDa; 5. 50 kDa; 6. 77 kDa; 7. 103 kDa.

Venenos de Escorpión del Género <i>Tityus</i>	Masa Molecular de los componentes de menor migración electroforética (kDa)									
	106.2	76.7	67.23	54.9	45.4	43.8	39.1	36.3	31.1	28.7
<i>T. discrepans</i>		✓		✓	✓		✓	✓	✓	
<i>T. falconensis</i>		✓		✓	✓			✓		
<i>T. perijanensis</i>		✓		✓		✓			✓	
<i>T. zulianus</i>	✓	✓			✓			✓		
<i>T. tenuicauda</i>				✓				✓		
<i>T. gonzalespongai</i>			✓	✓					✓	✓

**Tabla 1.** Identificación de los componentes de masa molecular más elevada en los venenos analizados. La determinación se realizó mediante la ecuación representada en la Figura 9, con la interpolación de la migración de cada banda presentada en la Figura 7.

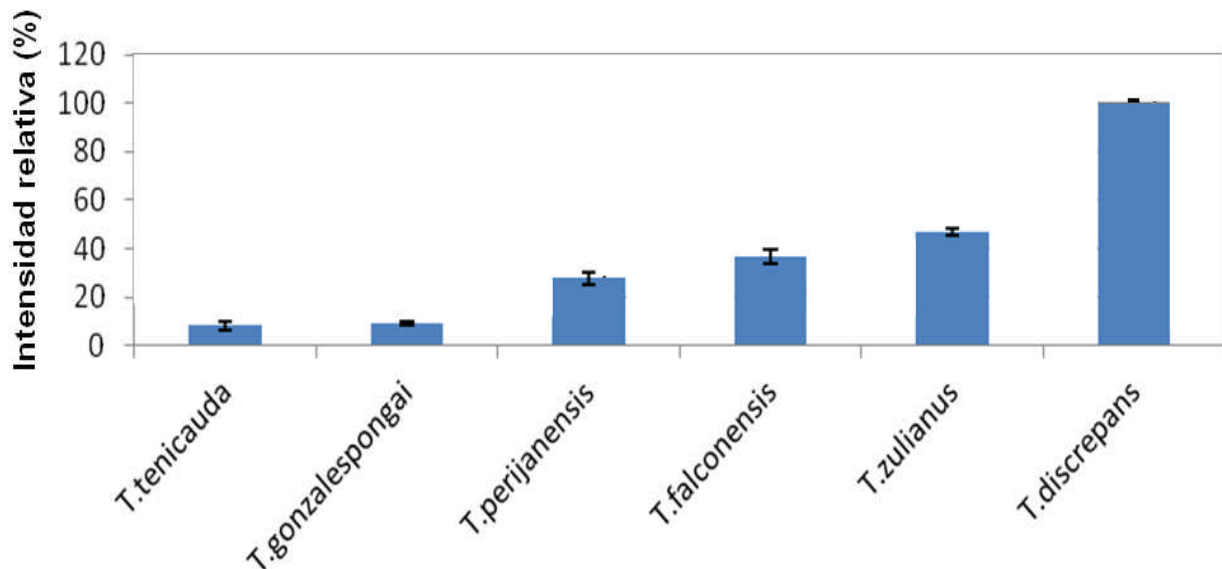
***Inmunodetección de las proteínas de los venenos de las especies en estudio reactivas hacia las inmunoglobulinas anti-*T. discrepans*.***

Se realizaron pruebas de inmunodetección con la finalidad de identificar los componentes proteicos de los venenos reconocidos por los anticuerpos antiescorpiónicos. Con este propósito, se llevó a cabo la prueba de “Western Blot” seguida por el análisis densitométrico de las bandas detectadas luego de la reacción antígeno-anticuerpo. La Figura 10 muestra un resultado representativo de esta prueba, en donde se evidencia que la reactividad hacia el veneno de *T. discrepans* por parte del antiveneno comercial es significativamente superior que en el caso del resto de los venenos. Se pone en evidencia que el antiveneno es capaz de reconocer la mayoría de los componentes presentes en los venenos en estudio, ya que se inmunodetectaron componentes de alta como de baja masa molecular. En particular, la intensidad del reconocimiento de los componentes de menor masa molecular, asociada a la fracción responsable de la neurotoxicidad de los venenos, es reconocida diferencialmente por el antiveneno, observación significativa si se toma en consideración que la intensidad de la tinción con Coomassie Blue es comparable entre estos componentes entre las distintas muestras analizadas (Figura 7).



**Figura 10.** Ensayo de inmunodetección en papel de nitrocelulosa o “immunoblot” al enfrentar los venenos de las diferentes especies en estudio contra el antiveneno anti-*T. discrepans*. SDS-PAGE fue efectuada bajo las mismas condiciones descritas en la Figura 7 y las proteínas electrotransferidas y detectadas según se describe en la sección de Métodos.

Se efectuó un análisis densitométrico con el fin de determinar la intensidad relativa del reconocimiento antigénico de las bandas de menor masa molecular (alrededor de 6.5 kDa) de cada uno de los venenos en estudio tomando como referencia (100%) la intensidad obtenida para la banda correspondiente a *T. discrepans* (Figura 11). La mayor intensidad relativa ( $n = 3$  mediciones, media  $\pm$  error estándar de la media) correspondió a *T. zulianus* ( $46 \pm 1,3\%$ ), seguida por *T. falconensis* ( $36 \pm 2,6\%$ ), *T. perijanensis* ( $27 \pm 2,3\%$ ), *T. tenicauda* ( $8,2 \pm 1,8\%$ ) y *T. gonzalespongai* ( $9,1 \pm 0,9\%$ ) (Figura 11). Puede también observarse que la migración electroforética de las proteínas inmunoreactivas de baja masa molecular difiere ligeramente entre cada veneno.

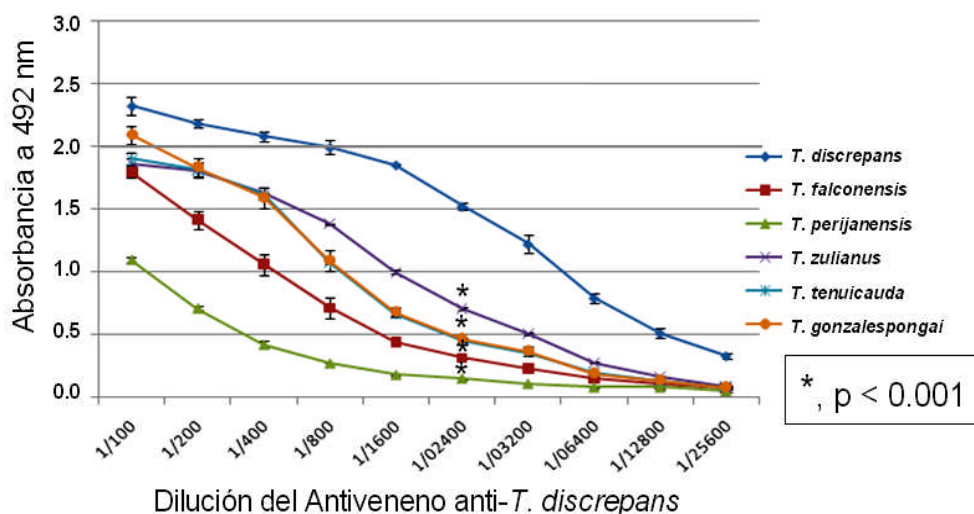


**Figura 11.** Análisis densitométrico de la reactividad obtenida por la técnica de “Western Blot” al enfrentar venenos de diferentes especies de escorpiones del género *Tityus* contra el antiveneno anti-*T. discrepans*, tomando en cuenta para el análisis las bandas de baja masa molecular que aparecen en la Figura 10. Los valores graficados corresponden al promedio de las intensidades relativas obtenidas en tres experimentos independientes para cada veneno. La barra que aparece asociada a cada valor corresponde a la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media.

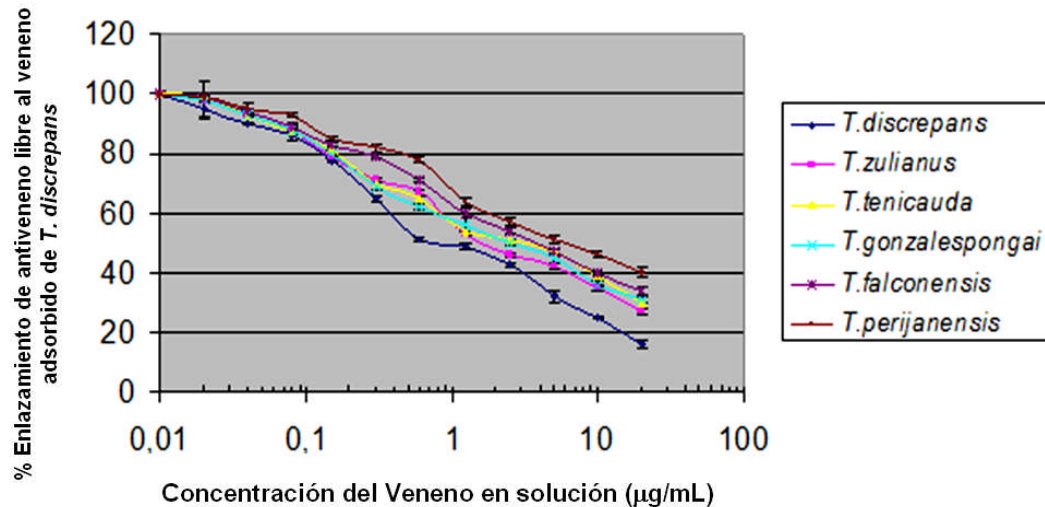
***Inmunodetección de las proteínas de los venenos de las especies en estudios reactivas hacia las inmunoglobulinas anti-*T. discrepans* mediante el ensayo de ELISA.***

Con el objeto de evaluar la reactividad antigénica de los venenos en estudio mediante un método alternativo al “Western Blot”, se llevó a cabo el ensayo de ELISA de titulación en el cual se enfrentaron cantidades equivalentes de los diferentes venenos (100 ng) a diluciones seriadas del antiveneno anti-*T. discrepans*.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12 e indican que existe reactividad por parte de todos los venenos en estudio contra el antiveneno anti-*T. discrepans*, aun cuando en un grado que depende de la especie originaria del veneno. A fin de determinar la significancia estadística de tales diferencias, se realizó una prueba de “*t*” de Student según se indica en la sección metodológica, con los valores de absorbancia correspondientes a la dilución de 1/2400 del antiveneno, ubicada en la porción lineal de las curvas obtenidas, hallándose que todos los venenos difieren significativamente ( $p < 0.001$ ) en reactividad con respecto al valor para *T. discrepans* a esa misma dilución, veneno contra el cual se prepararon originalmente los anticuerpos de origen equino.



**Figura 12.** Ensayo de ELISA de titulación para conocer la reactividad de los venenos totales (100 ng de proteína/pozo) en estudio hacia diluciones seriadas del antiveneno anti-*T. discrepans*. Los asteriscos indican la diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre los valores de absorbancia para la dilución 1/2400 y el valor de *T. discrepans* a la misma dilución. Cada valor graficado corresponde a la media aritmética de tres triplicados  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura 13.** Ensayo de ELISA de competencia para conocer la concentración inhibitoria de los venenos analizados sobre el enlace del antiveneno comercial al veneno adsorbido de *T. discrepans*. Cada valor graficado corresponde a la media aritmética de tres triplicados  $\pm$  error estándar de la media.

Como se mencionó arriba, el ensayo ilustrado en la Figura 12 también permite comparar el grado de reactividad antigénica que presentan los diferentes venenos entre sí y con respecto al de *T. discrepans*, siendo *T. perijanensis* el veneno menos reactivo, seguido por *T. falconensis* < *T. gonzalespongai* = *T. tenuicauda* < *T. zulianus*, si se toma en consideración las absorbancias diferenciales a 1/2400 de dilución del antiveneno.

Empleando la dosis de 1/2400 del antiveneno, se procedió a realizar un ELISA de competencia con la finalidad de determinar la eficacia de la fracción soluble de cada uno de los venenos estudiados en inhibir el reconocimiento de las inmunoglobulinas anti-*T. discrepans* por el veneno homólogo (*T. discrepans*), el cual fue adsorbido previamente a los pozos de la placas de microtitulación. La Figura 13 ilustra los resultados obtenidos. La reactividad se expresó como el porcentaje del antiveneno remanente en solución, el cual es función de la inhibición producida por la presencia del veneno en competencia (en concentraciones comprendidas entre 0.01 y 20 µg/mL) sobre el enlace de las inmunoglobulinas al veneno de *T. discrepans*.

Es evidente de la Figura 13 que ninguna de las curvas de competencia obtenidas para los diferentes venenos en estudio se solapó con la correspondiente a *T. discrepans*. Con los resultados obtenidos, se calculó la concentración de cada veneno a la cual se obtiene el 50% del enlazamiento de las inmunoglobulinas al veneno adsorbido de *T. discrepans*. En el caso del propio *T. discrepans*, esta concentración correspondió a 0.91 µg/ml. Para el resto de los venenos las concentraciones obtenidas fueron las siguientes (en µg/ml): 1.786 (*T. zulianus*); 3,125 (*T.tenuicauda*); 2,5 (*T. gonzalespongai*); 3,92 (*T. falconensis*) y 6,0 µg/mL para *T. perijanensis* (Figura 13).

## Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto diferencias antigénicas entre los venenos de las diferentes especies en estudio, lo cual podría explicar, al menos parcialmente, las observaciones realizadas por Borges y col. (2010), quienes sugieren la existencia de variaciones regionales (por especie) en los epitopes neutralizables de toxinas de los venenos del género *Tityus*, e indica que en paralelo a la diversidad taxonómica de las especies existen diferencias en la actividad, composición y en la antigenicidad de las toxinas de las especies de importancia médica en el país.

Reportes previos<sup>5</sup> indican que péptidos y proteínas de baja masa molecular (3-7 kDa) son los componentes principales de estos venenos. Esta observación fue corroborada en este trabajo al confirmar para las especies *T. discrepans*, *T. zulianus*, *T. perijanensis*, *T. tenuicauda* y *T. gonzalespongai* que las proteínas del veneno total que se encuentran en mayor proporción (65-96%) corresponden a las de más baja masa molecular (alrededor de 6,5 kDa). Estos componentes han sido clasificados en la literatura como las neurotoxinas activas sobre canales iónicos sensibles al voltaje, responsables de la mayoría de la letalidad y efectos fisiopatológicos de los venenos de escorpión<sup>5</sup>.

Los resultados obtenidos en este trabajo también permiten corroborar investigaciones previas acerca de la diversidad antigénica de las toxinas de los *Tityus* venezolanos en el sentido de que existen diferencias cuantitativas en su reactividad hacia el antiveneno antiescorpiónico comercial. Los resultados mostrados en las Figuras 10, 12 y 13 permiten cuantificar tal reactividad. Los ensayos de “inmunoblotting” (Figura 10) muestran que la reactividad de las proteínas de menor masa molecular, asociadas a la actividad neurotóxica y presentes en proporción equivalente en todos los venenos estudiados, es inferior al 50% de la intensidad del reconocimiento (por densitometría) de la banda que corresponde a *T. discrepans*, en los casos de las especies occidentales *T. falconensis*, *T. zulianus* y *T. perijanensis*. En

el caso de las especies orientales *T. tenuicauda* y *T. gonzalespongai* el reconocimiento es aún menor al 10% de la intensidad de los componentes de *T. discrepans*, sugiriendo la menor concentración en estos venenos de epitopes neutralizables por el antiveneno comercial y/o la presencia de componentes tóxicos estructuralmente aún más distantes de *T. discrepans* que aquellos que corresponden a las especies occidentales. La observación de que la migración electroforética de las neurotoxinas con reacción cruzada con *T. discrepans* varía ligeramente de un veneno a otro (Figura 10) es indicativo de diferencias en estructura primaria entre los componentes neurotóxicos, aún cuando una evaluación exacta de tales diferencias requeriría el empleo de un mayor número de marcadores en la zona de migración de las toxinas.

Los resultados de los ensayos del ELISA de titulación mostrados en la Figura 12 demuestran, de la misma manera que el “Western Blot”, la reactividad diferencial frente al antiveneno comercial. Todos los venenos estudiados reaccionaron con los anticuerpos anti-*T. discrepans* con una reducción significativa en la absorbancia a 492 nm (para la dilución de 1/2400) que comprenden desde el 53,3% (*T. zulianus*) hasta 90,1% (*T. perijanensis*) con respecto a *T. discrepans* en experimentos en donde los antígenos fueron enfrentados al antiveneno bajo idénticas condiciones\*. A diferencia de la prueba del “Western Blot”, el ensayo de ELISA no permite distinguir, en términos de reactividad antigénica, entre los componentes del veneno en vista de todos se hallan adsorbidos hidrofóbicamente a la placa de microtitulación. Sin embargo, tal reactividad total es igualmente dependiente de la especie de la que proviene el veneno, en el siguiente orden: *T. zulianus* > *T. gonzalespongai* = *T. tenuicauda* > *T. falconensis* > *T. perijanensis*. La mayor reactividad total de los venenos de las especies orientales en relación a *T. perijanensis* en la prueba de ELISA es posible que se deba a la contribución de los componentes de masa

---

\* La reducción en absorbancia a 492nm (A492) a la dilución de 1/2400 con respecto a *T. discrepans* fue calculada como:  $A_{492} T. discrepans - A_{492} \text{ Veneno en estudio} / A_{492} T. discrepans \times 100\%$ . Los restantes valores son: *T. falconensis* = 79,6 %; *T. tenuicauda* = 70,8 %; *T. gonzalespongai* = 69,1 %.



molecular elevada, los cuales en *T. tenuicauda* y *T. gonzalespongai* podrían compartir más epitopes antigénicos con las proteínas equivalentes en *T. discrepans* en comparación con *T. perijanensis*. Sin embargo, estas sugerencias deben aguardar hasta ser confirmadas cuando estas proteínas de masa molecular elevada sean finalmente aisladas y caracterizadas en estos venenos, cuyo rol, en el caso de las especies venezolanas aún es desconocido.

Sólo puede proponerse la posible identidad de algunas de ellas, como es el caso de la enzima hialuronidasa, con masa molecular de 51 kDa en *T. serrulatus*<sup>38</sup>, la cual se asemeja a la proteína de masa 54,9 kDa detectada en este trabajo en la mayoría de los venenos, o de la metaloproteasa zinc-dependiente de masa 44,5 kDa del escorpión asiático *Mesobuthus martensii*<sup>39</sup>, análoga al componente de 45,4 kDa detectado en los venenos de *T. discrepans*, *T. falconensis* y *T. zulianus* (Tabla 1). Ambas proteínas coadyuvan con la difusión de las neurotoxinas pero sin efecto fisiopatológico *per se*<sup>22</sup>.

El hecho de que los ensayos anteriores involucran o bien la adsorción de proteínas al poliestireno de placas de microtitulación (en ELISA) o su enlazamiento a papel de nitrocelulosa (en “Western Blot”) luego de su sometimiento a condiciones disociantes (SDS-PAGE), ambas condiciones que podrían comprometer la estructura antigénica nativa de las proteínas del veneno, se diseñó un ensayo de ELISA, ya previamente puesto a punto en el laboratorio<sup>37</sup>, con el objeto de determinar la reactividad de las proteínas del veneno en solución, tal y como son inyectadas por el escorpión fisiológicamente. Los resultados presentados en la Figura 13 muestran que cuando los venenos en estudio son analizados en condiciones nativas, los mismos son capaces de inhibir la reacción del antiveneno con el veneno adsorbido de *T. discrepans* en un grado que claramente depende de la especie productora del veneno, similarmente a lo observado en las pruebas anteriores. Ninguno de los venenos estudiados produjo curvas de competencia (a las mismas concentraciones) que se solaparan con la obtenida para *T. discrepans*, lo cual demuestra que sus determinantes antigénicos no son idénticos a los de la especie prevalente en el centro-norte del país

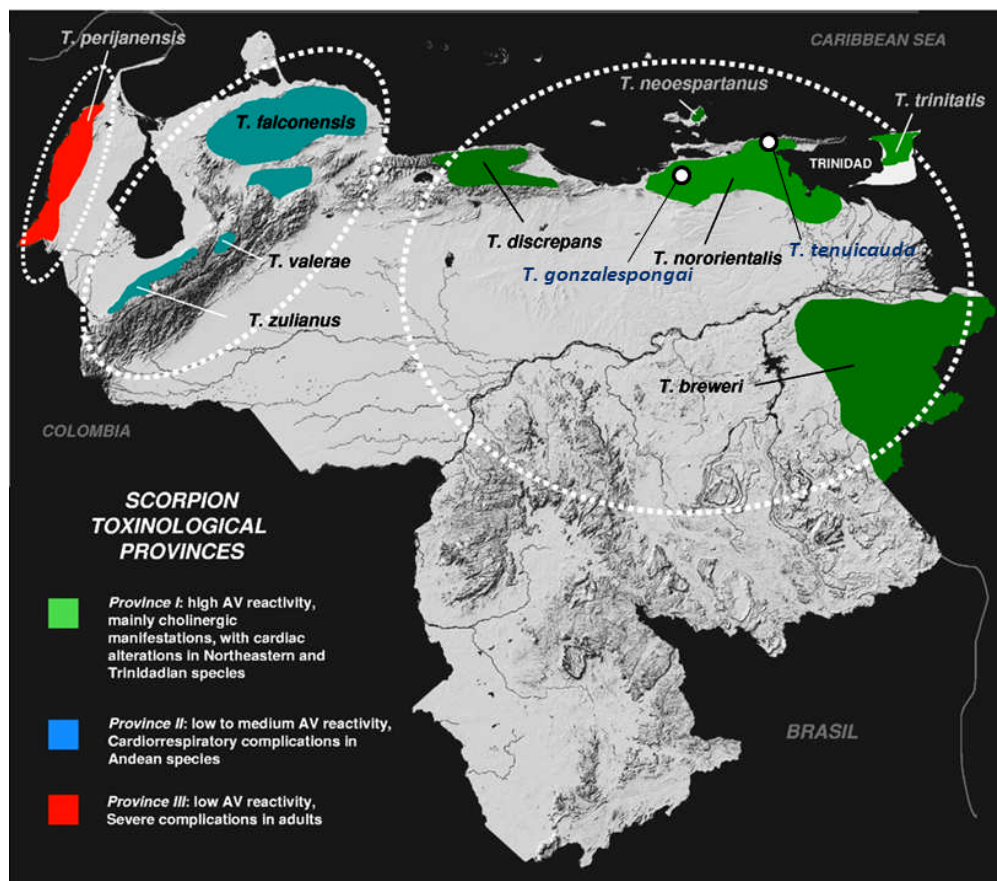
y que probablemente existen diferencias cuantitativas y/o cualitativas en los mismos. Independientemente del mecanismo que mejor explique las diferencias de reactividad antigénicas entre los venenos, la correlación que existe entre las reactividades obtenidas en las Figuras 12 y 13 es un indicio de que las condiciones en que las proteínas de los venenos son adsorbidas al poliestireno no afectan significativamente el acceso de los epítopos por los anticuerpos presentes en el antiveneno comercial

De manera significativa, la concentración de proteínas del veneno requerida para lograr el 50% del enlazamiento de anticuerpos en el caso de *T. zulianus* (1,79 µg/mL) y *T. perijanensis* (6,0 µg/mL) supera en 2 veces y 6 veces, respectivamente, la requerida para lograr el mismo porcentaje en el caso de *T. discrepans*, valores que guardan proporción con observaciones *in vivo* realizadas previamente en el laboratorio. En este sentido, Borges y col. (2006)<sup>11</sup> señalan que es necesario el uso de dos veces la cantidad de antiveneno anti-*T. discrepans* (en mg de proteínas) para neutralizar la acción tóxica del veneno de *T. zulianus*, mientras que Borges y col. (2005)<sup>19</sup> señalan que es necesario el uso de seis veces la cantidad del mismo antiveneno para neutralizar el efecto del veneno de la especie *T. perijanensis*. Si bien los presentes resultados no son extrapolables a la situación *in vivo*, en vista de que otras variables están envueltas, incluyendo aquellas que afectan la cinética de difusión de las toxinas y del antiveneno en el organismo intoxicado, la correlación hallada entre los valores reportados en este trabajo y la información toxicológica puede ser puesta a prueba futuramente mediante la determinación de la letalidad para otras especies de importancia (tal como *T. falconensis*) y su comparación con la concentración inhibitoria hallada en este trabajo, a fin de determinar si estas pruebas pueden ser predictores útiles de la situación *in vivo* y contribuir en la elaboración de un antiveneno de más amplio espectro de neutralización.

Los resultados obtenidos en este trabajo añaden evidencias adicionales que sustentan la elaboración de un mapa de riesgo para la escorpiofauna de importancia médica en Venezuela. Borges y col. (2010)<sup>22</sup> ya habían sugerido una división del país en provincias toxinológicas, en base a la relación filogenética, manifestaciones

clínicas y reactividad al antiveneno comercial, de las 10 especies de importancia en el país, la cual se ilustra en la Figura 14: Provincia I (nor-oriental y centro-norte), en la cual la reactividad al antiveneno es elevada; Provincia II (región andina y occidental), cuyas especies producen venenos con reactividad intermedia al antiveneno; Provincia III (Sierra de Perijá), cuya única especie prevalente (*T. perijanensis*) produce un veneno con pobre reactividad. Si bien los resultados de este trabajo confirman la existencia de las provincias II y III, indican que en el caso de la provincia I (nor-oriental del país) las especies prevalentes en la misma pueden producir neurotoxinas con escasa reactividad al antiveneno (Figura 10; para *T. tenuicauda* y *T. gonzalespongai*), aún cuando la especie responsable de la mayoría de los accidentes en el oriente es *T. nororientalis*, cuyo veneno es efectivamente neutralizado *in vivo* por el antiveneno anti-*T. discrepans*<sup>37</sup>. Sin embargo, estos resultados demandan cautela en la división taxinológica original del país, al poderse hallar en el futuro nuevas especies cuya fracción neurotóxica difiera en reactividad, independientemente de su origen geográfico. Un mejor predictor, en relación a la geografía, de la reactividad de las neurotoxinas podría resultar el estudio de la afinidad filogenética de las especies, el cual ha demostrado en el caso de *T. tenuicauda* y *T. gonzalespongai* la existencia de linajes evolutivos muy distantes en relación a todas las otras especies de *Tityus* analizadas en este estudio (A. Borges, comunicación personal).

A la espera de los nuevos estudios que permitan dilucidar algunas de las interrogantes originadas derivadas de este trabajo, es posible concluir que esta contribución corrobora hallazgos previos acerca de que la fauna de escorpiones del país, una de las más diversas del mundo taxonómicamente, también lo es así desde el punto de vista de la reactividad antigénica de sus toxinas, observación que tiene claras implicaciones clínicas y terapéuticas. La observación de que existe una correlación potencial entre la reactividad antigénica evaluada *in vitro* y los datos toxicológicos hallados *in vivo* demandan nuevos estudios a fin de establecer la utilidad de estas determinaciones en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra el escorpionismo en Venezuela.



**Figura 14.** Mapa de la República Bolivariana de Venezuela mostrando las provincias toxinológicas sugeridas por Borges y col. (2010)<sup>22</sup> para la escorpiofauna de importancia médica en el país, tomando en consideración su afinidad filogenética, la reactividad al antiveneno comercial y manifestaciones clínicas. La localización geográfica de las especies *T. tenuicauda* y *T. gonzalespongai*, empleadas en este trabajo, es indicada sobre el área de la provincia toxinológica I.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

1. El componente proteico que se encuentra en mayor proporción en todos los venenos de los escorpiones en estudio corresponde a aquellos de baja masa molecular (alrededor de 6.5 kDa), clasificados en la literatura como las neurotoxinas responsables del efecto tóxico de los venenos. Estos componentes se encuentran en una proporción que oscila entre el 65 y el 96% dependiendo de la especie.
2. El fraccionamiento electroforético de los venenos permitió establecer la existencia de componentes de elevada masa molecular (28.7 a 106.2 kDa) algunos de los cuales son comunes y otros exclusivos de cada veneno. Es posible que entre estos componentes se encuentren metaloproteasas y hialuronidasas que coadyuven con la difusión de las neurotoxinas en los tejidos de los organismos envenenados.
3. La aplicación de la técnica del “Western Blot” permitió determinar que los anticuerpos presentes en el antiveneno anti-*T. discrepans* reaccionan con la mayoría de las proteínas de los venenos en estudio, aun cuando este reconocimiento es diferencial. Particularmente, la fracción neurotóxica de *T. tenuicauda* y *T. gonzalespongai* fue significativamente menos reconocida que la de *T. discrepans*, seguida por *T. falconensis*, *T. zulianus* y *T. perijanensis*, sugiriendo la existencia de diferencias cuantitativas y/o cualitativas entre los epitopes antigénicos de sus proteínas tóxicas.
4. Los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA sugieren que la reactividad del antiveneno comercial *in vitro*, al menos en contra de los venenos de *T. zulianus* y *T. perijanensis*, se correlaciona con el grado de neutralización *in vivo* del mismo antiveneno, al requerirse dos veces más

anticuerpos para suprimir el efecto tóxico de *T. zulianus* y seis veces en el caso de *T. perijanensis*, lo cual se corresponde con los valores de competencia hallados *in vitro*. El valor predictivo de la prueba *in vitro* debe, sin embargo, someterse a validación adicional mediante el escrutinio del título de neutralización *in vivo* de otros de los venenos estudiados.

5. Los resultados de este trabajo confirman hallazgos previos que permitieron una división del territorio nacional en áreas de reactividad, a saber, las provincias toxinológicas I (centro-orientado), II (Andes y centro-occidente) y III (Sierra de Perijá) aunque demandan cautela en vista de que especies que habitan estas áreas endémicas pueden exhibir una reactividad antigénica no predicha geográficamente.

### **Recomendaciones**

1. La evaluación de la reactividad del antiveneno comercial hacia los venenos de otras especies de escorpiones diferentes a las utilizadas en este estudio, en especial aquellas que habitan el resto de las provincias toxinológicas propuestas por Borges y col. (2010)<sup>22</sup> y que han demostrado importancia médica.
2. La evaluación del título neutralizante del antiveneno *in vivo* hacia las especies *T. tenuicauda*, *T. falconensis* y *T. gonzalespongai* a fin de corroborar o descartar su correlación con los hallazgos de reactividad *in vitro*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- <sup>1</sup> Borges A, Bermingham E, Herrera N, Alfonzo M, Sanjur O. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. *Toxicon*. 2010; 55: 436-450.
- <sup>2</sup> De Sousa, L. Especie nueva de *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) de la Serranía del Turimiquire, Nororiente de Venezuela. Caracterización morfológica, geográfica y toxinológica. Trabajo de Ascenso a Profesor Asociado, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Barcelona, 2006; 167 pp.
- <sup>3</sup> Borges, A., De Sousa, L. Escorpionismo en Venezuela: Una Aproximación Molecular, Epidemiológica e Inmunológica para su Estudio. *Rev. Fac. Farmacia Caracas* 2006; 69:15-27.
- <sup>4</sup> Borges, A. Escorpionismo en Venezuela. *Acta Biologica Venezuelana* 1996; 16: 65-75.
- <sup>5</sup> Possani, LD; Becerril, B.; Delepierre, M. y Tytgat, J. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur J Biochem*.1999; 264: 287-300.
- <sup>6</sup> Loret, E. y Hammock, B. Structure and Neurotoxicity of Venoms. En: *Scorpion Biology and Research*. Eds: Oxford University Press 2001; 204-233.
- <sup>7</sup> Gazarian, KG; Gazarian, T.; Hernández, R.; Possani, LD. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine* 2005; 23: 3357–3368.
- <sup>8</sup> Borges, A.; Arandia, J.; Colmenares De Arias, Z.; Vargas, AM y Alfonzo, MJ. Caracterización Epidemiológica y Toxicológica del Envenenamiento por *Tityus zulianus* (Scorpiones, Buthidae) en el estado Mérida, Venezuela. *Rev Fac Medicina* (Caracas) 2002; 25: 76-79.

- <sup>9</sup> Mazzei De Dávila, CA; Dávila, DF; Donis, J.; Arata-Bellabarba, G.; Villarreal, V. Y Barboza, L. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 2002; 40: 1339-1346.
- <sup>10</sup> Borges A, De Sousa L, Espinoza J, Santos R, Kalapothakis E, Valadares D et al. Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian Antivenoms. *Toxicon*. 2008; 51: 66–79.
- <sup>11</sup> Borges, A., García, C.C., Lugo, E., Alfonzo, M.J., Jowers, M.J., Op den Camp, H.J.M. Long-chain toxin diversity in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): Molecular, immunological and mass spectral analyses. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology* 2006; 142C: 240-252.
- <sup>12</sup> Borges A., Arantes E.C, Giglio J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon* 1990; 28: 1011-1017.
- <sup>13</sup> Borges A., Alfonzo M., García C, Winand N, Leipold E., Heinemann, S. Isolation, Molecular Cloning, and Functional Characterization of a Novel beta-Toxin from the Venezuelan Scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon*.2004; 43: 671-684.
- <sup>14</sup> Borges A, Trejo E, Vargas A.M, Hernández A., Céspedes G, Alfonzo M. Pancreatic Toxicity in Mice Elicited by *Tityus discrepans* and *Tityus zulianus* Scorpion Venoms. *Investigación Clínica* 2004; 45: 269-274.
- <sup>15</sup> Poggioli de Scannone, J. Suero antiescorpiónico. *J. Animal VenomsToxins* 1997; 4:355.



- <sup>16</sup> Nishikawa AK, Caricati CP, Lima ML, Dos Santos MC, Kipnis TL, Eickstedt VR, Knysa KI. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian Scorpions. *Toxicon*. 1994; 32(8):989-98.
- <sup>17</sup> Borges, A., Tsushima, R.G., Backx, P.H. Antibodies against *Tityus discrepans* do not abolish the effect of *Tityus serrulatus* venom on the rat sodium and potassium channels. *Toxicon*. 1999; 37: 661-687.
- <sup>18</sup> Mota, JV; Ghersy De Nieto, MT; Bastardo, M.; Rodríguez, J.; Duque, L. Y Freytez, LA. Emponzoñamiento escorpiónico: clínica y laboratorio usando antivenina. *BolHosp Niños Caracas* 1994; 30: 35-40.
- <sup>19</sup> Borges, A.; Lugo, E.; Rojas, F. y García, C. Toxicidad del Veneno del Escorpión *Tityus perijanensis* y Neutralización por el Antiveneno Anti-*Tityus discrepans*. *Acta CientVenez*. 2005. 56 (Supl. 1): 67.
- <sup>20</sup> Barona J, Otero R, Nuñez V. Aspectos toxicológicos e inmunoquímicos del veneno de escorpión *Tityus pachyurus*. Colombia. *Biomedica*. 2004; 24(1):9-42.
- <sup>21</sup> D'Suze G, Moncada S, González C, Sevcik C, Alagón A. Antigenic cross-reactivity between sixteen venoms from scorpions belonging to six genera. *Clin Toxicol (Phila)*. 2007; 45(2):158-63.
- <sup>22</sup> Borges A, Rojas-Runjaic F, Diez N, Faks J.G. Envenomation by the Scorpion *Tityus breweri* in the Guayana Shield, Venezuela: Report of a Case, Efficacy and Reactivity of Antivenom, and Proposal for a Toxinological Partitioning of the Venezuelan Scorpion Fauna. *Wilderness & Environmental Medicine*. 2010; 21:282–290.
- <sup>23</sup> Gonzalez- Sponga, MA. Escorpiones de Venezuela. Cuadernos Lagoven. Lagoven, S. A. Caracas – Venezuela. 1984. 128 p.

<sup>24</sup> Suarez E, Velásquez Y. Producción de Inmunoglobulina derivada de huevo de gallina contra el veneno de escorpión *Tityus caripitensis*. [Tesis de grado] Universidad de Oriente. Ciudad Bolívar 2010. [2 de mayo del 2013] PDF disponible <http://ri.biblioteca.udo.edu.ve/bitstream/123456789/2846/1/08-tesis.PRODUCCI%C3%93N%20DE%20INMUNOGLOBULINA.pdf>

<sup>25</sup> Polikarpov, I.; Sanches, Matilde M.; Marangoni, S.; Toyama, Mh Y Teplyakov, A.. Crystal Structure of Neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* Provides Insights into the Specificity and Toxicity of Scorpion Toxins. *J Mol Biol.* 1999; 290: 175-184.

<sup>26</sup> Poggioli de Scannone, J. Suero antiescorpiónico. Desarrollo y producción. En: Resúmenes del I Taller los Escorpiones y sus Toxinas, Biología, Clínica y Toxicología. Eds: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, 1996. p. 11.

<sup>27</sup> Abbas AbulK, Lichtman Andrew H, Pober Jordan S. *Inmunología Celular y Molecular*. 3era Ed. Madrid Editorial Mc Graw Hill; 1999.

<sup>28</sup> Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76 (7): 3116–3120.

<sup>29</sup> Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76 (9): 4350–4354.

<sup>30</sup> Stachel, S.J., Stockwell, S.A., Van Vranken, D.L. The fluorescence of scorpions and cataractogenesis. *Chem. Biol.* 1999; 6: 531-539.

<sup>31</sup> González-Sponga, M.A. Guía para Identificar Escorpiones de Venezuela. Cuadernos Lagoven, Caracas- Venezuela. 1996. 203 p.

<sup>32</sup> Shulov, A. Zlotkin E. A simple device for collecting scorpion venom. *Toxicon*. 1969. 2: 169-170.

<sup>33</sup> Henaó L, Duarte M, Agreda J, Gomez F. Ley de Bourguer- Lambert-Beer. Errores en espectrofotometría. Marco Teórico Química Analítica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá-Colombia. [10 de enero del 2014]. Disponible en: [http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2001184/lecciones/Cap09/05\\_01\\_01.htm](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2001184/lecciones/Cap09/05_01_01.htm)

<sup>34</sup> Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970; 227:680-685.

<sup>35</sup> Borges A, Rojas-Runjaic FJ. *Tityus perijanensis* González-Sponga (Scorpiones, Buthidae): molecular assessment of its geographical distribution and venom lethality of Venezuelan populations. *Toxicon*. 2007;50(7):1005-110.

<sup>36</sup> Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher Jr, P.L., Erickson, B.W. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1977;180(2):394-403.

<sup>37</sup> De Sousa L, Borges A, Vásquez-Suárez A, Op den Camp HJ, Chadee-Burgos RI, Romero-Bellorín M, Espinoza J, De Sousa-Insana L, Pino-García O. Differences in venom toxicity and antigenicity between females and males *Tityus nororientalis* (Buthidae) scorpions. *J Venom Res*. 2010;1:61-70.

<sup>38</sup> Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, Arantes EC. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*. 2001;39(10):1495-1504.

<sup>39</sup> Xia X, Ma Y, Xue S, Wang A, Tao J, Zhao Y, Zhang Q, Liu R, Lu S. Cloning and molecular characterization of BumaMPs1, a novel metalloproteinase from the venom of scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon*. 2013;76:234-238