



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS  
CÁTEDRA DE FISIOLÓGÍA

**EFECTO DE LA CLONIDINA SOBRE LA PANCREATITIS AGUDA  
INDUCIDA POR EL VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus discrepans***

Trabajo presentado por el Profesor Instructor Andrés Eloy Rodríguez González, como requisito parcial para su ascenso en el escalafón universitario a la categoría de Profesor Asistente, de acuerdo con el Artículo 77 del Reglamento del Personal Docente y de Investigación de la Universidad Central de Venezuela.

Tutora: Profesora Ana Zuley Ruíz, M.V., Ph.D.

Febrero de 2012

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi padre, fuente inagotable de inspiración.

A mi madre, mujer maravillosa, testigo y artífice silente de mis modestos logros.

A mis hermanos, hermanas, sobrinas y sobrinos, orgullo y motivo de mi vida.

A los demás hombres y mujeres que han iluminado mi camino.

Y, de manera especial, a los miles de niños que anualmente sufren las consecuencias del envenenamiento escorpiónico.

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, profesora Ana Ruíz, cuyo apoyo incondicional permitió la realización de este trabajo.

Al profesor Héctor Zerpa, cuya humildad, solidez intelectual y amor por la academia nos animan siempre a seguir adelante.

Al profesor Fuad Lechin, en cuyas clases de Psiconeuroinmunología surgieron ideas valiosas para la realización de este trabajo.

Al profesor Marcelo Alfonzo, cuya amistad, enseñanzas y orientaciones oportunas en ámbitos diversos, han sido importantes en mi formación científica y personal.

Al profesor Ernesto Trejo, contertulio en la ciencia y en el arte.

Al profesor Adolfo Borges, por brindarme la posibilidad de asomarme al fascinante mundo de los escorpiones.

Al profesor Mario Rossini, por su amistad y apoyo constante en el laboratorio.

A la profesora Lourdes Gutiérrez, por su colaboración incondicional e interés en la consecución de este proyecto.

Al profesor Abelardo Morales, por su valioso apoyo en los experimentos preliminares.

Al profesor Saúl Villasmil, por su generosa ayuda en la obtención de reactivos.

Al histotecnólogo Francisco García, cuya destreza y buena disposición permitieron la adecuada preparación de los especímenes para el análisis histológico.

Al bachiller Arturo García, cuya colaboración incondicional hizo posible la realización exitosa de diversos experimentos.

Al profesor Víctor Bermúdez, por su apoyo invaluable en la revisión de las preparaciones histológicas.

A la profesora Tatiana Pérez de Altamirano, por su generosa colaboración en el mantenimiento de los animales de experimentación.

Al profesor Simón Comerma, por su ayuda en la ubicación de separatas.

Al profesor Jesús Rojas, por sus valiosas sugerencias para mejorar la forma del documento impreso.

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV), por financiar esta investigación a través del Proyecto Individual N° 11-7587-2009.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

POR LO ARDUO CAMINA LA VIRTUD

Séneca

## RESUMEN

El escorpión *Tityus discrepans* habita áreas densamente pobladas de la región norcentral de la República Bolivariana de Venezuela. Éste produce un veneno altamente tóxico, el cual induce, al ser inyectado, una excesiva activación de las funciones autonómica e inmunológica, generando respuestas fisiopatológicas tales como pancreatitis y desórdenes gastrointestinales. Ya que los agonistas de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ( $\alpha_2$ -AR) pueden modular la actividad del sistema nervioso autonómico, produciendo una disminución abrupta de la secreción pancreática exocrina, se estudió el efecto de la clonidina (agonista selectivo de  $\alpha_2$ -AR) sobre el nivel de  $\alpha$ -amilasa sérica y otros indicadores clínicos modificados por el efecto del veneno de *T. discrepans*. En experimentos preliminares, ratones CD1 machos ( $20 \pm 2$  g; n = 2-5) fueron inyectados por la vía subcutánea (sc) con una dosis subletal de veneno (0,83  $\mu$ g/g), 0,1  $\mu$ g/g de clonidina o solución fisiológica (NaCl al 0,9 %). Se anestesiaron y se extrajeron muestras de sangre a las 0, 3, 6, 12 y 24 h. Se realizó ensayo enzimático colorimétrico en suero para determinar la glicemia y las actividades  $\alpha$ -amilasa y lactato deshidrogenasa (LDH). La clonidina indujo marcada hiperglicemia 1 h postinyección, mientras que el veneno generó menor hiperglicemia, con un nivel máximo a las 6 h. Dosis crecientes de veneno (0,83  $\mu$ g/g hasta 2,54  $\mu$ g/g) no indujeron ningún cambio significativo en los niveles de actividad  $\alpha$ -amilasa sérica o LDH. Sin embargo, una dosis superior (3,77  $\mu$ g/g), inyectada por las vías sc o intraperitoneal (ip), aumentó la actividad LDH, independientemente de la vía de administración utilizada. La actividad  $\alpha$ -amilasa sérica no mostró ningún cambio significativo, a diferencia de la actividad  $\alpha$ -amilasa urinaria. En un segundo grupo de experimentos, ratones BALB/c machos ( $28 \pm 2$  g; n = 5) pretratados con clonidina (0,1  $\mu$ g/g, 1 h antes) fueron inyectados con una dosis de 1  $\mu$ g/g de veneno. A las 6 h, los animales fueron anestesiados y se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca y orina por cistocentesis. Se evidenció el incremento significativo de la actividad LDH, de la  $\alpha$ -amilasa urinaria y el nitrógeno ureico sanguíneo (NUS). No se observaron diferencias significativas en la glicemia, en la actividad  $\alpha$ -amilasa sérica, la creatinina sérica, o la creatinina y la urea urinarias. Por otra parte, se observó neutrofilia y linfopenia. En un tercer grupo de experimentos, ratones BALB/c machos ( $20 \pm 2$  g; n = 5-11) fueron

inyectados vía ip con una dosis de 1 µg/g de veneno y posteriormente tratados con clonidina (0,1 µg/g, 30 min después) o solución fisiológica. Las dosis de clonidina fueron repetidas cada 2 h, tres veces. A las 6 h, los ratones envenenados no mostraron hiperglicemia. La clonidina indujo una marcada hiperglicemia, y tuvo acción sinérgica con el veneno. La actividad LDH aumentó en los ratones envenenados, efecto que no fue modificado por la clonidina. La actividad α-amilasa sérica no aumentó significativamente en los ratones envenenados, pero el tratamiento con clonidina redujo significativamente el nivel de este indicador. Se observaron severas alteraciones histopatológicas en diversos órganos. El páncreas mostró vacuolización, infiltrado inflamatorio y hemorragia; los pulmones: infiltrado inflamatorio, edema y hemorragia; y los riñones: distensión tubular, hemorragia e infiltrado inflamatorio. El área bidimensional de la región acidófila (gránulos de zimógeno) de los acinos pancreáticos en los ratones envenenados disminuyó en relación con los controles, efecto reducido por la clonidina. La actividad α-amilasa urinaria no aumentó significativamente en los ratones tratados con veneno, en relación con los controles; la clonidina no tuvo efecto sobre este indicador en los animales envenenados. El NUS mostró un incremento significativo en los animales tratados con el veneno, efecto disminuido por la clonidina. La urea en orina no cambió, excepto al comparar el nivel obtenido en los ratones tratados con clonidina versus el obtenido en ratones tratados con veneno más clonidina. La creatinina sérica aumentó significativamente en los ratones envenenados, efecto reducido por la clonidina. El valor de creatinina urinaria disminuyó significativamente en ratones tratados con clonidina, pero no hubo efecto del veneno. El veneno indujo neutrofilia y linfopenia, efecto no revertido por la clonidina. En conclusión, el veneno del escorpión *Tityus discrepans* generó pancreatitis, alteraciones pulmonares, falla renal aguda, hiperglicemia en algunos casos, linfopenia y neutrofilia en ratones. El veneno indujo aumento de la actividad LDH, pero no de la actividad α-amilasa sérica. La clonidina redujo el nivel de actividad α-amilasa sérica tanto en animales envenenados como en controles, tuvo efecto sinérgico hiperglicemiante con el veneno e impidió el aumento del NUS y de la creatinina sérica. En conjunto, los resultados sugieren que los agonistas de los α<sub>2</sub>-AR podrían constituir una herramienta terapéutica en el tratamiento del escorpionismo, por lo cual deben realizarse experimentos adicionales para explorar esa posibilidad.

## ABSTRACT

The scorpion *Tityus discrepans* inhabits densely populated areas of the northern-central region of the Bolivarian Republic of Venezuela. It produces a highly toxic venom, which induces, after injection, an excessive activation of the autonomic nervous system and immunologic functions, leading to pathophysiologic responses such as pancreatitis and gastro-enteric disorders. Since  $\alpha_2$ -adrenoceptor ( $\alpha_2$ -AR) agonists modulate the autonomic nervous system outflow, causing an abrupt interruption of exocrine pancreatic secretion, the aim was to study the effect of clonidine (a selective  $\alpha_2$ -AR agonist) on serum  $\alpha$ -amylase activity and other clinical markers modified by the effect of *T. discrepans* venom. In a series of pilot studies, CD1 male mice ( $20 \pm 2$  g;  $n = 2-5$ ) were subcutaneously (sc) injected with a sublethal dose of venom ( $0.83 \mu\text{g/g}$ ), clonidine ( $0.1 \mu\text{g/g}$ ), or 0.9 % NaCl (saline). These mice were anesthetized and blood samples were withdrawn at 0, 3, 6, 12, and 24 h. Glycemia, as well as  $\alpha$ -amylase and lactate dehydrogenase (LDH) activities, were measured on serum samples by colorimetric-enzymatic methods. Clonidine caused marked hyperglycemia after 1 h, while venom caused a lower hyperglycemia, reaching a maximum level at 6 h. Increasing doses ( $0.83 \mu\text{g/g}$  to  $2.54 \mu\text{g/g}$ ) of venom did not modify serum  $\alpha$ -amylase and LDH activities. However, a higher dose ( $3.77 \mu\text{g/g}$ ) using the intraperitoneal (ip) and sc routes, significantly increased LDH activity, regardless of the administration route. Unlike serum  $\alpha$ -amylase, urinary  $\alpha$ -amylase increased in venom-treated mice. In a second set of experiments,  $1 \mu\text{g/g}$  of venom was injected via ip in clonidine-pretreated ( $0.1 \mu\text{g/g}$ ; 1 hour before) BALB/c male mice ( $28 \pm 2$  g;  $n = 5$ ). After six hours, animals were anesthetized and samples of blood and urine were withdrawn by cardiac puncture and cystocentesis, respectively. Significant increases in LDH activity, urinary  $\alpha$ -amylase and blood urea nitrogen (BUN) were detected. Glycemia, serum  $\alpha$ -amylase activity, serum creatinine, and urine creatinine and urea were similar between venom-treated and control mice. Moreover, neutrophilia and lymphopenia were evidenced. In a third group of experiments,  $1 \mu\text{g/g}$  of venom was injected via ip in BALB/c male mice ( $20 \pm 2$  g;  $n = 5-11$ ), followed by treatment with clonidine ( $0.1 \mu\text{g/g}$ ; 30 min) or saline as control. Clonidine doses were repeated every 2 h for three times. At 6 h, it was shown hyperglycemia in clonidine-treated mice, but not in envenomed mice. Besides, clonidine synergized with the venom, inducing a higher hyperglycemia than clonidine alone. The LDH activity increased

significantly in venom-treated mice. Clonidine did not modify this effect. Serum  $\alpha$ -amylase activity did not rise significantly in venom-treated mice; however, clonidine reduced the value of this marker. Histopathological analysis showed severe organ damage in venom-treated mice. The pancreas evidenced vacuolization, inflammatory infiltrate and hemorrhage; lungs: inflammatory infiltrate, edema and hemorrhage; and kidneys: tubular distention, hemorrhage, and inflammatory infiltrate. Acidophilic (zymogen granules) bidimensional area within pancreatic acini of venom-treated mice was significantly reduced, compared to control animals. This effect was diminished by clonidine. Urine  $\alpha$ -amylase activity did not significantly increased compared to control; this effect was clonidine-resistant. The BUN concentration increased in venom-treated mice against control group, an effect diminished by clonidine. Urine urea concentration was lower in clonidine-treated mice in comparison to clonidine-treated envenomed mice. Serum creatinine significantly increased in venom-treated mice; an effect reduced by clonidine. In clonidine-treated mice, urine creatinine value was significantly reduced, but venom did not affect this marker. The venom produced neutrophilia and lymphopenia. This hematological effect was clonidine-resistant at the evaluated dose. In summary, *Tityus discrepans* scorpion venom caused pancreatitis, lung damage, acute renal failure, hyperglycemia (depending on the experimental method), lymphopenia and neutrophilia in mice. Although the venom raised LDH activity, it did not change serum  $\alpha$ -amylase activity. Clonidine lowered serum  $\alpha$ -amylase activity both in control and venom-treated mice. Clonidine also synergized with the venom inducing a higher hyperglycemia than clonidine alone, and reduced the raise of BUN and serum creatinine. Overall, the results discussed herein suggest that  $\alpha_2$ -AR agonists could be a potential therapeutic tool in the treatment of scorpionism; therefore, further additional experiments should be conducted to explore this possibility.

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	viii
INDICE GENERAL .....	x
INDICE DE FIGURAS .....	xiii
INDICE DE TABLAS .....	xvi
LISTA DE APÉNDICES .....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	18
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	20
1. ESCORPIONES Y ESCORPIONISMO .....	20
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES .....	20
1.2. SITUACIÓN EN LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA .....	20
2. EL VENENO DE LOS ESCORPIONES .....	22
3. TOXINAS RESPONSABLES DE LA LETALIDAD EN VERTEBRADOS .....	22
3.1. NEUROTOXINAS DE CADENA LARGA .....	23
3.1.1. TOXINAS $\alpha$ .....	23
3.1.2. TOXINAS $\beta$ .....	24
3.2. NEUROTOXINAS DE CADENA CORTA .....	25
4. POLIMORFISMO ESTRUCTURAL DE LAS NEUROTOXINAS .....	25
5. CLÍNICA DEL ESCORPIONISMO .....	29
6. ESCORPIONISMO Y PANCREATITIS .....	32
6.1. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA EXOCRINA ..	32

	<b>Página</b>
6.2. LA PANCREATITIS AGUDA ASOCIADA AL ESCORPIONISMO ..	34
7. TRATAMIENTO DEL ENVENENAMIENTO ESCORPIÓNICO .....	36
7.1. MANEJO FARMACOLÓGICO .....	36
7.2. ANTIVENENOS .....	36
8. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	38
MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
1. VENENOS Y FÁRMACO .....	40
2. ANIMALES .....	40
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	41
3.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES: EFECTO DEL VENENO DE <i>Tityus discrepans</i> Y LA CLONIDINA SOBRE ALGUNOS INDICADORES DE QUÍMICA CLÍNICA EN RATONES CD1 .....	41
3.2. EFECTO DEL VENENO DE <i>Tityus discrepans</i> EN RATONES BALB/c PRETRATADOS CON CLONIDINA .....	41
3.3. EFECTO DE LA CLONIDINA EN RATONES BALB/c PREVIAMENTE INYECTADOS CON VENENO DE <i>Tityus discrepans</i> .....	43
4. QUÍMICA CLÍNICA .....	44
4.1. GLICEMIA .....	44
4.2. ALFA-AMILASA .....	44
4.3. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).....	45
4.4. NITRÓGENO UREICO SANGUÍNEO (BUN)/UREA .....	45
4.5. CREATININA .....	45
5. HEMATOLOGÍA COMPLETA .....	45

	<b>Página</b>
6. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO .....	46
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	46
RESULTADOS .....	48
1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES: EFECTO DEL VENENO DE <i>Tityus</i> <i>discrepans</i> Y DE LA CLONIDINA SOBRE ALGUNOS INDICADORES DE QUÍMICA CLÍNICA EN RATONES CD1 .....	48
2. EFECTO DEL VENENO DE <i>Tityus discrepans</i> EN RATONES BALB/c PRETRATADOS CON CLONIDINA .....	51
3. EFECTO DE LA CLONIDINA EN RATONES BALB/c PREVIAMENTE INYECTADOS CON VENENO DE <i>Tityus discrepans</i> .....	54
3.1. QUÍMICA CLÍNICA Y LEUCOGRAMA .....	54
3.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO .....	57
DISCUSIÓN .....	61
1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES: EFECTO DEL VENENO DE <i>Tityus</i> <i>discrepans</i> Y LA CLONIDINA SOBRE ALGUNOS INDICADORES DE QUÍMICA CLÍNICA EN RATONES CD1 .....	61
2. EFECTO DEL VENENO DE <i>Tityus discrepans</i> EN RATONES BALB/c PRETRATADOS CON CLONIDINA .....	63
3. EFECTO DE LA CLONIDINA EN RATONES BALB/c PREVIAMENTE INYECTADOS CON VENENO DE <i>Tityus discrepans</i> .....	65
4. CONCLUSIÓN .....	68
APÉNDICE .....	70
REFERENCIAS .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Localización aproximada de las especies de escorpiones de mayor importancia médica en la República Bolivariana de Venezuela .....	21
Figura 2. Modelo estructural de la toxina $\alpha$ AaH2 y la toxina $\beta$ Cn2 .....	23
Figura 3. Topología de la subunidad $\alpha$ formadora de poros del canal $\text{Na}_v$ y sitios de unión de las neurotoxinas de cadena larga .....	24
Figura 4. Modelo estructural de la toxina de cadena corta Charibdotoxina .....	25
Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de algunas toxinas de cadena larga y de la anatoxina TsNTxP, provenientes de escorpiones del género <i>Tityus</i> .....	26
Figura 6. Alineamiento de aminoácidos de un segmento de la anatoxina TsNTxP (NTP) y de las toxinas TsII, TsVII y TsIV .....	27
Figura 7. Representación del epítipo de mAbTs1 y de los residuos del farmacoforo en la $\alpha$ -hélice de TsVII .....	28
Figura 8. Reactividad cruzada del suero policlonal anti-TstFG <sub>50</sub> con diferentes venenos de escorpiones y arañas .....	29
Figura 9. Principales núcleos monoaminérgicos que se proyectan a motoneuronas pancreáticas vagales .....	33
Figura 10. Inervación autonómica de los ganglios pancreáticos .....	34
Figura 11. Esquema del protocolo experimental 2: Efecto del veneno de <i>Tityus discrepans</i> en ratones BALB/c pretratados con clonidina .....	42
Figura 12. Esquema del protocolo experimental 3: Efecto de la clonidina en ratones BALB/c previamente inyectados con veneno de <i>Tityus discrepans</i> .....	43

	<b>Página</b>
Figura 13. Manifestaciones clínicas post-inyección del veneno de <i>Tityus discrepans</i> en ratones CD1 .....	48
Figura 14. Efecto del veneno de <i>Tityus discrepans</i> y la clonidina sobre la glicemia en ratones CD1 .....	49
Figura 15. Efecto de dosis crecientes del veneno de <i>Tityus discrepans</i> sobre las actividades séricas lactato deshidrogenasa y $\alpha$ -amilasa sérica en ratones CD1 .....	50
Figura 16. Efecto de la vía de administración (intraperitoneal o subcutánea) sobre las actividades lactato deshidrogenasa sérica, $\alpha$ -amilasa sérica y $\alpha$ -amilasa urinaria en ratones CD1 .....	51
Figura 17. Efecto de la inyección intraperitoneal del veneno de <i>Tityus discrepans</i> en ratones BALB/c pretratados con clonidina sobre la glicemia y las actividades lactato deshidrogenasa sérica, $\alpha$ -amilasa sérica y $\alpha$ -amilasa urinaria .....	52
Figura 18. Efecto de la inyección intraperitoneal del veneno de <i>Tityus discrepans</i> en ratones BALB/c pretratados con clonidina sobre el nitrógeno ureico sanguíneo, urea urinaria, creatinina sérica y creatinina urinaria .....	53
Figura 19. Efecto de la inyección intraperitoneal del veneno de <i>Tityus discrepans</i> sobre el leucograma en ratones BALB/c pretratados o no con clonidina ...	54
Figura 20. Efecto de la inyección intraperitoneal de clonidina cada 2 h, sobre la glicemia y las actividades $\alpha$ -amilasa sérica, $\alpha$ -amilasa urinaria y lactato deshidrogenasa en ratones BALB/c previamente inyectados vía intraperitoneal con veneno de <i>Tityus discrepans</i> .....	55

Figura 21. Efecto de la inyección de clonidina cada 2 h en ratones BALB/c  
 previamente inyectados con veneno de *Tityus discrepans*, sobre el  
 nitrógeno ureico sanguíneo, urea urinaria, creatinina sérica y  
 creatinina urinaria. . . . . 56

Figura 22. Efecto de la inyección intraperitoneal de clonidina sobre el leucograma  
 en ratones BALB/c previamente inyectados con veneno de  
*Tityus discrepans* . . . . . 57

Figura 23. Cambios histopatológicos inducidos por la inyección intraperitoneal del  
 veneno de *Tityus discrepans* en ratones BALB/c . . . . . 58

Figura 24. Microfotografías de páncreas provenientes de ratones BALB/c inyectados  
 con veneno de *Tityus discrepans* por la vía intraperitoneal, tratados o no  
 con clonidina . . . . . 59

Figura 25. Efecto del tratamiento con clonidina en ratones previamente inyectados  
 con veneno de *Tityus discrepans* sobre el área en la región acidófila  
 (gránulos de zimógeno) de los acinos pancreáticos . . . . . 60

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Neutralización <i>in vivo</i> del veneno de <i>T. discrepans</i> y <i>T. zulianus</i> con antiveneno anti- <i>T. discrepans</i> .....	31

## LISTA DE APÉNDICES

	<b>Página</b>
Figura 1. Condiciones de mantenimiento de los animales de laboratorio .....	70
Figura 2. Extracción del veneno de los escorpiones .....	70
Figura 3. Calibración con albúmina sérica bovina (BSA) para determinación de proteínas por el método de Lowry (1951) .....	71

## INTRODUCCIÓN

El escorpionismo constituye un problema de salud pública a nivel mundial, particularmente en las regiones tropicales y subtropicales (Chippaux y Goyffon, 2008). En nuestro país se presentó, para el período comprendido entre los años 1996 y 2000, una incidencia de 49 casos de escorpionismo, con una mortalidad de 0,42 por millón de habitantes y una amplia variabilidad geográfica en términos taxonómicos y toxinológicos (Borges y De Sousa, 2006). El crecimiento acelerado de la población en los hábitats del género *Tityus* constituye un factor determinante del incremento del número de casos de escorpionismo (Borges, 1996), como ha sido evidenciado en estudios retrospectivos llevados a cabo en algunas de las áreas endémicas en nuestro país (Borges *et al.*, 2002). La letalidad del veneno de los escorpiones en los vertebrados está íntimamente relacionada con la presencia de toxinas de cadena larga, que son activas contra canales de sodio en tejidos excitables (Chávez-Olórtegui y Kalapothakis, 1997). Éstas inducen la liberación masiva de neurotransmisores como acetilcolina y norepinefrina, ocasionando una “tormenta autonómica” (Freire-Maia *et al.*, 1994; Freire-Maia, 1995). Las variaciones en la composición del veneno o en la cantidad inyectada según la especie de escorpión, pueden determinar cambios en la presentación clínica del escorpionismo. De hecho, el envenenamiento por la picadura del escorpión *Tityus zulianus* con frecuencia produce arresto respiratorio y muerte por edema pulmonar (Borges *et al.*, 2002; Mazzei de Dávila *et al.*, 2002), mientras que el envenenamiento por la picadura de *Tityus discrepans* principalmente causa desórdenes gastrointestinales y pancreáticos (Mota *et al.*, 1994).

El desarrollo de pancreatitis aguda es prominente en casos de escorpionismo por el género neotropical *Tityus* (Bartholomew, 1970; Fletcher *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 2004). Al menos en el caso de *T. trinitatis*, la pancreatitis aguda parece resultar de hiperestimulación de los acinos pancreáticos y constricción del mecanismo ampular (Bartholomew *et al.*, 1976). La actividad secretora del acino pancreático es modulada principalmente en dos niveles de integración: uno en el complejo vagal dorsal y el otro en los ganglios autonómicos pancreáticos (Love *et al.*, 2007). No sólo la naturaleza colinérgica de la estimulación de la secreción ha sido evidenciada (Solberg y Brooks, 1969; Adler *et al.*, 1983), sino también su inhibición por la activación de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos presinápticos (Love *et al.*, 2007). En este sentido, la clonidina, un agonista  $\alpha_2$ -

adrenérgico selectivo, suprime la secreción de jugo pancreático (Rozé *et al.*, 1981). Se ha sugerido que durante la pancreatitis, el proceso inflamatorio agudo impide el adecuado drenaje de la secreción exocrina del órgano, lo cual, aunado a la excesiva producción y activación temprana de las enzimas, conlleva a la exacerbación del daño al acino pancreático (Lechin y van der Dijs, 2008a, 2008b). Por ello, la disminución de la secreción de jugo pancreático, debería constituir un objetivo primordial del tratamiento de la pancreatitis aguda. Utilizando esta aproximación terapéutica, estos autores (Lechin y van der Dijs, 2008a, 2008b) han sido capaces de tratar con éxito un número considerable de pacientes que presentaban pancreatitis aguda de orígenes diversos. Por otro lado, aparentemente la clonidina no ha sido utilizada para tratar casos de pancreatitis aguda inducida por el envenenamiento escorpiónico ni tampoco en modelos experimentales de pancreatitis.

En función de lo expuesto en los párrafos anteriores, el objetivo general fue evaluar el efecto de la clonidina sobre la pancreatitis aguda inducida por el veneno de *Tityus discrepans*. Los objetivos específicos que se plantearon fueron:

- Determinar las condiciones experimentales adecuadas para la generación de un cuadro de escorpionismo subletal en ratones inducido por la inyección de veneno del escorpión *Tityus discrepans*.
- Determinar los cambios en las actividades de la lactato deshidrogenasa sérica,  $\alpha$ -amilasa sérica,  $\alpha$ -amilasa urinaria, glicemia, niveles séricos y urinarios de nitrógeno ureico y creatinina, así como los cambios histopatológicos y hematológicos inducidos por el veneno del escorpión *Tityus discrepans*.
- Determinar el efecto de la clonidina (agonista selectivo de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos) sobre los indicadores clínicos y cambios histopatológicos previamente mencionados, en ratones inyectados con veneno de *Tityus discrepans*.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. ESCORPIONES Y ESCORPIONISMO

#### 1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

El escorpionismo, término que describe el accidente derivado del envenenamiento por escorpiones (Borges, 1996), constituye un problema de salud pública a nivel mundial, particularmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde la incidencia puede superar las 100 víctimas por cada 100.000 habitantes (Chippaux y Goyffon, 2008). Los escorpiones (clase Arachnida, orden Scorpiones) se agrupan en 18 familias, de las cuales, la más importante desde el punto de vista médico es la familia Buthidae (Lourenço, 1994; Borges, 1996). En el neotrópico, la gran mayoría de los escorpiones causantes de accidentes por envenenamiento en humanos pertenecen al género *Tityus*, el cual incluye alrededor de 180 especies distribuidas en diversos hábitats desde Costa Rica hasta el norte de Argentina (Fet y Lowe, 2000; González-Sponga, 2002; Lourenço, 2002). Otro género de importancia médica, especialmente en México y sur de los Estados Unidos, es el género *Centruroides* (Dehesa-Dávila y Possani, 1994).

#### 1.2. SITUACIÓN EN LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

En nuestro país se presentó, para el período comprendido entre los años 1996 y 2000, una incidencia de 49 casos de escorpionismo, con una mortalidad de 0,42 por millón de habitantes y una amplia variabilidad geográfica en términos taxonómicos y toxinológicos (Borges y De Sousa, 2006). El género *Tityus* se encuentra ampliamente distribuido en el territorio nacional, exceptuando los llanos centrales y los altos páramos de las montañas andinas, habitando principalmente zonas montañosas por encima de 600 metros sobre el nivel del mar (De Sousa *et al.*, 2000). El crecimiento acelerado de los asentamientos humanos que coinciden con los hábitats del género *Tityus* constituye un factor determinante para explicar el incremento de los casos de escorpionismo (Borges, 1996), como ha sido evidenciado en estudios retrospectivos llevados a cabo en algunas de las áreas endémicas (Borges *et al.*, 2002).

De las 70 especies pertenecientes a este género descritas hasta ahora, han sido responsables de accidentes severos y/o fatales las siguientes (Figura 1): *T. zulianus* (sur del lago de Maracaibo y norte de los estados Mérida y Táchira), *T. valerae* (estado Trujillo), *T. perijanensis* (Sierra de Perijá al oeste del estado Zulia), *T. falconensis* (estados Falcón y Lara), *T. pittieri*, *T. discrepans* y *T. isabelceciliae* (región nor-central), *T. neospartanus* (estado Nueva Esparta), *T. quirogae*, *T. caripitensis* y *T. nororientalis* (estados Anzoátegui, Sucre y Monagas), y *T. breweri* (noreste del estado Bolívar) (González-Sponga, 1997; De Sousa *et al.*, 2000; Quiroga *et al.*, 2000; Borges y De Sousa, 2006; Borges y Rojas-Runjaic, 2007; Borges *et al.*, 2010). Recientemente, Borges *et al.* (2010), han propuesto dividir las áreas endémicas de escorpionismo en tres grandes provincias toxinológicas, basándose en las características clínicas del envenenamiento, la reactividad inmunológica cruzada entre antivenenos y venenos provenientes de diferentes regiones y la afinidad filogenética entre las distintas especies de escorpiones, *i.e.*, Provincia I (región norcentral, región noreste, Macizo Guayanés y Trinidad), Provincia II (región andina y centro-occidental) y Provincia 3 (Sierra de Perijá).

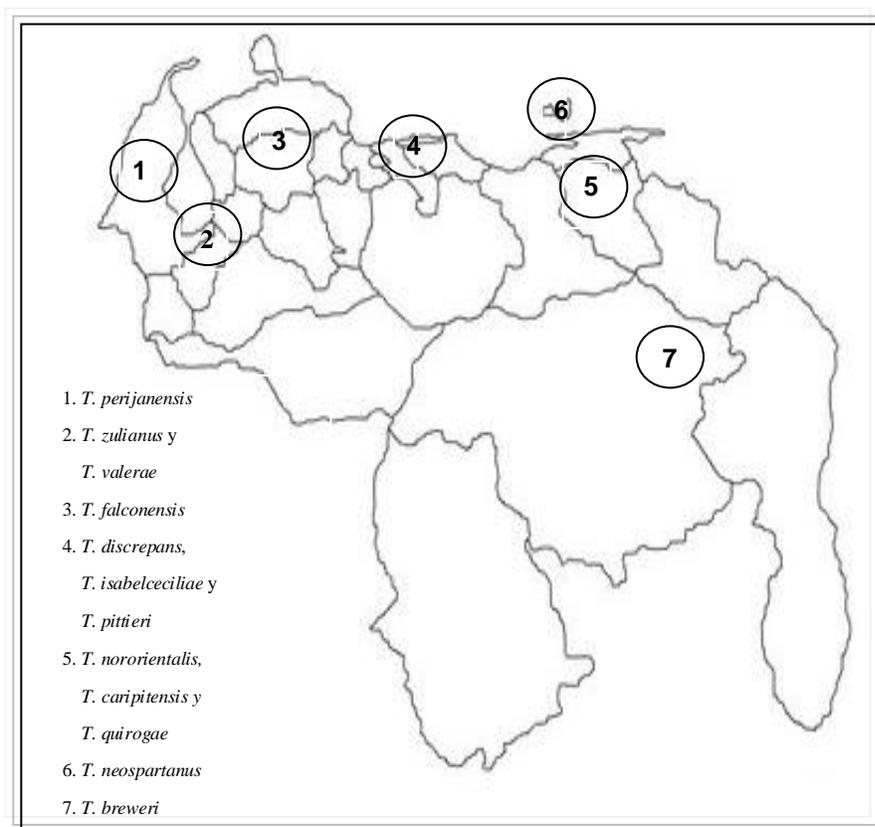


Figura 1. Localización aproximada de las especies de escorpiones de mayor importancia médica en la República Bolivariana de Venezuela

## 2. EL VENENO DE LOS ESCORPIONES

El veneno de los escorpiones constituye una secreción apocrina producida por dos glándulas ubicadas en el último segmento del metasoma del escorpión, llamado telson. Estas glándulas, rodeadas de músculo esquelético, vacían su secreción hacia dos agujeros ubicados cerca del extremo afilado del telson, denominado aguijón. El veneno es una mezcla compleja de sustancias, que incluye lípidos, nucleótidos, enzimas, aminas biogénicas, inhibidores de proteasas, liberadores de histamina, y neurotoxinas peptídicas, éstas últimas como principales responsables de la toxicidad (Martin-Eauclaire y Couraud, 1995; Almeida *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2006). La gran diversidad de los componentes del veneno le confieren al mismo una amplia gama de actividades biológicas: microbicidas, hemolíticas, fungicidas, inmunomoduladoras y hormonales, entre otras (Pimenta y De Lima, 2005; Zeng *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2006b).

## 3. TOXINAS RESPONSABLES DE LA LETALIDAD EN VERTEBRADOS

El veneno de los escorpiones pertenecientes a la familia Buthidae está enriquecido (>50% p/p) en componentes peptídicos de baja masa molecular, entre los cuales se encuentran: 1) Péptidos de cadena corta (22-47 aa, 3-4 kDa), activos sobre canales de  $K^+$  dependientes de voltaje y algunos canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{vCa}$ ), y 2) Péptidos de cadena larga (59-76 aa, 6-8 kDa), activos sobre canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje. Estos últimos presentan un motivo común compuesto de tres hojas plegadas  $\beta$  antiparalelas, unidas a una hélice  $\alpha$  por dos puentes disulfuro y a un fragmento extendido mediante un tercer puente disulfuro, tal como se muestra en la Figura 2 (Martin-Eauclaire y Couraud, 1995; Tytgat *et al.*, 1999; Rodríguez de la Vega y Possani, 2005). Otras toxinas descritas afectan canales de  $Ca^{2+}$  (Chuang *et al.*, 1998; Sidach y Mintz, 2002), canales de  $Cl^-$  (DeBin y Strichartz, 1991), e incluso receptores de rianodina (Valdivia *et al.*, 1991).

Las neurotoxinas de cadena corta poseen numerosos blancos farmacológicos, sin embargo, las toxinas más letales son las activas sobre canales  $Na_v$ . De hecho, su neutralización ha permitido la supresión del efecto tóxico de los venenos totales (Legros *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2004) o de fracciones cromatográficas del veneno (Machado de Avila *et al.*, 2004).

### 3.1. NEUROTOXINAS DE CADENA LARGA

Se han propuesto diversas nomenclaturas para clasificar las toxinas de cadena larga, sin embargo, la aceptada de manera más amplia se basa en el papel fisiológico de las toxinas como moduladores de los mecanismos de cierre y apertura de los canales iónicos y en estudios de unión y desplazamiento utilizando modelos de toxinas (Wheeler *et al.*, 1983; Couraud y Jover, 1984). En este sentido, las toxinas de cadena larga han sido clasificadas en dos familias,  $\alpha$  y  $\beta$ , de acuerdo con sus propiedades de enlace a los canales de  $\text{Na}^+$  y sus efectos fisiológicos (Martin-Eauclaire y Couraud, 1995; Gordon *et al.*, 1998). Ambos tipos de toxinas producen despolarización mantenida y liberación masiva de neurotransmisores en terminales nerviosos centrales y periféricos (Martin-Eauclaire y Couraud, 1995; Possani *et al.*, 1999).

#### 3.1.1. TOXINAS $\alpha$

Como se muestra en la Figura 3, las toxinas  $\alpha$  enlazan el sitio 3 del canal de  $\text{Na}^+$  de manera dependiente del voltaje, afectando principalmente el mecanismo de inactivación, incrementando la tendencia de la célula excitable a la despolarización mantenida (Catterall, 1986; Martin-Eauclaire y Couraud, 1995). Distinciones específicas dentro de las toxinas  $\alpha$  han sido propuestas, tomando en cuenta el reconocimiento diferencial de epítopes por anticuerpos, y preferencias filéticas (El Ayeb *et al.*, 1983; Gordon *et al.*, 1998). Así, existen toxinas  $\alpha$  “clásicas” (las más activas en mamíferos) como Aah2 y Lqq5, “anti-insectos” como BjaIT y Lqh $\alpha$ IT, y “similares a toxinas  $\alpha$ ” como BmKM1 y Bom4 (Rodríguez de la Vega y Possani, 2005).

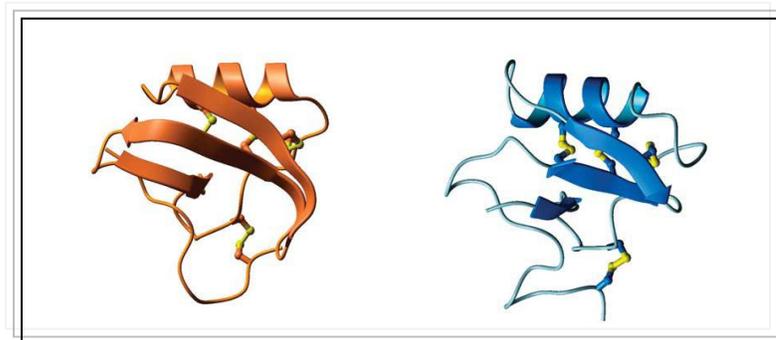


Figura 2. Modelo estructural de la toxina  $\alpha$  Aah2 y la toxina  $\beta$  Cn2

Fuente: Rodríguez de la Vega y Possani (2005).

### 3.1.2. TOXINAS $\beta$

Las toxinas  $\beta$  (Figura 3) enlazan el sitio 4 del canal de  $\text{Na}^+$  de manera independiente del voltaje, afectando el proceso de activación (Catterall, 1986; Martin-Eauclaire y Couraud, 1995; Cestèle *et al.*, 1998). Estas toxinas desplazan el umbral de activación de los canales de  $\text{Na}^+$  en la dirección hiperpolarizante, incrementando la tendencia de despolarización de la célula excitable a potenciales más negativos (Borges *et al.*, 2004). Las toxinas  $\beta$  han sido clasificadas en tres grupos principales: “clásicas”, “depresoras” y “excitatorias” (Gordon *et al.*, 1998). Ejemplos de este tipo de toxinas que afectan el proceso de activación son BjxtrIT, Css4, Cn2, Ts1 y Tz1 (Borges *et al.*, 2004; Rodríguez de la Vega y Possani, 2005).

Estudios de mutagénesis llevados a cabo con las toxinas BjxtrIT y Css4 han revelado que la superficie funcional que permite la unión de las toxinas  $\beta$  al sitio 4 del receptor  $\text{Na}_v$  con alta afinidad, consta de dos dominios: un farmacoforo estructural conservado, formado por un residuo Glu (Glu-30) en el centro de un “hot spot” en la hélice  $\alpha$ , rodeado por residuos hidrofóbicos (Tyr-26 y Val-34), y otro dominio hidrofóbico en la región C-terminal que parece determinar la especificidad de la toxina por el canal de  $\text{Na}_v$  (Cohen *et al.*, 2004). Esta superficie funcional de dos dominios ha sido también demostrada en toxinas  $\alpha$ , las cuales se unen al sitio 3 del canal  $\text{Na}_v$  como ha sido comentado previamente (Karbat *et al.*, 2004).

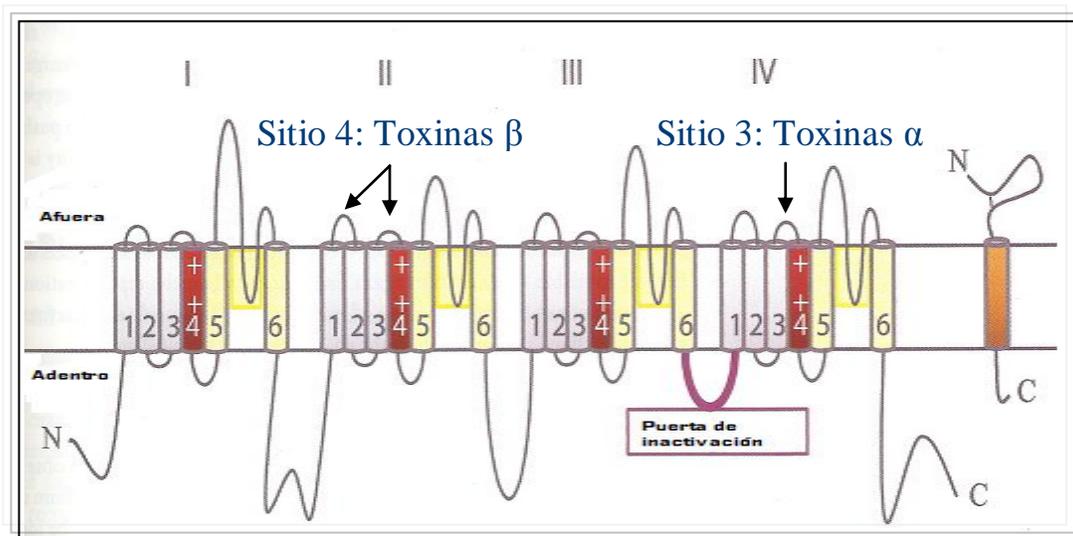


Figura 3. Topología de la subunidad  $\alpha$  formadora de poros del canal  $\text{Na}_v$  y sitios de unión de las neurotoxinas de cadena larga.

Fuente: Modificado de Cestèle y Catterall (2009).

### 3.2. NEUROTOXINAS DE CADENA CORTA

Las neurotoxinas de cadena corta son principalmente activas en canales de  $K^+$  y tienen en común un motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por dos puentes disulfuro, los cuales unen covalentemente un segmento de hélice  $\alpha$  con una cadena de la hoja plegada  $\beta$  (Rodríguez de la Vega y Possani, 2004) (Figura 4). Estas toxinas han sido clasificadas en las familias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Tytgat *et al.*, 1999) y  $\kappa$  (Nirthanan *et al.*, 2005). Ejemplos de toxinas de cadena corta son Lqh2, TsTXK $\alpha$ , TsTXK $\beta$  y HsTx1 (Rodríguez de la Vega y Possani, 2004).



Figura 4. Modelo estructural de la toxina de cadena corta Charibdotoxina.

Fuente: Mouhat *et al.* (2004).

### 4. POLIMORFISMO ESTRUCTURAL DE LAS NEUROTOXINAS

Las neurotoxinas de cadena larga exhiben secuencias de aminoácidos diferentes en las asas que unen los elementos de estructura secundaria, aunque comparten el motivo estructural hélice  $\alpha$ /hoja plegada  $\beta$  estabilizado por cisteínas, por lo cual se presenta un alto grado de polimorfismo antigénico y carencia de reactividad cruzada aún entre toxinas pertenecientes al mismo veneno (Granier *et al.*, 1989; De Lima *et al.*, 1993; Alvarenga *et al.*, 2005; Gazarian *et al.*, 2005). En la Figura 5, podemos apreciar la secuencia de aminoácidos de algunas toxinas pertenecientes a escorpiones del género *Tityus*, alineadas de acuerdo con los residuos de cisteína. Nótese el grado de conservación de las secuencias en las regiones que contienen los elementos de estructura secundaria y la variabilidad en las asas que conectan dichas regiones. Variaciones sutiles en los residuos ubicados en la superficie bioactiva (*i.e.* que interactúa con los canales  $Na_v$ ) de las toxinas  $\alpha$ , determinan cambios notables en la selectividad (Gordon y Gurevitz, 2003).



*et al.*, 1996), han revelado epítopes antigénicos continuos, *i.e.* la región N-terminal (residuos 1-15), la región C-terminal (residuos 47-61) y la porción central (29-43) en esas toxinas. Algunos aminoácidos críticos están conservados en los mencionados epítopes, *v.g.* Glu3 (N-terminal), Tyr5, Asp8, Asp50, Trp55 y Lys61 (Gazarian *et al.*, 2005), como se muestra en la Figura 6.

	3	5	8		50	55	58	61																									
NTP	G	R	E	G	P	A	D	S	K	G	C	K	I	T	--	P	D	S	V	K	I	W	T	S	E	T	N	K	C	G			
Ts II	-	K	E	G	Y	A	M	D	H	E	G	C	K	F	S	--	P	D	H	I	K	V	W	D	Y	A	T	N	K	C			
Ts VII	-	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	C	K	L	S	--	P	N	W	V	K	V	W	D	R	A	T	N	K	C			
Ts IV	K	K	D	G	Y	P	V	E	Y	D	N	C	A	Y	I	--	P	D	S	E	P	T	K	--	T	N	G	K	C	K	S	G	K

Figura 6. Alineamiento de aminoácidos de un segmento de la anatoxina TsNTxP (NTP) y de las toxinas TsII, TsVII y TsIV. Se muestran subrayados los residuos críticos para el reconocimiento por anticuerpos.

Fuente: Chávez-Olórtegui *et al.* (2002).

Mediante el uso del anticuerpo monoclonal mAbTs1 y la técnica de péptidos sintéticos solapados (Alvarenga *et al.*, 2005), ha sido posible identificar un epítipo lineal neutralizable sobre la estructura de la toxina TsVII (Ts1) (Figura 7), principal toxina  $\beta$  del veneno del escorpión *T. serrulatus*. Este epítipo se ubica espacialmente cercano al farmacoforo, por lo cual es factible que los anticuerpos neutralizantes generen impedimento estérico de la unión de la toxina a su blanco molecular (Alvarenga *et al.*, 2005). Se muestra en la misma figura el residuo Glu-26, que constituye el “*hot spot*” rodeado de residuos hidrofóbicos (farmacoforo conservado), en la toxina TsVII (Cohen *et al.*, 2004). Los residuos cargados Lys-24 y Asp-28, presentes en la  $\alpha$ -hélice de las toxinas TsII y TsIV, son sumamente importantes para la interacción de los anticuerpos con la hélice  $\alpha$ , y aparecen sustituidos por Gly-24 y Gly-28 en TsVII (Machado de Avila *et al.*, 2004). Como consecuencia de dicha sustitución, la hélice  $\alpha$  constituye un epítipo lineal en TsII y TsIV, pero no en TsVII.

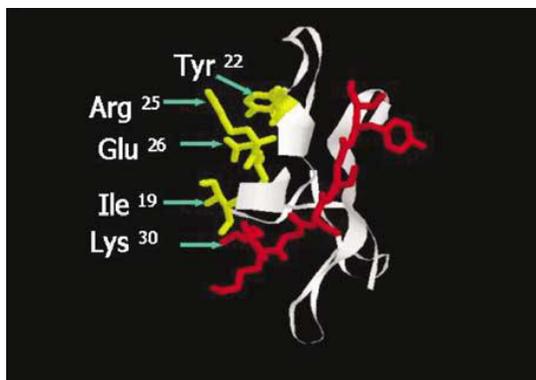


Figura 7. Representación del epítipo de mAbTs1 y de los residuos del farmacoforo en la  $\alpha$ -hélice de TsVII. El epítipo en la región C-terminal se muestra en rojo y los residuos del farmacoforo en amarillo.

Fuente: Alvarenga *et al.* (2005).

Se ha comentado antes que las variaciones en la secuencia de regiones polimórficas de toxinas activas sobre canales  $\text{Na}_v$  constituyen una importante limitación en la preparación de antivenenos de más amplia especificidad, debido a la carencia de reactividad cruzada (Chávez-Olórtegui *et al.*, 2002; Gazarian *et al.*, 2005). Experimentos llevados a cabo con la finalidad de evaluar la reactividad cruzada entre anticuerpos policlonales anti-TstFG<sub>50</sub> (Fracción cromatográfica II en Sephadex<sup>®</sup>G-50 del veneno de *T. serrulatus*, conjugada a BSA con glutaraldehído) con los venenos de los escorpiones *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. cambridgei*, *Centruroides sculpturatus*, *Androctonus Australis* Hector y de las arañas *Phoneutria nigriventer* y *Loxosceles intermedia*, han evidenciado una pobre reactividad cruzada, aún utilizando venenos de escorpiones pertenecientes a regiones geográficas relativamente cercanas (*T. serrulatus* y *T. bahiensis* del sureste de Brasil, y *T. stigmurus* del noreste de Brasil). Para los casos venezolanos se han hecho experimentos similares, evidenciándose de igual manera una reactividad cruzada bastante variable (Borges *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha observado una baja reactividad cruzada incluso entre toxinas pertenecientes a un mismo veneno y los anticuerpos generados contra una de ellas (De Lima *et al.*, 1993).

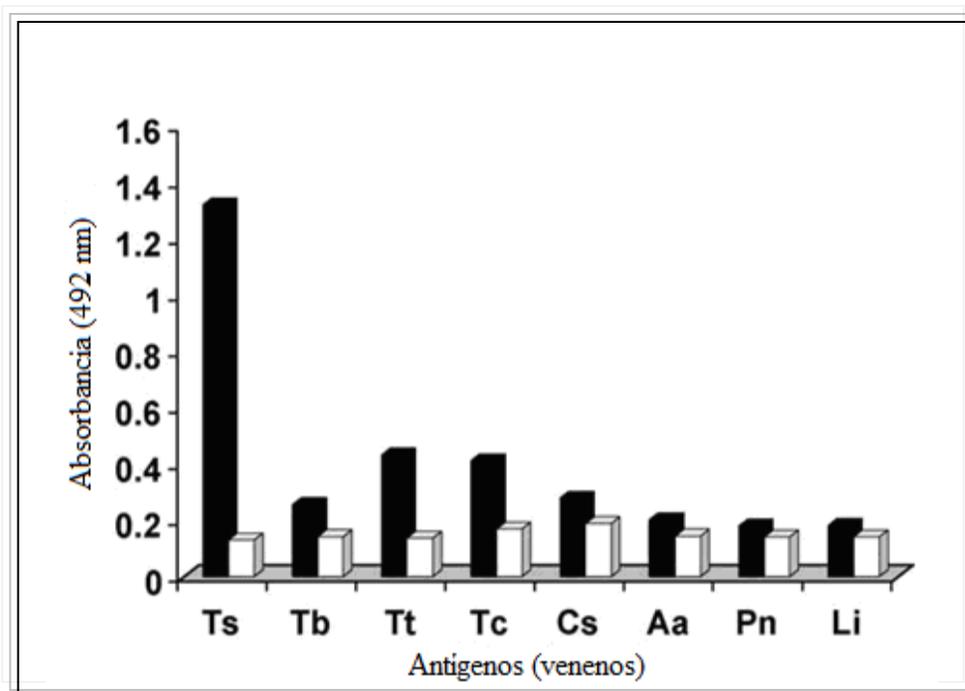


Figura 8. Reactividad cruzada del suero policlonal anti-TstFG<sub>50</sub> con diferentes venenos de escorpiones y arañas. Se ensayó en ELISA indirecto una dilución 1:100 de suero policlonal de ratones BALB/c inmunizados con TstFG<sub>50</sub>-BSA. Las placas fueron adsorbidas con 10 µg de veneno de (izquierda a derecha): *Tityus serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. cambridgei*, *Centruroides sculpturatus*, *Androctonus australis* Hector, *Phoneutria nigriventer* y *Loxosceles intermedia*. Las barras blancas constituyen la absorbancia del suero preinmune (control). Los valores corresponden al promedio de duplicados.

Fuente: Modificado de Machado de Avila *et al.* (2004).

## 5. CLÍNICA DEL ESCORPIONISMO

La letalidad del veneno de escorpión en vertebrados está íntimamente relacionada con la presencia de toxinas de cadena larga, activas contra canales de Na<sup>+</sup> en tejidos excitables (Chávez-Olórtegui y Kalapothakis, 1997). Éstas inducen la liberación masiva de neurotransmisores como acetilcolina y norepinefrina, ocasionando una “tormenta autonómica” (Freire-Maia *et al.*, 1994; Freire-Maia, 1995). Las manifestaciones del envenenamiento escorpiónico en general incluyen: dolor en el sitio de la picadura, vómitos, sudoración profusa, agitación psicomotora o intranquilidad, taquicardia o bradicardia sinusal, hiper o hipotensión arterial, arritmias cardíacas no sinusales, falla cardíaca, choque, taquipnea, edema pulmonar y anormalidades de laboratorio tales como leucocitosis, hiperglicemia y actividad de enzima amilasa plasmática incrementada

(Freire-Maia, 1995). Se ha evidenciado también el desarrollo de una reacción inflamatoria aguda, caracterizada por la liberación de numerosos mediadores inflamatorios, como prostaglandinas, citocinas y óxido nítrico, así como activación del complemento, los cuales contribuyen a las reacciones locales y sistémicas (Magalhães *et al.*, 1999; De-Matos *et al.*, 2001; Fukuhara *et al.*, 2003). Esta respuesta inflamatoria es responsable de cambios histopatológicos en el sitio de inoculación del veneno y en órganos alejados tales como páncreas, intestino, pulmones e hígado (D'Suze *et al.*, 2004).

En nuestro país se han observado diferencias significativas en relación con la presentación clínica del escorpionismo según la especie de escorpión involucrada (Borges *et al.*, 2004). Así, el envenenamiento por *T. zulianus* con frecuencia produce arresto respiratorio y muerte por edema pulmonar (Borges *et al.*, 2002; Mazzei de Dávila *et al.*, 2002), mientras que el envenenamiento por *T. discrepans* principalmente causa desórdenes gastrointestinales y pancreáticos (Mota *et al.*, 1994). Algunos hallazgos experimentales podrían explicar las diferencias clínicas mencionadas. Se ha evidenciado que la neutralización *in vivo* del veneno de *T. zulianus* por parte del antiveneno anti-*T. discrepans* (Tabla 1) requiere aproximadamente el doble de antiveneno en relación con la dosis necesaria para neutralizar el efecto del veneno de *T. discrepans*, a fin de obtener un nivel de sobrevida similar en ratones (Borges *et al.*, 2006a). Este hallazgo complementa los resultados obtenidos en experimentos previos donde se ha demostrado, mediante la técnica del *Western blotting*, que el antiveneno anti-*T. discrepans* es menos eficiente en el reconocimiento de los péptidos de baja masa molecular (6-8 kDa, rango donde se ubican las neurotoxinas de cadena larga) del veneno de *T. zulianus*, en comparación con el veneno de *T. discrepans* (Borges *et al.*, 1999).

Por otra parte, se ha demostrado la ineficacia del suero anti-*T. discrepans* para neutralizar el efecto tóxico del veneno de *T. perijanensis* en ratones (Borges *et al.*, 2005; Borges y Rojas-Runjaic, 2007). Esta especie de escorpión produce el veneno de más alta toxicidad entre los venenos estudiados en el país (DL<sub>50</sub> entre 0,91 y 0,94 mg/kg) e inyecta una cantidad de veneno significativamente superior otros escorpiones venezolanos (Borges y Rojas-Runjaic, 2007; Borges A., comunicación personal). Además, *T. perijanensis* constituye una especie de amplia distribución geográfica y gran plasticidad ecológica (Borges y Rojas-Runjaic, 2007). Finalmente, se ha evidenciado que aunque existen componentes tóxicos compartidos, el veneno de cada escorpión es especie-específico, conteniendo un repertorio de toxinas de cadena larga exclusivo.

En este sentido, los venenos de *T. discrepans* y *T. zulianus* muestran espectros de masas diferentes cuando son estudiados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Desorción/ionización Láser Asistida por Matriz, por sus siglas en Inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*; detector *Time of Flight*) lo cual es confirmado adicionalmente por diferencias a nivel del transcriptoma (Borges *et al.*, 2006a). Por otra parte, los venenos de *T. discrepans*, *T. perijanensis* y *T. zulianus* presentan un perfil de migración diferente en AU-PAGE (por sus siglas en Inglés, *acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis*) (Borges *et al.*, 2008), lo cual indica diferencias importantes en la composición de dichos venenos.

Veneno	Suero inyectado por ratón (mg prot.)	Ratones sobrevivientes	Porcentaje (%)
<i>T. discrepans</i>	3,77	5/5	100
	2,89	4/5	80
	2,23	3/5	60
	1,71	0/5	0
	(Control )	0/5	0
<i>T. zulianus</i>	6,97	5/5	100
	5,58	4/5	80
	4,57	3/5	60
	3,57	0/5	0
	(Control)	0/5	0

Tabla 1. Neutralización *in vivo* de veneno de *T. discrepans* y *T. zulianus* con antiveneno anti-*T. discrepans*. Los ratones fueron inyectados vía IV con 2DL<sub>50</sub> de veneno de *T. discrepans* (100,4 µg) o *T. zulianus* (60,8 µg), en presencia de cantidades variables de antiveneno anti-*T. discrepans*. Los controles fueron inyectados con 2DL<sub>50</sub> de veneno preincubado con NaCl 0,9%, bajo las mismas condiciones.

Fuente: Modificado de Borges *et al.* (2006a).

En resumen, diversas evidencias clínicas y experimentales relacionadas con los venenos de *T. discrepans*, *T. perijanensis* y *T. zulianus*, los cuales pertenecen a regiones endémicas diferentes, podrían indicar (Borges *et al.*, 2008): 1) la existencia de diferencias regionales entre los epítopes neutralizables de neurotoxinas activas contra canales de Na<sup>+</sup>, 2) presencia de componentes compartidos en diferente abundancia, 3) presencia de componentes especie-específicos de diferente actividad, y 4) diferencias en la biodisponibilidad de los componentes activos.

## **6. ESCORPIONISMO Y PANCREATITIS**

### **6.1. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD PANCREÁTICA EXOCRINA**

El páncreas exocrino está sometido a una compleja regulación neurohumoral y produce dos tipos de secreciones. La secreción hidrolítica pancreática -rica en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O- proviene fundamentalmente de células ductales y centroacinares, y se libera principalmente bajo el estímulo de secretina y VIP (por sus siglas en Inglés *Vasoactive Intestinal Peptide*, Péptido Intestinal Vasoactivo), mientras que bajo el efecto de la colecistoquinina (CCK) o la estimulación vagal se produce principalmente una secreción ecbólica, rica en enzimas digestivas (Konturek *et al.*, 2003). Existen algunas diferencias importantes entre especies, en relación con la sensibilidad a cada uno de los mencionados estímulos (Holst *et al.*, 1979). La CCK es producida en las células enteroendocrinas I de la mucosa duodenal e ileal en respuesta a aminoácidos y lípidos en el lumen intestinal, y actúa sobre terminales nerviosos sensoriales para iniciar reflejos vagovagales enteropancreáticos (Jaworek *et al.*, 2010).

El componente neural de la actividad secretora enzimática es modulado principalmente en dos niveles de integración: uno en el complejo vagal dorsal y el otro en los ganglios autonómicos pancreáticos (Love *et al.*, 2007). El primer centro de integración neuronal, el complejo vagal dorsal, recibe numerosas proyecciones de diversos núcleos monoaminérgicos, como se muestra simplificado en la Figura 9, y adicionalmente puede responder a estímulos humorales, como la CCK (Was *et al.*, 2007). Estas vías complejas han sido trazadas mediante marcaje transneuronal por técnicas inmunohistoquímicas, evidenciándose que al inyectar virus de pseudorrabia en el páncreas, éstos ascienden hasta los núcleos que se ilustran en la Figura 9 (Loewy *et al.*, 1994). Por otra parte, los ganglios pancreáticos representan los principales centros de integración

periférica, los cuales reciben numerosas proyecciones neuronales provenientes de los ganglios de la raíz dorsal, plexo mientérico y otros ganglios (Figura 10). Es importante notar en esta última figura, la representación de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos presinápticos sobre el botón terminal de neuronas colinérgicas preganglionares provenientes del núcleo motor dorsal del vago.

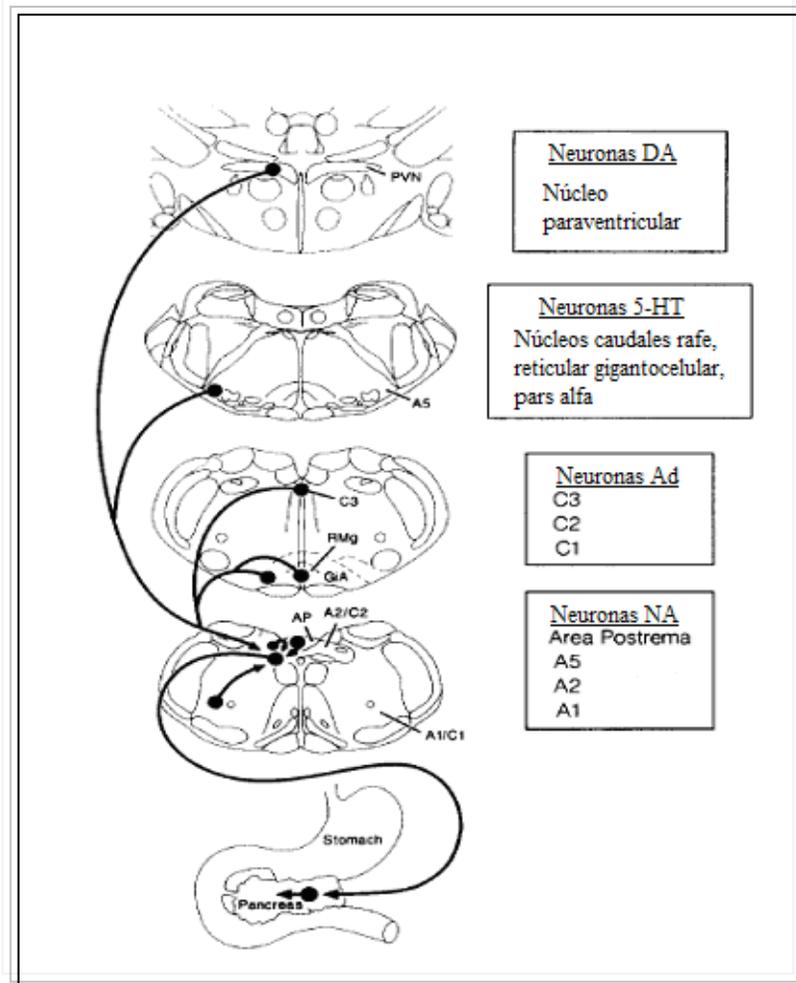


Figura 9. Principales núcleos monoaminérgicos que se proyectan a motoneuronas pancreáticas vagales. Las principales proyecciones surgen del grupo neuronal C1 (Ad), ubicado en la región rostroventrolateral de la médula oblonga.

Fuente: Loewy *et al.* (1994).

Como puede inferirse de lo previamente comentado, la regulación de la actividad secretora pancreática es bastante compleja, e implica la participación de factores humorales y control nervioso autónomo simpático y parasimpático, los cuales actúan de manera recíproca más que antagónica. Así, por ejemplo, la secreción proteica pancreática aumenta notablemente por la

estimulación vagal, respuesta que puede ser bloqueada por hexametonio, mientras que la secreción hidrolítica producida en respuesta a la estimulación vagal es potenciada por la secretina e inhibida por la estimulación simpática simultánea (Holst *et al.*, 1978). Por otra parte, diversas estructuras funcionales, que contribuyen de manera directa o indirecta a la secreción exocrina pancreática, tales como los ductos pancreáticos, los vasos sanguíneos y los acinos, reciben inervación autonómica (Brooks, 1973; Love *et al.*, 2007), como aparece representado en la Figura 10.

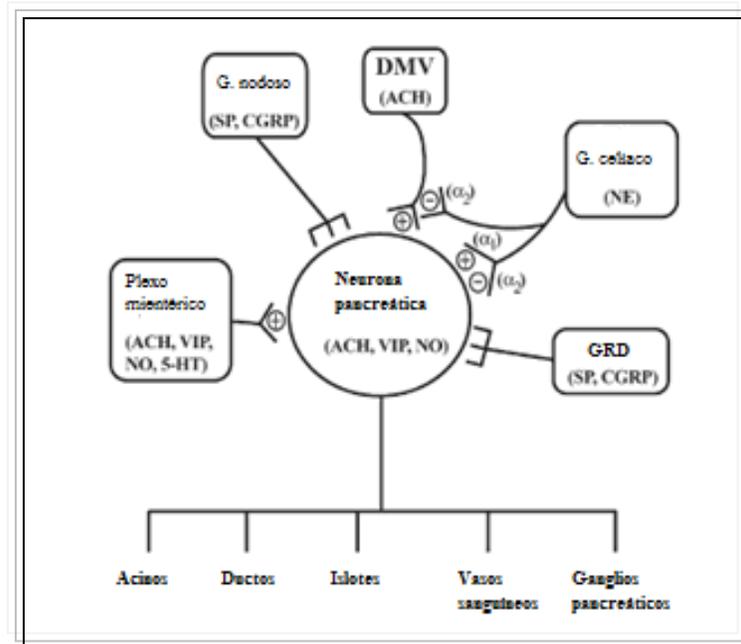


Figura 10. Inervación autonómica de los ganglios pancreáticos. En el ganglio pancreático se modula ampliamente la actividad parasimpática que alcanza los acinos, ductos, islotes y vasos sanguíneos. DMV: Núcleo motor dorsal del vago; GRD: Ganglio de la raíz dorsal.

Fuente: Love *et al.* (2007).

## 6.2. LA PANCREATITIS AGUDA ASOCIADA AL ESCORPIONISMO

El desarrollo de pancreatitis aguda es prominente en casos de envenenamiento por picadura de escorpiones pertenecientes al género neotropical *Tityus* y otros géneros de importancia médica (Bartholomew, 1970; Pantoja *et al.*, 1983; Fletcher *et al.* 1996, Borges *et al.*, 2004). Al menos en el caso de *T. trinitatis* la pancreatitis aguda parece resultar de hiperestimulación de los acinos

pancreáticos y constricción del mecanismo ampular (Bartholomew *et al.*, 1976). De hecho, el veneno de los escorpiones posee un potente efecto secretagogo -dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular- sobre el páncreas exocrino (Fletcher *et al.*, 1992, 1996) y es capaz de aumentar la motilidad del esfínter de Oddi, disminuyendo el flujo trans-esfintérico (Cheng *et al.*, 2004). Se ha sugerido que el proceso inflamatorio agudo en el páncreas impide el adecuado drenaje de la secreción exocrina del órgano, lo cual, aunado a la excesiva producción y activación temprana de enzimas, conlleva a la exacerbación del daño al acino pancreático (Lechin y van der Dijs, 2008a, 2008b).

Diversos autores han evidenciado que el veneno de *T. discrepans* produce daño pancreático (D'Suze *et al.*, 1995; Blanco, *et al.*, 1999; Borges *et al.*, 2004), aunque el mecanismo mediante el cual éste se produce aún no ha sido completamente aclarado. El veneno de los escorpiones, en general, parece actuar a nivel de las neuronas postganglionares, ya que el bloqueo de la transmisión ganglionar mediante hexametonio no impide el efecto del veneno sobre la secreción de amilasa pancreática (Sankaran *et al.*, 1977), corazón, presión arterial, intestino aislado o bazo (Corrado *et al.*, 1968; Diniz y Torres, 1968; Cunha-Melo *et al.*, 1973); por lo cual, el veneno de *T. discrepans* podría actuar mediante un mecanismo similar. Estos hallazgos, y el hecho que la vagotomía no impide el aumento de la secreción pancreática inducido por la toxina TsTx de *T. serrulatus*, sugieren que la pancreatitis es inducida, al menos en parte, por el efecto del veneno sobre la neurona postganglionar parasimpática (Novaes *et al.*, 1982). Por otra parte, el efecto secretagogo de las toxinas es abolido por el pretratamiento con atropina, lo cual corrobora la naturaleza colinérgica de la estimulación (Novaes *et al.*, 1982). Sin embargo, D'Suze *et al.* (1995) han descrito la existencia de una fracción del veneno de *T. discrepans* capaz de producir pancreatitis por mecanismos distintos a la estimulación muscarínica, lo cual contrasta con los resultados recién comentados.

La kalikreína constituye uno de los factores importantes en la génesis de la pancreatitis (Griesbacher y Lembeck, 1992; Griesbacher *et al.*, 2003), ya que es capaz de producir bradicinina y kalidina, mediadores que inducen notables alteraciones de la permeabilidad vascular, y se ha evidenciado el aumento de la actividad de la kalikreína a nivel pancreático generado por componentes del veneno de *T. serrulatus* (Novaes *et al.*, 1982). Esto último, posiblemente sea el resultado de la modulación por parte del sistema nervioso autonómico, de una manera análoga a como ocurre en la glándula salival submandibular (Rabito *et al.*, 1983). Adicionalmente, D'Suze

*et al.* (2009), han sugerido la presencia de un péptido potenciador de bradicinina en el veneno de *T. discrepans*.

## **7. TRATAMIENTO DEL ENVENENAMIENTO ESCORPIÓNICO**

### **7.1. MANEJO FARMACOLÓGICO**

Diversos tratamientos han sido utilizados, con un éxito variable, para contrarrestar los efectos devastadores que sobre el organismo es capaz de ejercer el veneno de los escorpiones. En este sentido, el uso de vasodilatadores como la hidralazina, el prazosín, la nifedipina y el captopril, drogas anticolinérgicas como la atropina, sedantes como el diazepam y la clorpromazina o anestésicos como los barbituratos, drogas procinéticas-antieméticas como la metoclopramida, drogas antipiréticas como el paracetamol, beta-bloqueantes como el propranolol y glucocorticoides como la hidrocortisona, ha sido ampliamente documentado (Ismail *et al.*, 1992; Ismail, 1995). Sin embargo, a pesar de existir una amplia experiencia en el manejo farmacológico del envenenamiento escorpiónico, el uso de antivenenos específicos es considerado el tratamiento idóneo para contrarrestar los efectos del veneno en los casos de escorpionismo (De Rezende *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 2003; Theakston *et al.*, 2003; Boyer *et al.*, 2009).

### **7.2. ANTIVENENOS**

La gran mayoría de los antivenenos producidos en diversos laboratorios a nivel mundial se obtienen en caballos por inmunización con venenos crudos, purificación de las inmunoglobulinas y tratamiento con pepsina en pH ácido para la obtención de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Theakston *et al.*, 2003; Chippaux y Goyffon, 2008; Espino-Solis *et al.*, 2009). En relación con las especies inmunizadas para obtener los antivenenos, aparte del caballo se ha explorado la posibilidad de utilizar camellos y ovejas. Las IgG provenientes de camellos son menos inmunogénicas que la mayoría de las IgG de mamíferos (Cortez-Retamozo *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2005), por lo cual la administración intravenosa de antivenenos producidos en camellos tiene menos probabilidad de generar reacciones adversas, que el uso de antivenenos producidos en equinos u ovinos (Lalloo y Theakston, 2003). En contraste, el suero equino contiene grandes

cantidades de IgGT glicosiladas, las cuales son altamente inmunogénicas (Theakston *et al.*, 2003). Los ovinos, por otra parte, presentan la ventaja de ser tolerantes al uso de adyuvantes, además de ser fáciles de manejar y mantener en grupos grandes (Theakston *et al.*, 2003).

Uno de los inconvenientes de la inmunización con venenos crudos es la alta toxicidad de los antígenos empleados. Se han utilizado diferentes alternativas para la obtención de anticuerpos neutralizantes: péptidos sintéticos, fracciones tóxicas conjugadas (obtenidas por técnicas cromatográficas) y toxinas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP) como antígenos, para evitar la toxicidad de los venenos crudos en los animales que son sometidos a protocolos de inmunización (Alvarenga *et al.*, 2002; Legros *et al.*, 2002; Machado de Avila *et al.*, 2004), demostrándose que constituyen alternativas viables en la obtención de anticuerpos neutralizantes contra los componentes más tóxicos del veneno. Otras posibilidades exploradas en la búsqueda de mejores antivenenos ha sido el uso de anticuerpos monoclonales y preparación de anticuerpos recombinantes (Espino-Solis *et al.*, 2009). El veneno constituye una mezcla compleja de sustancias, con los péptidos de cadena larga en mayor abundancia (Martin-Eauclaire y Couraud, 1995), por lo cual su rápida neutralización debe ser el objetivo primordial de los antivenenos que se emplean en la terapia del envenenamiento. De allí la tendencia a preparar anticuerpos dirigidos en contra de estos componentes. Por otra parte, la posibilidad de generación de reacciones adversas a los antivenenos parece depender de la pureza de la preparación, la reducción de la cantidad total de proteínas presentes y la eliminación de actividad anticomplemento (Gutiérrez *et al.*, 2003). En el caso de nuestro país, el antiveneno disponible (anti-*T. discrepans*) es producido en caballos mediante la metodología tradicional de inmunización con venenos crudos y posterior digestión de las inmunoglobulinas.

Otro inconveniente que se presenta en la preparación de antivenenos es la dificultad de contar con cantidades suficientes de veneno de escorpión, asociada con la escasa producción de las glándulas del veneno, la variabilidad en composición del veneno a lo largo del año y la dificultad para obtener los escorpiones en el campo y mantenerlos en cautiverio (Borges, 1996). Se ha señalado que la cantidad de veneno obtenido de los escorpiones *T. zulianus* y *T. discrepans* es  $1,66 \pm 0,20$  mg y  $0,54 \pm 0,10$  mg respectivamente (Borges *et al.*, 2004). El uso de técnicas de biología molecular constituye una alternativa viable para obtener componentes del veneno completamente funcionales y en cantidades suficientes para el desarrollo de anticuerpos (Legros *et al.*, 2002). Estudios basados en el análisis del transcriptoma y proteoma de las glándulas de

veneno, tales como los realizados por Borges *et al.* (2006a) para las especies venezolanas y Martin-Eauclaire *et al.* (1994) y Pimenta *et al.* (2003) para las especies brasileñas, han permitido conocer las toxinas presentes en mayor abundancia, haciendo posible su expresión en sistemas heterólogos, utilizando la tecnología del ADN recombinante.

El único antiveneno antiescorpiónico producido en el país está dirigido específicamente contra el veneno de *T. discrepans* (Poggioli de Scannone, 1996), el cual ha demostrado ser efectivo en los casos de escorpionismo por esta especie (Mota *et al.*, 1994), así como en casos de escorpionismo en el oriente del país (De Sousa *et al.*, 2000). Sin embargo, como ha sido descrito en la sección 4, se ha documentado la necesidad de usar dosis dos veces mayores para los casos de escorpionismo por *T. zulianus* (Mazzei de Dávila *et al.*, 2002) y tres veces mayores para casos de escorpionismo por *T. perijanensis* (Borges *et al.*, 2005), lo cual indica que hacia el occidente del país el antiveneno comercial disponible en el país es menos eficiente que en el centro-oriente del país.

## 8. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Se ha evidenciado la naturaleza colinérgica de la estimulación de la actividad secretora pancreática (Lampel *et al.*, 1977; Gallagher *et al.*, 1981; Adler *et al.*, 1983; Niebergall-Roth y Singer, 2001), así como la inhibición de la misma por la activación de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos presinápticos (Love *et al.*, 2000). En este sentido, la clonidina, un agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico selectivo, suprime la secreción de jugo pancreático (Rozé *et al.*, 1981). Aunque este fármaco posee numerosos blancos moleculares a nivel central (Klupp *et al.*, 1970; Bock y van Zwieten, 1971; Kobinger y Walland, 1972; Timmermans y van Zwieten, 1977; Koss y Christensen, 1979; Mermet y Quintin, 1991), también se ha descrito un efecto notable sobre receptores a nivel periférico, capaces de inhibir la transmisión colinérgica y noradrenérgica en diversas estructuras (Green *et al.*, 1979; Gjørstrup, 1984; Nakamura *et al.*, 1984; Loiacono y Story, 1986; Tsurusaki *et al.*, 1990).

Dentro de las estructuras cuya inervación autonómica está sujeta a modulación por receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, debe hacerse especial mención, por su relación con este trabajo, del esfínter de Oddi y las glándulas salivales. Coelho *et al.* (1986) han demostrado un efecto inhibitorio de la clonidina sobre la actividad excitatoria autonómica del esfínter de Oddi, mientras

que Green *et al.* (1979) han descrito la reducción, por el mismo fármaco, de la salivación inducida por estimulación eléctrica de la *corda timpani*. La clonidina, de hecho, suprime paralelamente las secreciones salival y pancreática (Rand *et al.*, 1969; Lechin *et al.*, 2008a). Es interesante destacar que el veneno de *T. discrepans* produce alteraciones estructurales también en las glándulas salivales (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000).

Se ha descrito en las secciones anteriores que las toxinas de escorpiones pertenecientes incluso a regiones geográficas relativamente cercanas muestran una gran variabilidad antigénica, lo cual dificulta el desarrollo de antivenenos con amplio margen de reconocimiento. Esto indica que no sólo deben realizarse grandes esfuerzos en el desarrollo de antivenenos más potentes y con amplio margen de reconocimiento antigénico, sino que deben explorarse nuevas alternativas terapéuticas para el manejo farmacológico del escorpionismo, lo cual podría ofrecer grandes beneficios para las víctimas del mismo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. VENENOS Y FÁRMACO

Se utilizaron escorpiones adultos colectados en San Antonio de Los Altos, Estado Miranda, y trasladados a la Cátedra de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV-Maracay. Todos los escorpiones fueron mantenidos en ambiente controlado ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), con agua *ad libitum* y un cartón cónico como refugio (Apéndice 1). Los escorpiones adultos, identificados como *T. discrepans* de acuerdo con los criterios de González-Sponga (2005), fueron alimentados una vez por semana con larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) y adultos de *Acheta domesticus* (Orthoptera, Grillidae) (Apéndice 1). Por otra parte, los escorpiones nacidos en el laboratorio fueron alimentados con larvas de *Ulomoides (Palembus) dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae) y microgrillos de *Acheta domesticus* (Orthoptera, Grillidae) dos veces por semana, aproximadamente hasta la tercera ecdisis, momento en el cual se empezó a suministrar la dieta de adultos. El veneno se obtuvo por estimulación manual del telson de escorpiones adultos (Apéndice 2) según el protocolo descrito por Zlotkin y Shulov (1969) y fue inmediatamente liofilizado a  $-50^{\circ}\text{C}$  y 35 mBar de presión. El veneno colectado proveniente de 15-20 escorpiones fue resuspendido en NaCl 0,9% y centrifugado a  $12.000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para eliminar el material insoluble. Se determinó la concentración de proteínas totales en el sobrenadante de acuerdo con el método de Lowry *et al.* (1951) y se confirmó mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985). Se utilizó albúmina sérica bovina como estándar en las curvas de calibración (Apéndice 3). La clonidina (Catapresan<sup>®</sup>) se obtuvo de Boheringer-Ingelheim.

### 2. ANIMALES

Se utilizaron ratones CD1 y BALB/c (Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela; ver Apéndice 1), con un peso comprendido entre 18 y 30 g, según el experimento. Dichos animales fueron mantenidos en ambiente controlado ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), con alimento y agua *ad libitum*, ciclo de luz de 12 horas y manejo de acuerdo con las normas internacionales del cuidado de animales de laboratorio.

### **3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

#### **3.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES: EFECTO DEL VENENO DE *Tityus discrepans* Y LA CLONIDINA SOBRE ALGUNOS INDICADORES DE QUÍMICA CLÍNICA EN RATONES CD1**

En un primer experimento preliminar, y con la finalidad de determinar durante cuánto tiempo se dejaría desarrollar el cuadro de escorpionismo en los ratones, se inyectaron ratones (el volumen total de inyección empleado en todos los experimentos fue de 0,1 mL) CD1 (n = 2) con una dosis de 0,83 µg/g (grupo VTd, *i.e.*, veneno de *T. discrepans*), con solución de NaCl al 0,9 % (grupo Control) o con 0,1 µg/g de clonidina (grupo Clonidina), y se realizó eutanasia bajo anestesia con dietiléter por 3 min a grupos de 2 animales en los tiempos 0, 1, 3, 6 y 12 h. Se realizaron ensayos enzimáticos colorimétricos (ver más adelante) con muestras de suero. El suero se obtuvo mediante centrifugación (12.000 x g por 10 min) de la sangre colectada en viales sin anticoagulante, dentro de los 30 min posteriores a la extracción.

En resultados publicados por otros autores (Borges *et al.*, 2004), se evidencia que 6 h después de la inyección de veneno del escorpión *T. discrepans* y *T. zulianus* se ha establecido un cuadro de pancreatitis aguda. Por esta razón, y por los resultados obtenidos en el experimento mencionado previamente, se decidió emplear en este trabajo un protocolo similar, dejando transcurrir ese mismo tiempo entre la inyección del veneno y la eutanasia de los ratones. Como ha sido mencionado, la dosis mínima de veneno empleada en los ratones CD1 fue de 0,83 µg/g, lo cual corresponde a 1/3 de la DL<sub>50</sub> vía intravenosa (Borges *et al.*, 2004). En otro experimento preliminar, ratones CD1 (n = 3) fueron distribuidos al azar en grupos control (NaCl al 0,9 %) y VTd. El veneno o la solución fisiológica fueron inyectados por la vía intraperitoneal o subcutánea; a las 6 horas los animales fueron anestesiados con dietiléter por 3 min y se les extrajo rápidamente sangre por punción cardíaca y orina por cistocentesis. Las muestras de suero y orina fueron almacenadas a 4 °C y se procesaron dentro de las 48 h posteriores al experimento.

#### **3.2. EFECTO DEL VENENO DE *Tityus discrepans* EN RATONES BALB/c PRETRATADOS CON CLONIDINA**

Se decidió utilizar la cepa BALB/c en lo sucesivo, al evidenciarse en los experimentos preliminares una mayor susceptibilidad de esta cepa al veneno del escorpión *T. discrepans*. Los

ratones (n = 5 a 7) fueron distribuidos según el esquema presentado en la Figura 11 e inyectados en todos los casos por la vía intraperitoneal. Se utilizó una dosis de veneno de 1  $\mu\text{g/g}$ , la cual es capaz de generar un cuadro moderado de escorpionismo en esta cepa de ratones, caracterizado por piloerección, diarrea y alteraciones neuromusculares, según se evidenció en resultados preliminares. La dosis de clonidina, en todos los casos en los cuales se utilizó, fue de 0,1  $\mu\text{g/g}$ , lo cual corresponde a la  $\text{DE}_{100}$  inhibitoria sobre la secreción pancreática, de acuerdo con Rozé *et al.* (1981). El pretratamiento con clonidina una hora antes de la inyección de veneno se hizo con la finalidad de alcanzar, antes de iniciarse el efecto del veneno sobre la secreción pancreática, el máximo nivel de inhibición de la misma (Rozé *et al.*, 1981). A las 6 horas, los animales fueron anestesiados con dietiléter por 3 min y se les extrajo rápidamente sangre por punción cardiaca y orina por cistocentesis. Las muestras de suero y orina fueron almacenadas a 4 °C y se procesaron dentro de las 48 h posteriores al experimento.

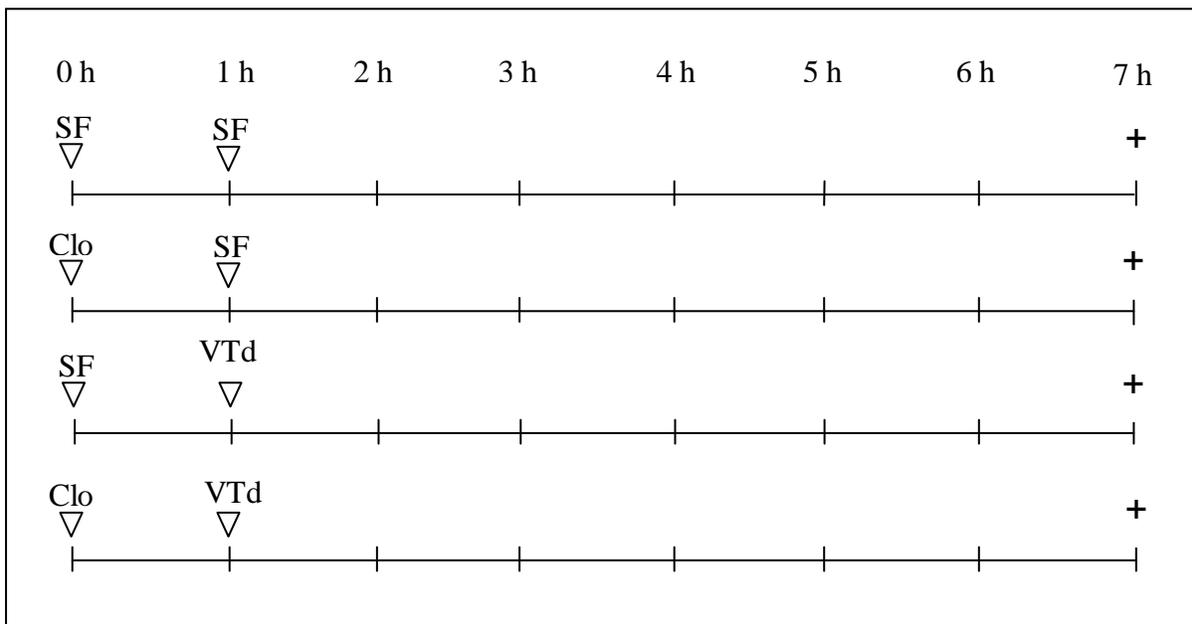


Figura 11. Esquema del protocolo experimental 2: Efecto del veneno de *Tityus discrepans* en ratones BALB/c pretratados con clonidina. Parte superior, tiempo en horas. SF, solución fisiológica NaCl 0,9 % (control). Clo, clonidina; VTd, veneno de *T. discrepans*. Los triángulos representan los momentos de aplicación del tratamiento correspondiente. El signo “+” representa el momento de eutanasia.

### 3.3. EFECTO DE LA CLONIDINA EN RATONES BALB/c PREVIAMENTE INYECTADOS CON VENENO DE *Tityus discrepans*

En otros experimentos, los animales fueron tratados con clonidina luego de la inyección del veneno, repitiéndose la dosis del fármaco cada 2 horas, con la finalidad de mantener el efecto simpaticolítico de la clonidina por más tiempo y probar si la misma era capaz de revertir el efecto del veneno. El veneno se distribuye rápidamente en el organismo (Ismail, 1995) y posiblemente es capaz de afectar la función pancreática exocrina antes de los 30 min posteriores a la inyección. Una evidencia que apoya esta afirmación es el hecho que la tityustoxina (TsTx) del escorpión *T. serrulatus* posee un potente efecto secretagogo sobre la función exocrina pancreática, que se hace manifiesto a los 10 min post-inyección y muestra un nivel máximo de estimulación a los 20 min (Novaes *et al.*, 1982). Por esta razón, se decidió inyectar el veneno y a los 30 min iniciar el tratamiento con la clonidina, de la manera mostrada en la Figura 12.

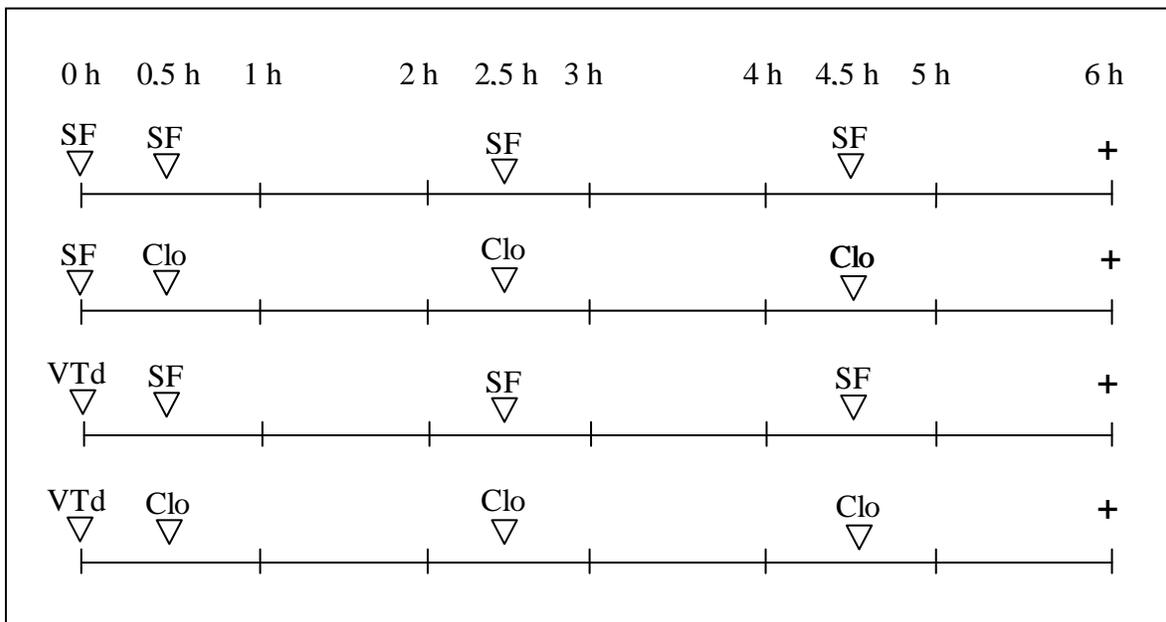


Figura 12. Esquema del protocolo experimental 3: Efecto de la clonidina en ratones BALB/c previamente inyectados con veneno de *T. discrepans*. Parte superior, tiempo en horas. SF, solución fisiológica NaCl 0,9 % (control). Clo, clonidina; VTd, veneno de *T. discrepans*. Los triángulos representan los momentos de aplicación del tratamiento correspondiente. El signo “+” representa el momento de eutanasia.

Se utilizó la misma dosis de veneno (1  $\mu\text{g/g}$ ) y de clonidina (0,1  $\mu\text{g/g}$ ), así como ratones de la misma cepa, sexo y peso. Los ratones ( $n = 7$  a  $11$ ) fueron distribuidos al azar e inyectados en todos los casos por la vía intraperitoneal. A las 6 horas, los animales fueron anestesiados con dietiléter por 3 min y se les extrajo rápidamente sangre por punción cardiaca y orina por cistocentesis. Adicionalmente, se extrajeron muestras de tejido mediante necropsia y fueron fijadas de manera inmediata en formalina buferada (2%, pH 7,4). Para la hematología se utilizó sangre colocada directamente en solución de Turk (10  $\mu\text{L}$  de sangre en 190  $\mu\text{L}$  de solución de Turk), mientras que para los ensayos enzimáticos-colorimétricos se utilizó suero.

#### **4. QUÍMICA CLÍNICA**

Las actividades de  $\alpha$ -amilasa en suero y orina, lactato deshidrogenasa (LDH), así como nitrógeno ureico sanguíneo (NUS), urea, creatinina y glicemia, fueron determinadas por ensayos enzimáticos colorimétricos (Cromatest, Linear Chemicals). Se utilizó un equipo STATFAX, y la exactitud de las determinaciones se comprobó mediante comparación con estándares. Se describe brevemente, a continuación, el fundamento de estos ensayos:

##### **4.1. GLICEMIA**

El reactivo está compuesto por la enzima glucosa oxidasa (al menos 10 KU/L), 4-aminoantipirina (0,5 mmol/L), peroxidasa (al menos 2 KU/L) y fenol (5 mmol/L) en un medio apropiado (tampón fosfato 1000 mmol/L pH 7,5). La glucosa de la muestra es oxidada a D-gluconato por la glucosa oxidasa, formando también peróxido de hidrógeno. Este peróxido de hidrógeno condensa la aminoantipirina y el fenol, formando una quinonaimina roja cuya cantidad es proporcional a la cantidad de glucosa de la muestra. La reacción es medida a una longitud de onda de 510 nm.

##### **4.2. ALFA-AMILASA**

El reactivo está compuesto por el sustrato 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido (CNP-G3, 2,25 mmol/L) en un medio apropiado (tampón MES 50 mmol/L pH 6,0, acetato de calcio 5 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, tiocianato sódico 450 mmol/L). La  $\alpha$ -amilasa presente en suero u orina cataliza la hidrólisis del sustrato CNP-G3 en 2-cloro-p-nitrofenol (CNP) y glucósidos libres.

El CNP produce color de manera proporcional a la cantidad de  $\alpha$ -amilasa en la muestra, lo cual puede ser medido a una longitud de onda de 405 nm.

#### **4.3. LACTATO DESHIDROGENASA**

El reactivo está compuesto por NADH (Nicotina Adenina Dinucleótido reducida, 1,55 mmol/L) como coenzima de la LDH más el sustrato de esta enzima en un medio apropiado (tampón TRIS 100 mmol/L pH 7,5; piruvato 2,75 mmol/L y NaCl 222 mmol/L). La enzima presente en el suero cataliza la reducción del piruvato a L-lactato con oxidación concomitante de NADH a NAD<sup>+</sup>. Esta oxidación, proporcional a la actividad LDH en la muestra, se cuantifica mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm.

#### **4.4. NITRÓGENO UREICO SANGUÍNEO (NUS)/UREA**

El reactivo está compuesto por la enzima ureasa (al menos 140 U/mL), la enzima glutamato deshidrogenasa (al menos 120 U/mL), el sustrato 2-cetoglutarato (10 mmol/L) y la coenzima NADH en un medio apropiado (tampón TRIS 125 mmol/L). La urea presente en la muestra es hidrolizada por la ureasa en amoníaco y dióxido de carbono. Este amoníaco es convertida en glutamato en presencia de NADH y cetoglutarato, a la vez que la NADH es oxidada. La oxidación del NADH es cuantificada a 340 nm, siendo proporcional a la cantidad de NUS/urea de la muestra.

#### **4.5. CREATININA**

El reactivo está compuesto por ácido pícrico (25 mmol/L) en un medio apropiado (tampón fosfato 300 mmol/L pH 12,7, SDS 2 g/L). La creatinina de la muestra, en condiciones de alcalinidad, reacciona con los iones picrato formando un compuesto de color rojizo (reacción de Jaffé). El aumento de la absorbancia a 510 nm es proporcional a la cantidad de creatinina de la muestra.

### **5. HEMATOLOGÍA COMPLETA**

La hematología completa fue realizada mediante procedimiento convencional de conteo manual en cámara de Neubauer, y conteo diferencial en frotis teñidos con Hemacolor®.

Brevemente, se realizó conteo en los cuatro cuadrantes externos de la cámara, la cual fue llenada con la sangre diluida en la solución de Turk (1:20). El resultado del conteo se multiplicó por 10.000 para obtener el valor de leucocitos totales.

## 6. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Los tejidos, previamente fijados, fueron procesados mediante técnicas histotecnológicas para su tinción con hematoxilina y eosina, de acuerdo con los métodos descritos por Prophet *et al.* (1992). Las secciones de tejidos, adecuadamente teñidas y montadas en láminas portaobjetos, fueron estudiadas mediante microscopía de luz.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se tomaron microfotografías de 10-15 campos al azar de pulmones, páncreas y riñones en 7 ratones, con una cámara Panasonic LUMIX DMC LX-3 fijada de manera apropiada a un microscopio OLYMPUS CX41. Las microfotografías de páncreas fueron adicionalmente procesadas mediante el *software ImageJ* (dominio público, *National Institute of Health*, EEUU), según lo descrito por D'Suze *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Las imágenes, tomadas inicialmente en color, fueron cambiadas a imágenes de 16 bits (*Image* → *Type* → *16-bit*). Luego se ajustó el umbral invirtiendo el *background* (*Image* → *Adjust* → *Threshold* → *Dark background*), con la finalidad que el programa sólo considerara el área ocupada por la región acidófila de los acinos. Para realizar el análisis se tomó un cuadro con las mismas dimensiones ( $72.000 \mu\text{m}^2$ ), el cual se utilizó en todas las imágenes, incluyendo de manera particular las áreas parenquimatosas. Finalmente se utilizó la aplicación de análisis (*Analyse* → *Measure*) y se obtuvo el porcentaje del área ocupada principalmente por la región acidófila de los acinos. La escala utilizada se fijó mediante el uso de una microfotografía de una cámara de Neubauer, tomada en idénticas condiciones a las microfotografías de las láminas histopatológicas.

Los datos fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media aritmética (EEM) y fueron comparados mediante prueba *t* de Student para datos no pareados o ANOVA según el caso, considerándose diferencia significativa para una  $p \leq 0,05$ . Los niveles de significación estadística considerados se indican con asteriscos (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$ ) y establecen diferencia en relación con el control, o, cuando aparece indicado

mediante corchetes, en relación con otro grupo experimental. Se utilizó para el procesamiento de los datos y realización de gráficos el *software* Graphpad Prism®.

## RESULTADOS

### 1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES: EFECTO DEL VENENO DE *Tityus discrepans* Y DE LA CLONIDINA SOBRE ALGUNOS INDICADORES DE QUÍMICA CLÍNICA EN RATONES CD1

Luego de la inyección de dosis subletales de veneno del escorpión *T. discrepans* en ratones, se observaron claras manifestaciones de una clínica asociada con la disfunción del sistema nervioso autónomo, *i.e.*, diarrea, piloerección, taquipnea, taquicardia, priapismo, alteraciones neuromusculares y sialorrea (Figura 13).

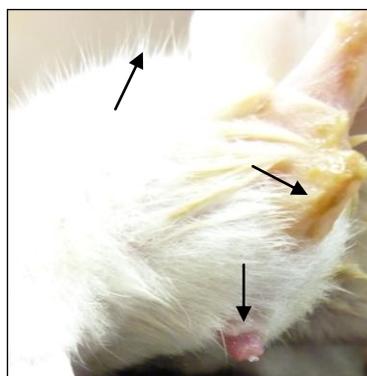


Figura 13. Manifestaciones clínicas post-inyección del veneno de *Tityus discrepans* en ratones CD1.

Las flechas indican, en el sentido de las agujas del reloj, piloerección, diarrea y priapismo.

Se puede observar, en la Figura 14, una marcada hiperglicemia inducida por la clonidina en la primera hora del experimento (367,10 mg/dL vs. 108,30 mg/dL), mientras que el veneno genera una hiperglicemia menos marcada, alcanzando un máximo a las 6 h del experimento (244,50 mg/dL vs. 97,70 mg/dL).

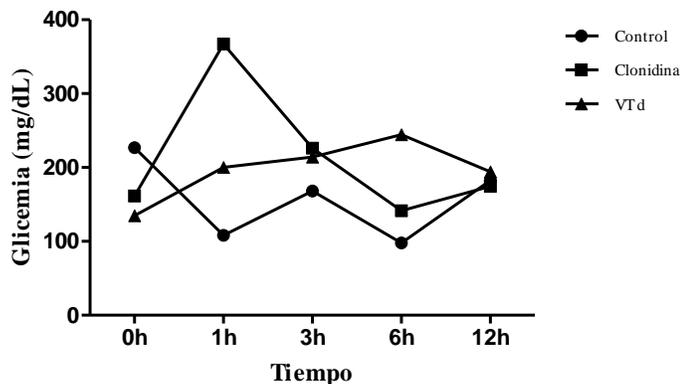


Figura 14. Efecto del veneno de *Tityus discrepans* y de la clonidina sobre la glicemia en ratones CD1. Ratones CD1 ( $20 \pm 2$  g,  $n = 2$ ) fueron inyectados vía subcutánea con una dosis de  $0,84 \mu\text{g/g}$  de veneno de *T. discrepans* (VTd),  $0,1 \mu\text{g/g}$  de clonidina o solución de NaCl  $0,9\%$ ; en los tiempos indicados, los animales fueron anestesiados con dietiléter y se obtuvo sangre por punción cardíaca. Se determinó la glicemia mediante ensayo enzimático-colorimétrico con muestras de suero.

Los resultados obtenidos al determinar los valores de actividad  $\alpha$ -amilasa sérica y lactato deshidrogenasa (LDH) en suero de animales inyectados con veneno de *T. discrepans* evidencian, de manera similar, un aumento progresivo desde el tiempo 0 h hasta un máximo a las 6 h de iniciado el experimento, mientras que el tratamiento con clonidina no produjo cambios en el nivel de LDH y tendió a hacer disminuir el valor de amilasa sérica (datos no mostrados). En otro experimento, se ensayaron dosis crecientes de veneno, desde  $0,83 \mu\text{g/g}$  hasta  $2,54 \mu\text{g/g}$  ( $DL_{13,5}$  y  $DL_{50}$ , respectivamente, de acuerdo con Borges *et al.* (1990), con la finalidad de evidenciar si existía un efecto concentración-dependiente. No se observó ningún cambio estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) en los niveles de  $\alpha$ -amilasa sérica ni de LDH en las condiciones experimentales empleadas, en la cepa de ratones CD1, como se muestra en la Figura 15.

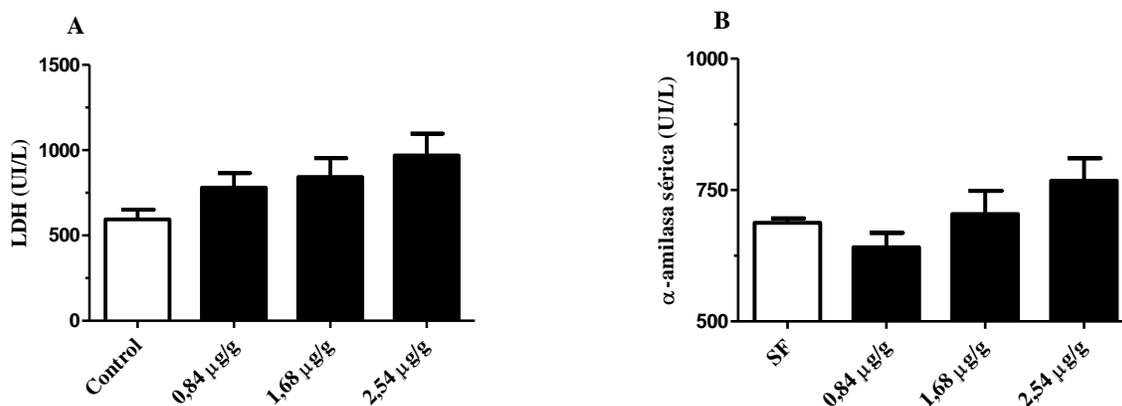


Figura 15. Efecto de dosis crecientes del veneno de *Tityus discrepans* sobre las actividades séricas lactato deshidrogenasa y  $\alpha$ -amilasa en ratones CD1. Panel A, lactato deshidrogenasa (LDH). Panel B,  $\alpha$ -amilasa sérica. Ratones CD1 ( $20 \pm 2$  g) fueron inyectados vía subcutánea con dosis crecientes de veneno de *T. discrepans* (VTd); los animales fueron anestesiados con dietiléter a las 6 h y se obtuvo sangre por punción cardíaca. Se realizaron ensayos enzimáticos-colorimétricos con muestras de suero. Las barras indican el promedio  $\pm$  EEM de tres animales ( $n = 3$ ).

Se incrementó la dosis del veneno a  $3,77 \mu\text{g/g}$  ( $DL_{75}$ ) y no hubo ningún cambio estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) en las actividades lactato deshidrogenasa y  $\alpha$ -amilasa sérica en comparación con el control (Figura 16 A), aunque sí se observó (Figura 16 C) un incremento ( $p < 0,05$ ) en la actividad  $\alpha$ -amilasa urinaria ( $1772,00 \pm 537,80$  UI/L vs.  $394,90 \pm 45,95$  UI/L). Por otra parte, nótese (Figura 16 A) el aumento ( $p < 0,05$ ) del nivel de actividad LDH al utilizar una dosis superior de veneno ( $3,77 \mu\text{g/g}$ ) y el hecho que la vía de administración del mismo no tuvo efecto ( $1336,00 \pm 107,50$  UI/L vs.  $735,60 \pm 142,90$  UI/L al usar la vía subcutánea y  $1307,00 \pm 94,90$  UI/L vs.  $746,30 \pm 75,27$  UI/L al usar la vía intraperitoneal). Al utilizar una dosis de  $1 \mu\text{g/g}$ , se observó una actividad sérica de LDH superior en ratones pertenecientes a la cepa BALB/c, en comparación con el resultado obtenido en ratones pertenecientes a la cepa CD1. Por esta razón, en el resto de los experimentos se emplearon ratones BALB/c.

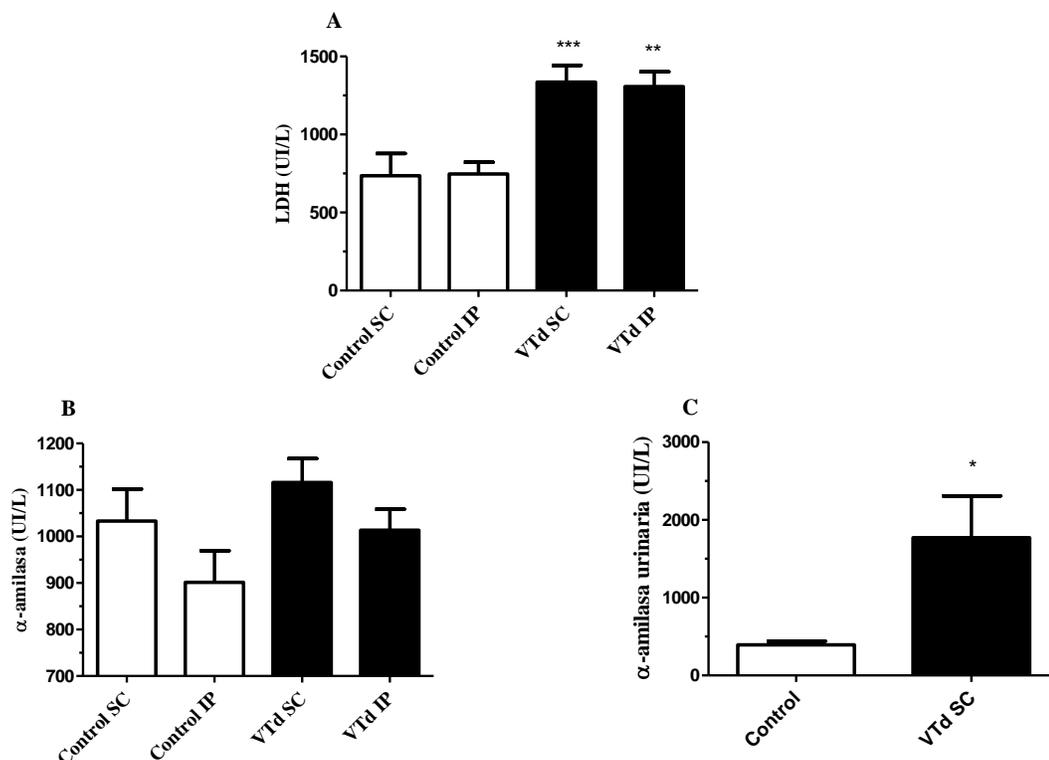


Figura 16. Efecto de la vía de administración (intraperitoneal o subcutánea) sobre las actividades lactato deshidrogenasa sérica,  $\alpha$ -amilasa sérica y  $\alpha$ -amilasa urinaria en ratones CD1 inyectados con veneno de *Tityus discrepans*. Panel A, LDH. Panel B,  $\alpha$ -amilasa sérica. Panel C,  $\alpha$ -amilasa urinaria. Ratones CD1 ( $20 \pm 2$  g) fueron inyectados vía ip o sc con una dosis de  $3,77 \mu\text{g/g}$  de veneno de *T. discrepans* (VTd). Las barras corresponden al promedio  $\pm$  EEM de cinco (5) animales ( $n = 5$ ). Diferencias significativas con respecto a controles (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 2. EFECTO DEL VENENO DE *Tityus discrepans* EN RATONES BALB/c PRETRATADOS CON CLONIDINA

Como se muestra en la Figura 16, en los ratones envenenados que recibieron como pretratamiento NaCl 0,9 % se evidenció un incremento significativo ( $p < 0,05$ ), en relación con los controles, de la actividad LDH (Figura 17 B:  $1010,00 \pm 121,40$  mg/dL vs.  $563,00 \pm 83,06$  mg/dL) y la actividad  $\alpha$ -amilasa urinaria (Figura 17 D:  $5066,00 \pm 477,20$  UI/dL vs.  $1238,00 \pm 68,50$  UI/dL), sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre estos valores y los obtenidos en los animales envenenados pretratados con clonidina (Figura 17 B y 17 D). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la glicemia ni

en la actividad  $\alpha$ -amilasa sérica, aunque pareciera haber una tendencia a la disminución de esta última en los animales tratados únicamente con el fármaco (Figura 17 C).

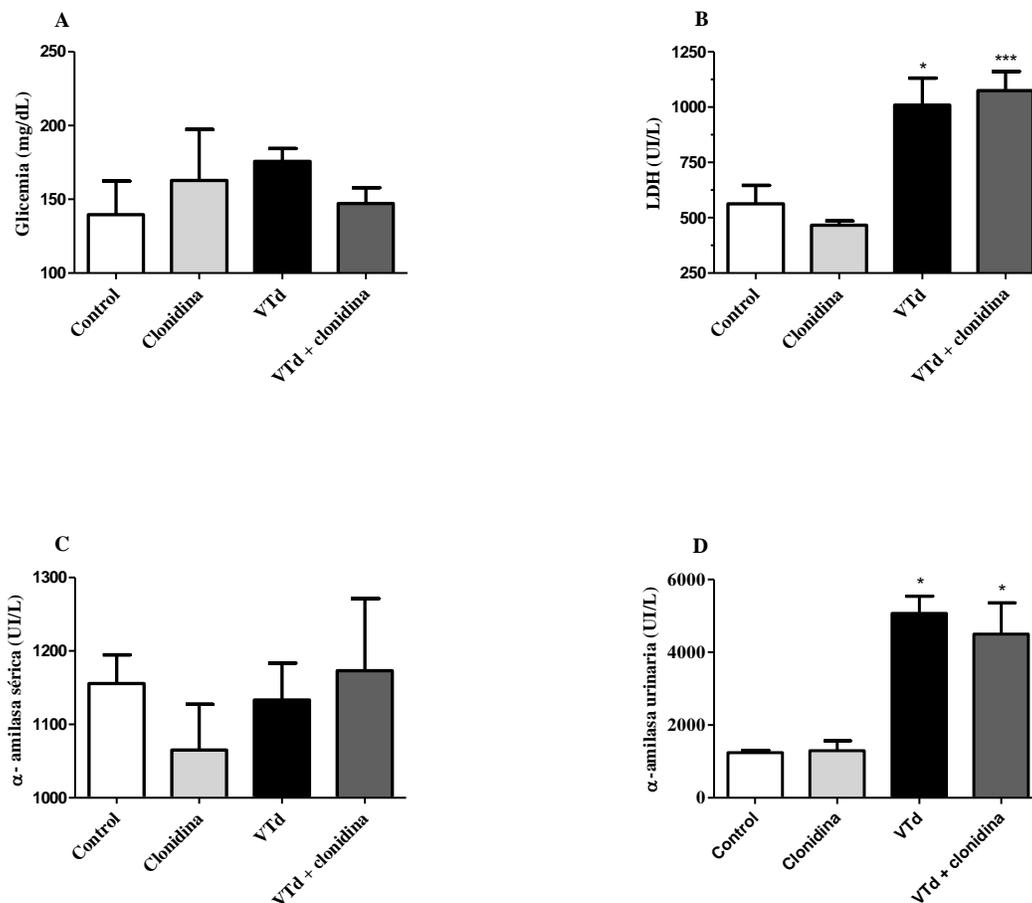
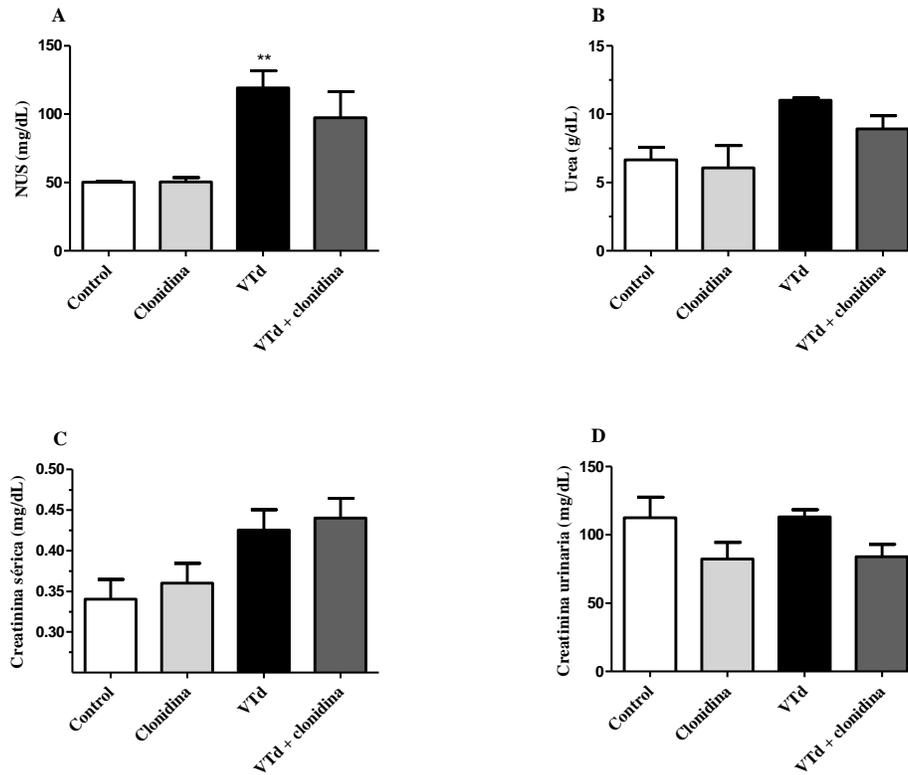


Figura 17. Efecto de la inyección intraperitoneal del veneno de *Tityus discrepans* en ratones BALB/c pretratados con clonidina sobre la glicemia y las actividades lactato deshidrogenasa sérica,  $\alpha$ -amilasa sérica y  $\alpha$ -amilasa urinaria. Panel A, glicemia. Panel B, LDH. Panel C,  $\alpha$ -amilasa sérica. Panel D,  $\alpha$ -amilasa urinaria. Ratones BALB/c ( $28 \pm 2$  g) fueron inyectados con clonidina ( $0,1 \mu\text{g/g}$ ) y a los 60 min se les inyectó  $1 \mu\text{g/g}$  de veneno de *T. discrepans* (VTd). Las barras corresponden al promedio  $\pm$  EEM de cinco (5) animales ( $n=5$ ). Diferencias significativas con respecto a controles (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

La función renal fue evaluada mediante la medición del NUS y la creatinina sérica, conjuntamente con la medición de los valores recíprocos, urea y creatinina urinaria. Puede apreciarse, en la Figura 18 A, que el nivel de NUS aumentó de manera significativa ( $p<0,05$ ) en los animales en los cuales se aplicó veneno pero no fueron pretratados con clonidina ( $119,10 \pm$

12,70 mg/dL vs.  $50,21 \pm 0,54$  mg/dL). Sin embargo, de manera similar a lo mostrado en la Figura 17, no hubo diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo inyectado con clonidina.



**Figura 18.** Efecto de la inyección intraperitoneal de veneno de *Tityus discrepans* en ratones BALB/c pretratados con clonidina sobre el nitrógeno ureico sanguíneo, urea urinaria, creatinina sérica y creatinina urinaria. Ratones BALB/c ( $28 \pm 2$  g) fueron inyectados con una dosis de  $1 \mu\text{g/g}$  de veneno de *T. discrepans* (VTd). Los puntos corresponden al promedio  $\pm$  EEM de cinco (5) animales ( $n=5$ ). Diferencias significativas con respecto a controles (\*\* $p < 0,01$ ).

En el recuento leucocitario, se observó neutrofilia y linfopenia en los animales pretratados con clonidina y posteriormente inyectados con veneno de escorpión (% de polimorfonucleares neutrófilos:  $58,20 \pm 3,20$  vs.  $33,80 \pm 4,08$ ; % de linfocitos:  $41,20 \pm 3,60$  vs.  $65,00 \pm 3,82$ ), como puede apreciarse en la Figura 19. El tratamiento únicamente con clonidina o con veneno, aparentemente produjo una tendencia similar (neutrofilia y linfopenia), aunque las diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ).

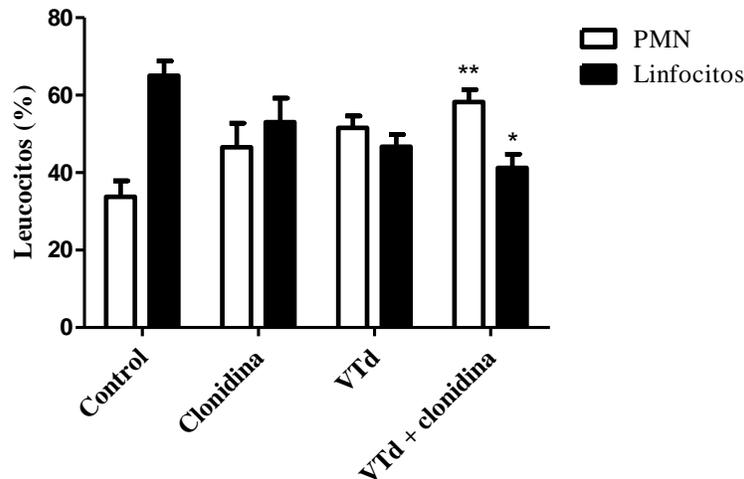


Figura 19. Efecto de la inyección intraperitoneal del veneno de *Tityus discrepans* sobre el leucograma en ratones BALB/c pretratados o no con clonidina. Ratones BALB/c ( $28 \pm 2$  g) fueron inyectados con una dosis de  $1 \mu\text{g/g}$  de veneno de *T. discrepans* (VTd); los animales fueron anestesiados con dietiléter a las 6 h y se obtuvo sangre por punción cardíaca. La sangre se colocó directamente en solución de Turk y se hizo conteo manual de leucocitos en cámara de Neubauer. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  EEM de cinco (5) animales ( $n = 5$ ). Diferencias significativas con respecto al control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). PMN = polimorfonucleares neutrófilos.

### 3. EFECTO DE LA CLONIDINA EN RATONES BALB/c PREVIAMENTE INYECTADOS CON VENENO DE *Tityus discrepans*

#### 3.1. QUÍMICA CLÍNICA Y LEUCOGRAMA

En otra serie de experimentos, se inyectó la clonidina 30 min después de la inyección del veneno y se repitió la dosis cada 2 h, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 20. No se observó aumento significativo ( $p > 0,05$ ) de la glicemia en los animales envenenados (Figura 20 A). La clonidina indujo una marcada hiperglicemia ( $p < 0,05$ ; Figura 20 A:  $266,40 \pm 20,62$  mg/dL vs.  $149,30 \pm 19,35$  mg/dL). La clonidina, por otra parte, tuvo un efecto sinérgico con el veneno en comparación con el efecto de la droga sola ( $p < 0,05$ ; Figura 20 A:  $346,60 \pm 22,46$  mg/dL vs.  $192,50 \pm 15,83$  mg/dL). La actividad lactato deshidrogenasa aumentó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) en los ratones envenenados (Figura 20 B:  $1099,00 \pm 193,20$  mg/L vs.  $532,10 \pm 42,22$  mg/L), efecto que fue reducido por la clonidina sin alcanzar significación estadística ( $p = 0,08$ ). La actividad  $\alpha$ -amilasa sérica no aumentó de manera estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) en los ratones envenenados, sin embargo, el tratamiento con clonidina redujo de manera

significativa ( $p < 0,05$ ) el nivel de este indicador en relación con el nivel obtenido en los ratones envenenados (Figura 20 C:  $968,60 \pm 49,74$  UI/dL vs.  $1455,00 \pm 165,60$  UI/dL).

Es importante notar, en las figuras 20 C y 20 D, que tanto la actividad  $\alpha$ -amilasa sérica, como la actividad  $\alpha$ -amilasa urinaria, tuvieron una tendencia a la disminución en los animales tratados con clonidina, en relación con el control. La actividad  $\alpha$ -amilasa urinaria aumentó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) en los animales envenenados cuando se compararon con los animales tratados únicamente con clonidina (Figura 20 D:  $2008,00 \pm 556,20$  UI/dL vs.  $1307,00 \pm 136,90$  UI/dL). Este efecto no fue afectado por la clonidina ( $p > 0,05$ ).

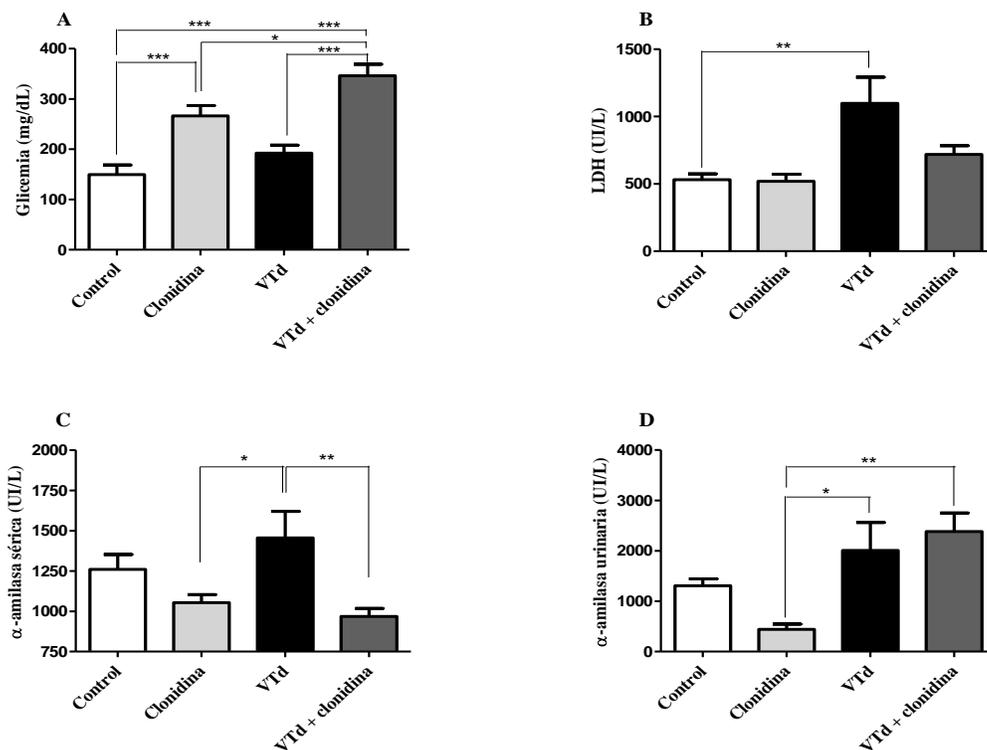


Figura 20. Efecto de la inyección intraperitoneal de clonidina cada 2 h, sobre la glicemia y las actividades lactato deshidrogenasa sérica,  $\alpha$ -amilasa sérica y  $\alpha$ -amilasa urinaria en ratones BALB/c previamente inyectados vía intraperitoneal con veneno de *Tityus discrepans*. Ratones BALB/c ( $20 \pm 2$  g) fueron inyectados con una dosis de  $1 \mu\text{g/g}$  de veneno de *T. discrepans* (VTd). Las barras corresponden al promedio  $\pm$  EEM de once animales ( $n = 11$ ). Diferencias significativas entre barras unidas por corchetes (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

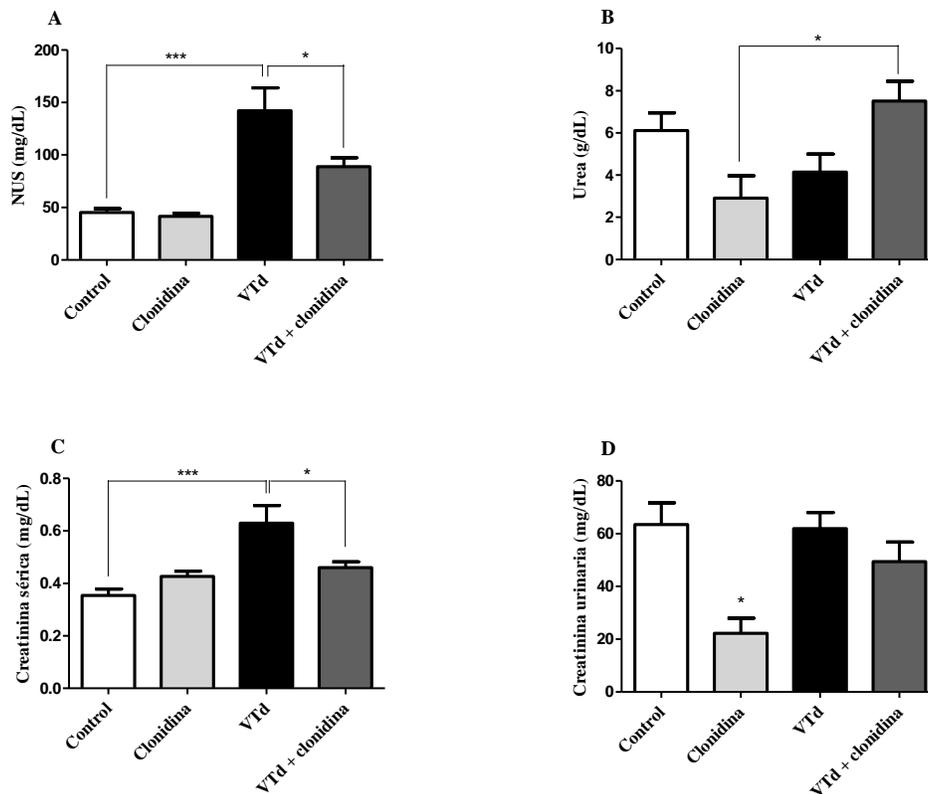


Figura 21. Efecto de la inyección de clonidina cada 2 h en ratones BALB/c previamente inyectados con veneno de *Tityus discrepans*, sobre el nitrógeno ureico sanguíneo, urea urinaria, creatinina sérica y creatinina urinaria. Ratones BALB/c ( $20 \pm 2$  g) fueron inyectados vía ip con una dosis de  $1 \mu\text{g/g}$  de veneno de *T. discrepans* (VTd). Los puntos corresponden al promedio  $\pm$  EEM de once animales ( $n = 11$ ). Diferencias significativas entre barras unidas por corchetes o en su defecto con respecto al control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

El NUS mostró un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en los animales envenenados (Figura 21 A:  $142,00 \pm 21,85$  mg/dL vs.  $45,30 \pm 3,66$  mg/dL), efecto que fue revertido ( $p < 0,05$ ) por la clonidina (Figura 21 A:  $88,95 \pm 8,49$  mg/dL vs.  $142,00 \pm 21,85$  mg/dL). La urea en orina no mostró ningún cambio, excepto ( $p < 0,05$ ) al comparar el valor obtenido con la clonidina sola (Figura 21 B:  $2,92 \pm 1,05$  g/dL) y el obtenido en los ratones envenenados y tratados con clonidina (Figura 21 B:  $7,51 \pm 0,94$  g/dL). La creatinina sérica mostró un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en los ratones envenenados (Figura 21 C:  $0,63 \pm 0,06$  mg/dL vs.  $0,36 \pm 0,025$  mg/dL), efecto que fue reducido ( $p < 0,05$ ) por la clonidina (Figura 21 C:  $0,46 \pm 0,02$  mg/dL vs.  $0,36 \pm 0,03$  mg/dL). Por otra parte, el valor de creatinina urinaria mostró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en los ratones tratados con clonidina (Figura 21 D:  $22,21 \pm 5,76$  mg/dL Vs.  $63,5 \pm 8,17$  mg/dL), pero

no hubo efecto del veneno ( $p > 0,05$ ). El veneno indujo neutrofilia y linfopenia ( $p < 0,05$ ), como puede observarse en la Figura 22 (% de polimorfonucleares neutrófilos:  $44,14 \pm 3,31$  vs.  $23,57 \pm 2,21$ ; % de linfocitos:  $55,71 \pm 3,32$  vs.  $74,71 \pm 1,97$ ); la neutrofilia no fue revertida por la clonidina a la dosis ensayada, ya que mostró un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en comparación con el control (% de polimorfonucleares neutrófilos:  $37,00 \pm 4,54$  vs.  $23,57 \pm 2,21$ ).

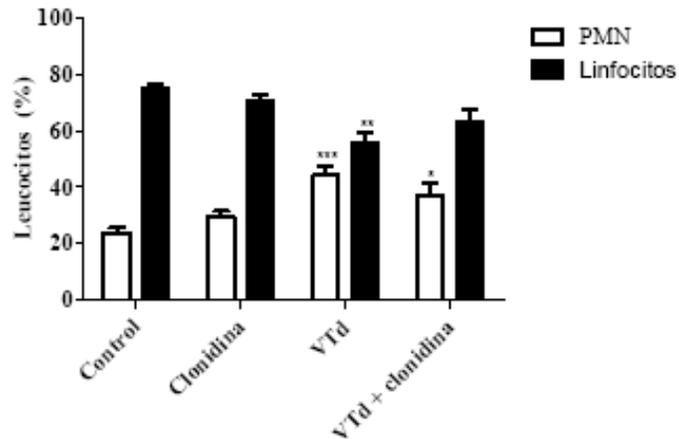


Figura 22. Efecto de la inyección intraperitoneal de clonidina sobre el leucograma en ratones BALB/c previamente inyectados con veneno de *Tityus discrepans*. Ratones BALB/c ( $20 \pm 2$  g) fueron inyectados con una dosis de  $1 \mu\text{g/g}$  de veneno de *T. discrepans* (VTd). Las barras corresponden al promedio  $\pm$  EEM de once animales ( $n = 11$ ). Diferencias significativas con respecto al control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). PMN: Polimorfonucleares neutrófilos.

### 3.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

En la Figura 23 se muestran microfotografías donde se aprecian los cambios histopatológicos inducidos por el veneno de *T. discrepans* sobre el páncreas (Figura 23 A), los riñones (Figura 23 B) y los pulmones (Figura 23 C). En la Figura 23 A, correspondiente a páncreas, se observa (panel derecho) un vaso sanguíneo que presenta hemorragia, mientras que en el inserto “a” puede observarse la presencia de vacuolización en una región del páncreas de ratones envenenados. El patrón de zimógeno en el control es normal, mostrando acinos pancreáticos con sus núcleos en la periferia y un centro acidófilo granular correspondiente a zimógeno. En el panel derecho de la Figura 23 A, se observa un patrón de zimógeno menos regular que en el control, con algunos acinos aparentemente normales mientras que muchos otros parecen haber vaciado su contenido.

En el riñón se observaron también algunos cambios inflamatorios y focos de hemorragia (Figura 23 B, panel derecho), así como una gran distensión tubular (flechas). A nivel pulmonar (Figura 23 D), fue evidente la gran celularidad inducida por el veneno de escorpión (Figura 23 D, panel derecho), correspondiente a un severo infiltrado inflamatorio que produjo un gran engrosamiento septal, con áreas hemorrágicas y edematosas. En vista de la ausencia de cambios significativos en los niveles de amilasa sérica (animales envenenados en relación con el control), se decidió estudiar el patrón de zimógeno en cada uno de los grupos experimentales con más detalle, en un intento de correlacionar la clínica y los indicadores séricos y urinarios con este patrón. El resultado puede observarse en las Figuras 24 y 25.

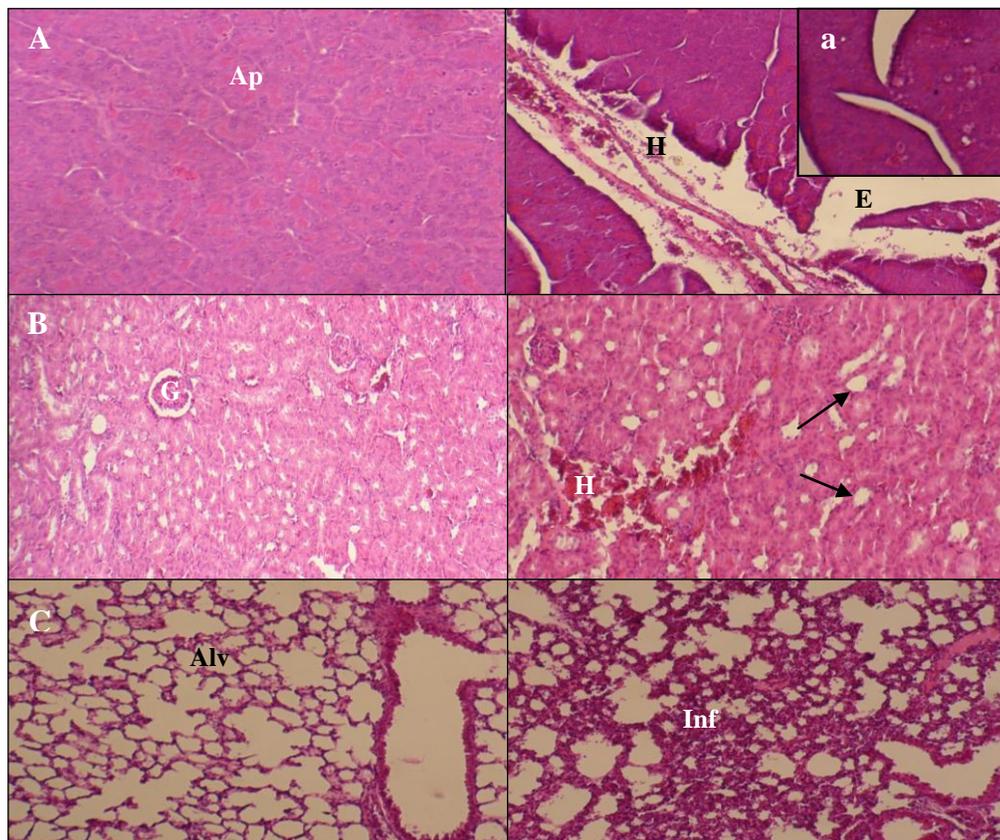


Figura 23. Cambios histopatológicos inducidos por la inyección intraperitoneal de veneno de *Tityus discrepans* en ratones BALB/c. Los órganos fueron obtenidos mediante necropsia, fijados rápidamente en formalina buferada y posteriormente procesados para ser teñidos con hematoxilina y eosina. Los paneles de la izquierda corresponden a controles inyectados con NaCl 0,9 %, mientras que los paneles de la derecha corresponden a animales inyectados con veneno. A. Páncreas; a (inserto): Detalle de vacuolización pancreática. B. Riñón; C. Pulmón; Leyenda: Ap: Acino pancreático; Alv: Alvéolo pulmonar; E: Edema; G: Glomérulo renal; H: Hemorragia; Inf: Infiltrado inflamatorio. Las flechas indican túbulos contorneados dilatados. Aumento: X100.

Se realizó análisis morfométrico de los páncreas procesados, para evidenciar cambios en el patrón de los gránulos de zimógeno. Para ello, se analizaron microfotografías como se describe en Materiales y Métodos. Una muestra representativa de ellas, se muestra en la Figura 24.

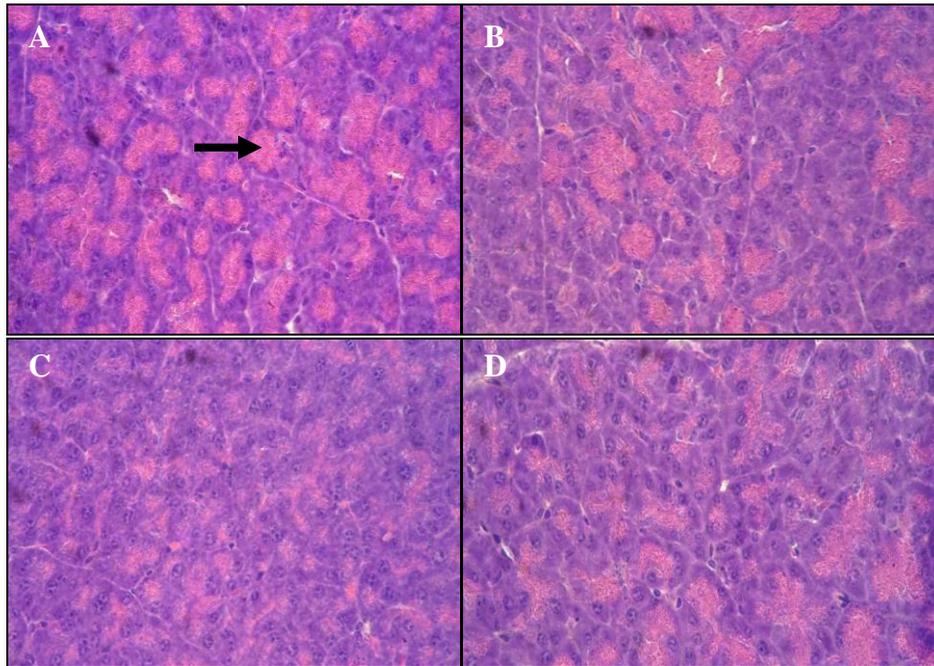


Figura 24. Microfotografías de páncreas provenientes de ratones BALB/c inyectados con veneno de *Tityus discrepans* o solución fisiológica por la vía intraperitoneal, tratados o no con clonidina. Panel A: control; panel B: VTd; panel C: clonidina; panel D: VTd + clonidina. Los tejidos fueron obtenidos mediante necropsia y fijados rápidamente en formalina buferada (pH 7,4). Posteriormente fueron procesados para tinción con hematoxilina y eosina. La flecha en A indica el centro acidófilo de un acino pancreático, donde se encuentran almacenados los gránulos de zimógeno. Aumento: X400.

Como puede apreciarse en la Figura 24 A, los acinos pancreáticos muestran un patrón de tinción típico, caracterizado por un centro acidófilo (rosado) correspondiente a gránulos de zimógeno y una región basal basófila (violeta) hacia la periferia. Se observó una pérdida marcada de dicho patrón en los páncreas de ratones envenenados (Figura 24 B). Por otra parte, el patrón observado en los páncreas de animales tratados con clonidina fue aparentemente normal (Figura 24 C). En los páncreas de los animales envenenados y tratados con el fármaco (Figura 24 D), se apreciaron muchos acinos mostrando el patrón normal y otros aparentemente vacíos.

Con la finalidad de comparar de manera objetiva las diferencias observadas en este estudio histopatológico, se hizo el análisis de las microfotografías mediante el programa *ImageJ*, como aparece descrito en Materiales y Métodos. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 25. El análisis morfométrico de estas microfotografías mostró disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del área acidófila ocupada por gránulos de zimógeno en los páncreas de animales envenenados en relación con el control (Figura 25:  $21869,00 \pm 916,80 \mu\text{m}^2$  vs.  $33054,00 \pm 1021,00 \mu\text{m}^2$ ), efecto que fue reducido ( $p < 0,05$ ) por la clonidina ( $29306,00 \pm 1139,00 \mu\text{m}^2$  vs.  $21869 \pm 916,80 \mu\text{m}^2$ ).

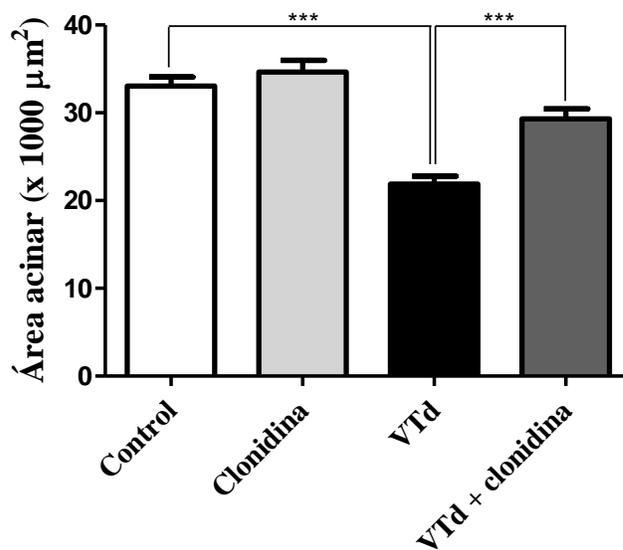


Figura 25. Efecto del tratamiento con clonidina en ratones previamente inyectados con veneno de *Tityus discrepans* sobre el área en la región acidófila (gránulos de zimógeno) de los acinos pancreáticos. El área fue determinada mediante el uso del programa *ImageJ* a partir de microfotografías, como se describe en Materiales y Métodos. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  EEM del área correspondiente a gránulos de zimógeno calculada en 10 a 15 microfotografías tomadas al azar en páncreas provenientes de siete animales ( $n = 7$ ). Diferencias significativas entre barras unidas por corchetes (\*\*\*)  $p < 0,001$ . VTd: Veneno de *T. discrepans*.

## DISCUSIÓN

### 1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES: EFECTO DEL VENENO DE *Tityus discrepans* Y LA CLONIDINA SOBRE ALGUNOS INDICADORES DE QUÍMICA CLÍNICA EN RATONES CD1

En el modelo experimental murino empleado en este trabajo, logramos reproducir alteraciones clínicas descritas por otros autores, como mioclonos, diarrea, dacriorrea, priapismo y piloerección (D'Suze *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2004). Se evidenció, transcurridas seis horas de la inyección del veneno, un nivel máximo de hiperglicemia. Ha sido ampliamente descrito el desarrollo de hiperglicemia asociado a la acción del veneno de *T. serrulatus*, posiblemente debido a la liberación de adrenalina, cortisol y glucagón inducida por la acción de las toxinas sobre el sistema autonómico, con la consecuente glicogenólisis hepática y muscular (D'Suze *et al.*, 2003; Cusinato *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2010). No obstante, otros mecanismos hiperglicemiantes no relacionados con el sistema nervioso autonómico podrían también estar implicados, tales como la inducción de gluconeogénesis de manera directa por la acción de componentes del veneno, como ha sido evidenciado en estudios *in vitro* realizados con tiras de hígado y músculo, sometidos a la acción del veneno de escorpión (Mohamed *et al.*, 2002). La clonidina indujo también una marcada hiperglicemia, con un máximo al cabo de 1 h post-inyección. Esta hiperglicemia podría deberse a la inducción de hiper glucagonemia e hipoinsulinemia, efectos de la clonidina ampliamente descritos (Skoglund *et al.*, 1987; Oda *et al.*, 1991).

Se observó la aparición más rápida y con mayor severidad de los signos de envenenamiento en los ratones CD1 cuando se utilizó la vía subcutánea, en comparación con la vía intraperitoneal. Estudios de farmacocinética realizados con el veneno de *Leiurus quinquestriatus*, han sugerido una rápida y significativa absorción desde el sitio de inyección subcutánea, *i.e.*, 70 % de la concentración máxima en sangre dentro de los 15 min post-inyección (Ismail, 1995). Sin embargo, estudios similares donde se describa la absorción del veneno de escorpión desde la cavidad peritoneal, aparentemente no han sido realizados, quizás por no ser ésta la vía natural de inyección del veneno. Los ratones BALB/c parecen haber sido más susceptibles que los ratones CD1 al efecto hiperglicemiante del veneno de escorpión. Algunos factores genéticos podrían estar relacionados con las diferentes sensibilidades observadas en las dos cepas de ratones

evaluadas en este trabajo, sin embargo se requiere realizar estudios adicionales para esclarecer el patrón de susceptibilidad ante el veneno entre las cepas de ratones utilizadas.

Se evidenció el aumento de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) de manera dosis-dependiente en los ratones CD1 envenenados. Probablemente la mayor cantidad de LDH provenga de tejidos típicamente afectados por la acción del veneno, tales como corazón, riñón, pulmón y páncreas (Adi-Bessalem *et al.*, 2008). La enzima LDH es una enzima ubicua, de tal manera que la destrucción de estos y otros tejidos libera gran cantidad de LDH a la sangre. La destrucción tisular probablemente es debida a mecanismos inflamatorios, por ejemplo los derivados de la activación y exocitosis de enzimas por parte de los neutrófilos, ya que el veneno de *T. discrepans* parece carecer de componentes proteolíticos (D'Suze *et al.*, 2004). La liberación rápida de citoquinas, tales como IL-1 $\beta$ , IL-6 y el TNF- $\alpha$  que ocurre en el envenenamiento escorpiónico (Fukuhara *et al.*, 2003), es crucial para el desarrollo de la fase aguda de la respuesta inflamatoria, donde la liberación subsecuente de factores como las prostaglandinas, leucotrienos, factor de activación plaquetario y óxido nítrico juega un papel esencial en el daño a los órganos (Adi-Bessalem *et al.*, 2008). Los macrófagos y neutrófilos podrían participar también en la destrucción tisular no sólo por el reclutamiento derivado de la liberación de los factores proinflamatorios mencionados, sino también por activación directa inducida por algunos componentes del veneno (Willems *et al.*, 2002; Petricevich *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2011). Por otra parte, el tráfico y activación de estas células inflamatorias puede ser modulado de manera directa por el sistema nervioso autónomo (Elenkov *et al.*, 2000). La presencia de componentes procoagulantes en el veneno de *T. discrepans*, capaces de inducir la formación de microtrombos y daños microvasculares, constituye también un factor importante en la destrucción tisular (D'Suze *et al.*, 2004). El aumento de la actividad lítica del complemento, es también capaz de amplificar la respuesta inflamatoria, ocasionando alteraciones multiorgánicas (Bertazzi *et al.*, 2003; Adi-Bessalem *et al.*, 2008).

En este trabajo se evidencia que el nivel de amilasa sérica en los ratones envenenados no sufre cambios significativos, al menos en las condiciones experimentales utilizadas, a diferencia de la amilasa urinaria. Un resultado similar ha sido descrito en el envenenamiento por *T. pachyurus*, donde no ocurre aumento de la amilasa sérica (Barona *et al.*, 2004). La enzima  $\alpha$ -amilasa proviene fundamentalmente de dos fuentes: las glándulas salivales y el páncreas, siendo la amilasa pancreática excretada por el riñón de manera preferencial a la salival, ya que estas dos

enzimas, aunque de tamaño similar, poseen cargas diferentes (Wetzels *et al.*, 1988). Por esta razón, la amilasa urinaria ha sido sugerida como un marcador de daño pancreático más confiable que la amilasa sérica (Al-Bahrani *et al.*, 2005). De esta manera, el aumento de la amilasa urinaria evidenciado en este trabajo, podría deberse a un aumento de la secreción pancreática de amilasa, la cual alcanzaría el torrente sanguíneo proveniente de acinos y ductos pancreáticos en proceso de destrucción, o posiblemente por vía endocrina (Miyasaka y Rohtman, 1981). Sin embargo, el hecho de que existan cambios estructurales en las glándulas salivales, inducidos por el veneno, sugeriría que parte de esa amilasa urinaria podría ser de origen extrapancreático, *i.e.*, proveniente de las glándulas salivales (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2000), aunque lógicamente en menor cuantía, según las características farmacocinéticas previamente mencionadas. Por otra parte, durante la pancreatitis se ha demostrado un aumento del *clearance* (aclaramiento) de amilasa, posiblemente debido a la disminución de la reabsorción tubular de la misma (Johnson *et al.*, 1976).

## **2. EFECTO DEL VENENO DE *Tityus discrepans* EN RATONES BALB/c PRETRATADOS CON CLONIDINA**

No se observaron diferencias significativas en los niveles de glicemia, amilasa sérica, amilasa urinaria, NUS, creatinina y LDH, al comparar animales envenenados con animales envenenados pretratados con clonidina. Sin embargo, el nivel de amilasa sérica obtenido en los animales tratados con clonidina, parece haber tenido una tendencia a la disminución, lo cual concuerda con los hallazgos descritos por Rozé *et al.* (1981) y Miyasaka y Rohtman (1981). En conjunto, estos resultados sugieren que la clonidina posiblemente ejerció un efecto inhibitorio de la función autonómica por un corto período en comparación con la duración del efecto del veneno, especialmente cuando comparamos estos resultados con los obtenidos al tratar con clonidina a los animales previamente envenenados. De hecho, el comportamiento farmacocinético del veneno y de la clonidina es completamente diferente. Conway y Jarrot (1980) han evidenciado una vida media de 40 a 80 min de la clonidina en diversos tejidos, con un pico de concentración tisular a los 2 min que se corresponde con la fase hipotensiva del fármaco. Este hallazgo concuerda con los resultados preliminares previamente discutidos, donde se observó que la clonidina genera un pico de hiperglicemia la primera hora, mientras que pasadas dos horas la glicemia retorna a los niveles normales. Por otra parte, el efecto del pretratamiento

con clonidina sobre el leucograma de ratones envenenados parece haber sido una potenciación del efecto neutrofílico y linfopénico, lo cual podría deberse a un rebote simpático posterior al efecto simpaticolítico del fármaco, de manera similar a como ha sido descrito en casos de retiro de la clonidina luego de su aplicación crónica (Augustine *et al.*, 1982).

En relación con la función renal, el incremento del nitrógeno ureico sanguíneo (NUS) descrito en este trabajo podría sugerir una alteración funcional de tipo prerrenal, que usualmente está relacionada con alteraciones de la perfusión glomerular, producto de la deshidratación y alteraciones de la presión arterial como consecuencia del envenenamiento. El aumento del NUS y la creatinina ha sido descrito en casos de escorpionismo experimental (Omran y Abdel-Rahman, 1992; More *et al.*, 2004). La urea sintetizada en el hígado y proveniente del metabolismo de aminoácidos, se excreta fundamentalmente en el riñón, donde es reabsorbida un 40-50 % de la misma en función inversamente proporcional a la velocidad de filtrado glomerular, por lo cual se incrementa notablemente en fallas de tipo prerrenal (González de Buitrago *et al.*, 1998). La creatinina por su parte, proviene fundamentalmente del músculo y es excretada exclusivamente por vía renal, donde no sufre reabsorción pero sí puede ser secretada en baja proporción (González de Buitrago *et al.*, 1998). El aumento del NUS y la creatinina ocurren de manera frecuente en casos de falla renal aguda o necrosis glomerular aguda (Kaplan y Pesce, 1989).

Aunque la creatinina también se incrementó de manera significativa, se observó un aumento notable de la relación urea:creatinina (datos no mostrados). La reabsorción de nitrógeno ureico a nivel tubular depende de la tasa de filtración glomerular, y se ha demostrado la disminución de la tasa de filtración glomerular como consecuencia de la acción vasoconstrictora del veneno de *T. serrulatus* sobre riñones aislados y perfundidos (Alves *et al.*, 2005). Aparte de una falla prerrenal, una falla intrarrenal podría también ocasionar un incremento del NUS (González de Buitrago *et al.*, 1998). Es importante mencionar que en estudios de distribución de veneno de *T. serrulatus* en ratones, los niveles más altos se encontraron en primer lugar en los riñones (Revelo *et al.*, 1996), lo cual sugeriría que las toxinas serían capaces de actuar directamente sobre este órgano. Por otra parte el aumento del NUS podría deberse en parte al catabolismo proteico exacerbado por la destrucción tisular que ocurre en el cuadro de escorpionismo. Al estudio con microscopía de luz, se encontró en los riñones infiltración leucocitaria, hemorragia y distensión tubular. Estos hallazgos podrían explicarse no sólo por el severo cuadro inflamatorio sistémico sino quizás por la acción vasoconstrictora renal del veneno, que eventualmente podría conllevar a isquemia

(Alves *et al.*, 2005). El valor de creatinina fue utilizado para establecer la relación amilasa:creatinina, observándose una tendencia al aumento de la misma (datos no mostrados). Este tipo de indicador, se ha sugerido, pudiera ser útil en casos donde el aumento de amilasa sérica es ligero y existen dudas sobre la existencia de pancreatitis (Marten *et al.*, 1977), aunque otros autores han cuestionado su uso por el hecho que su incremento no sólo se ha observado en casos de pancreatitis aguda sino también en otras condiciones clínicas (Levine *et al.*, 1975).

El leucograma mostró un perfil neutrofílico y linfopénico, lo cual pudiera ser consecuencia de la liberación masiva de catecolaminas, las cuales tienen un efecto ampliamente descrito sobre la activación y circulación de los leucocitos (para una revisión extensa, ver Elenkov *et al.*, 2000). En este sentido, Benschop *et al.* (1996), han evidenciado una linfocitosis rápida (30 min) seguida de una linfopenia y neutrofilia (2-4 h) como consecuencia de la administración de catecolaminas en humanos. Estos mismos autores señalan el *pool* marginal y los pulmones como principal fuente de neutrófilos recién reclutados a la circulación. En este trabajo, se evaluó el recuento leucocitario a las 6 horas post-inyección, lo cual sugeriría que la linfopenia y la neutrofilia observadas podrían tener un origen similar al descrito por Benschop *et al.* (1996). Sin embargo, en experimentos donde se ha evaluado el efecto neutrofílico del veneno de *T. serrulatus*, se ha encontrado que la principal movilización de neutrófilos ocurre desde la médula ósea, por un mecanismo dependiente del receptor de PAF (*Platelet-Activating Factor*; Borges *et al.*, 2000).

### **3. EFECTO DE LA CLONIDINA EN RATONES BALB/c PREVIAMENTE INYECTADOS CON VENENO DE *Tityus discrepans***

Cuando los animales se trataron con clonidina 30 min después de inyectar el veneno, se evidenció un efecto sinérgico sobre la glicemia, posiblemente debido a hiperglucagonemia e hipoinsulinemia, ambos descritos tanto para el veneno de escorpión como para la clonidina (Oda *et al.*, 1991; Cusinato *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2010). Se observó, al igual que en el caso de los experimentos donde se pretrataba con el fármaco, un aumento significativo de la actividad LDH en los animales envenenados, efecto que no fue revertido significativamente por el tratamiento con clonidina. Sin embargo, la actividad LDH mostró una tendencia a la disminución bajo los efectos de la clonidina, lo cual indica que deberían realizarse estudios adicionales para aclarar

este efecto, ya que la LDH constituye un indicador de daño tisular generalizado, cuya modulación farmacológica sería de gran trascendencia.

El estudio histopatológico permitió observar cambios estructurales importantes en los páncreas de animales envenenados, como fueron la hemorragia perivascular, el edema y la pérdida del patrón de zimógeno, los cuales indican que un cuadro de pancreatitis aguda fue en efecto generado por el veneno de escorpión. La vacuolización pancreática, una de las manifestaciones de cuadros de pancreatitis severos, fue un hallazgo inconstante, lo cual coincide con resultados obtenidos por otros autores (Borges *et al.*, 2004). Posiblemente, el veneno de *T. discrepans* sea capaz de causar este tipo de vacuolización de una manera más tardía, como ha sido demostrado previamente (D'Suze *et al.*, 2004). También se evidenció daño pulmonar, caracterizado por infiltración leucocitaria, edema y hemorragia, los cuales podrían deberse al síndrome de inflamación sistémica y a las alteraciones en el sistema de coagulación presentes en los animales envenenados (D'Suze *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2009). Se ha sugerido que el veneno de *T. discrepans* no ejerce un efecto directo sobre el pulmón (D'Suze *et al.*, 1999) y el rol de los mastocitos en la génesis del daño pulmonar podría ser fundamental, ya que en animales depletados de mastocitos se previene el edema agudo de pulmón inducido por el veneno de *T. serrulatus* (De Matos *et al.*, 2001). Adicionalmente, las alteraciones cardiovasculares complejas que el veneno de escorpión es capaz de producir, han sido señaladas como un factor etiológico muy importante en la génesis del edema pulmonar (Ismail, 1995). La extensa destrucción tisular evidenciada a nivel pulmonar, podría señalarse como una de las causas importantes del incremento observado en los niveles de LDH séricos (Addi-Bessalem *et al.*, 2008), tal como lo observamos en los ensayos preliminares en ratones de la cepa CD1.

Aunque no se observó un efecto significativo del veneno sobre el nivel de amilasa sérica, sí se apreció una disminución significativa del valor de la amilasa sérica en los animales envenenados y tratados con clonidina, en relación con los animales envenenados no tratados. Este hallazgo podría interpretarse como el resultado del efecto modulador ejercido por la clonidina sobre la función autonómica central y periférica (Klupp *et al.*, 1970; Tsurusaki *et al.*, 1990; Lechin y van der Dijs, 2008b), que se traduciría posiblemente en la disminución del efecto secretagogo (Rozé *et al.*, 1981) y constrictor del veneno (Coelho *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 2004). Posiblemente, también se encuentre involucrado un efecto antiinflamatorio, ya que el guanabenz, otro agonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, es capaz de suprimir las reacciones inflamatorias

mediante inhibición de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa (Chang *et al.*, 1987). Evidencias claras del potente efecto supresor ejercido por la clonidina sobre la secreción exocrina pancreática fueron mostradas por Rozé *et al.* (1981). Estos autores demostraron, en ratas cuyos conductos pancreáticos fueron canulados, la disminución abrupta del flujo, el contenido proteico y el contenido de bicarbonato de la secreción pancreática exocrina, con un máximo de inhibición aproximadamente a los 60 min, al inyectar clonidina por vía subcutánea o intracerebroventricular. Este efecto fue antagonizado por la yohimbina, fármaco que por sí solo fue capaz de estimular la secreción pancreática.

Al realizar los análisis morfométricos de las microfotografías de páncreas, se observó una importante coincidencia entre estos resultados y su interpretación teórica, ya que se evidenció una disminución significativa del área acinar ocupada por gránulos de zimógeno en los ratones envenenados, efecto que es reducido por la clonidina. Este hallazgo sugiere un efecto anti-secretor de la clonidina aún en presencia de un potente secretagogo, como lo es el veneno de escorpión. Estos resultados también constituyen un motivo suficiente para extender los estudios a otras áreas del organismo típicamente afectadas durante el escorpionismo, con la finalidad de probar el efecto de la clonidina sobre los cambios fisiopatológicos en esas regiones.

Se observó un claro efecto deletéreo del veneno de escorpión sobre la función renal, de manera similar a lo observado en la serie de experimentos anteriores, manifestándose con incremento del NUS y la creatinina. Este incremento en ambos indicadores clínicos fue reducido por la clonidina, sugiriendo un posible efecto nefroprotector. Debe mencionarse que tanto la arteriola aferente como la eferente poseen abundantes receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, con mayor densidad de ellos en la arteriola aferente (Strasser *et al.*, 1992), de tal manera, el efecto de la norepinefrina sobre estos receptores podría estar sujeto a la modulación de la liberación de este neurotransmisor por parte de la clonidina en el terminal presináptico. La actividad simpática neural a este nivel podría ser la responsable de la disminución de la tasa de filtración glomerular observada por el efecto del veneno de *T. serrulatus* sobre riñones perfundidos (Alves *et al.*, 2005).

Por otra parte, el leucograma mostró un posible antagonismo entre el efecto del fármaco y el efecto neutrofílico y linfopénico del veneno de escorpión, a juzgar por la tendencia observada, aunque hacen falta estudios adicionales para afirmar este hecho. Como ha sido mencionado

previamente, la neutrofilia y la linfopenia generadas por el veneno son similares a las observadas cuando se inyectan catecolaminas (Benschop *et al.*, 1996) y tanto a nivel central como periférico la clonidina es capaz de modular la liberación de éstas (Rozé *et al.*, 1981; Coelho *et al.*, 1986; Lechin y van der Dijs, 2008b).

#### 4. CONCLUSIÓN

Como ha sido descrito en este y otros trabajos, el veneno del escorpión venezolano *T. discrepans* posee componentes altamente tóxicos, capaces de generar daño a múltiples órganos. La infiltración masiva de leucocitos y pérdida de la estructura funcional constituyeron un hallazgo común en todos los órganos evaluados, lo cual refleja una exacerbada actividad inflamatoria y posiblemente daño tisular directo. Estas alteraciones estructurales aumentan notablemente la actividad LDH sérica, aparentemente de manera dosis-dependiente, lo cual sugeriría la posibilidad de hacer estudios de correlación entre estos indicadores y la severidad del cuadro de escorpionismo. Los niveles de  $\alpha$ -amilasa sérica y urinaria no se incrementaron de manera significativa. Sin embargo, por la tendencia al aumento de la  $\alpha$ -amilasa urinaria y el hecho que en la orina predomina la forma pancreática de la enzima, posiblemente este indicador sea más confiable que la  $\alpha$ -amilasa sérica a nivel clínico, para el diagnóstico de pancreatitis aguda asociada al escorpionismo, ya que algunos autores han encontrado que la hiperamilasemia en los pacientes envenenados es inconstante (D'Suze *et al.*, 2003).

Los resultados sugieren un efecto antisecretor de la clonidina en el páncreas exocrino, lo cual probablemente esté relacionado con la modulación de la actividad autonómica, que también explicaría el aparente efecto nefroprotector observado. Estos hallazgos merecen especial atención y deben servir de punto de partida para otros estudios, donde no sólo se utilice la clonidina y otros fármacos similares en el modelo experimental planteado en este trabajo, sino también algunos antagonistas específicos como la yohimbina y el piperóxán, con la finalidad de esclarecer los mecanismos fisiopatológicos/farmacológicos involucrados. El efecto de estos fármacos sobre las evidentes alteraciones observadas en órganos como los pulmones y el corazón debe ser estudiado en próximos experimentos.

Las respuestas clínicas observadas en las dos cepas de ratones empleadas en este trabajo, sugieren que entre las mismas existen diferencias en la susceptibilidad al envenenamiento

escorpiónico (BALB/c > CD1), las cuales deben ser consideradas. El conocimiento en profundidad de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el escorpionismo por *T. discrepans* y otros escorpiones de interés médico en nuestro país. y la puesta a prueba de fármacos capaces de interferir con el desarrollo de los mismos, permitirán nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento exitoso de las víctimas del escorpionismo.

## APÉNDICE

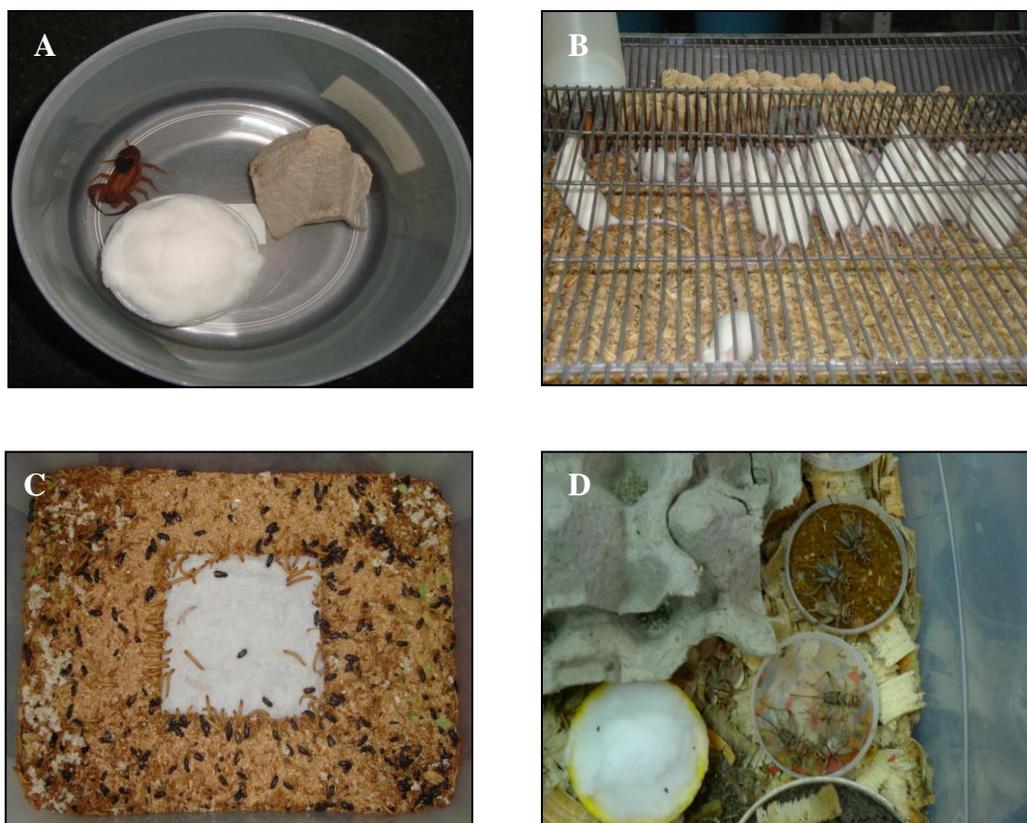


Figura 1. Condiciones de mantenimiento de los animales de laboratorio. Panel A, escorpión *Tityus discrepans* (la tapa del envase ha sido removida). Panel B, ratones. Panel C, tenebrios (*Tenebrio molitor*). Panel D, grillos (*Acheta domestica*).

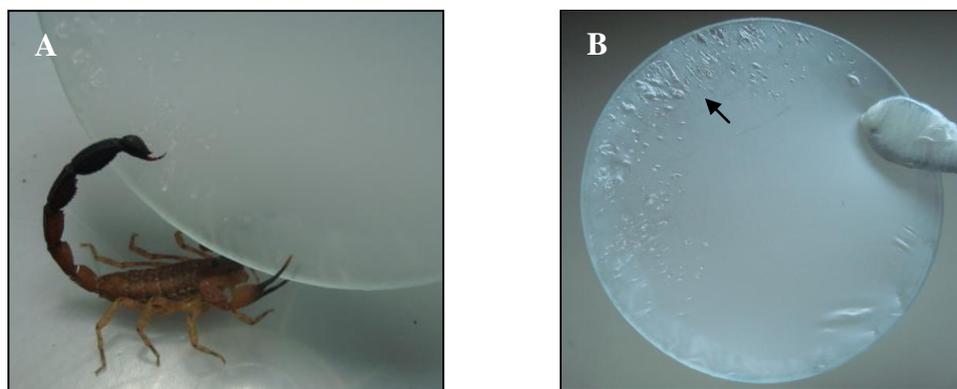


Figura 2. Extracción del veneno de los escorpiones. Panel A, escorpión aculeando lámina de Parafilm®. Panel B, detalle de las gotas de veneno en la lámina de Parafilm® (flecha).

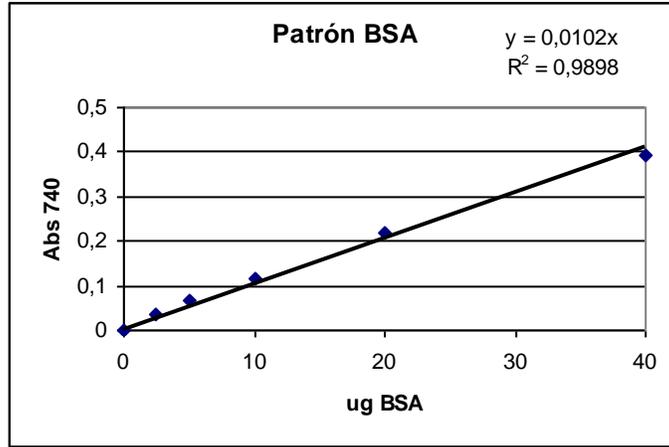


Figura 3. Calibración con albúmina sérica bovina (BSA) para determinación de proteínas por el método de Lowry (1951).

## REFERENCIAS

- Adi-Bessalem A., Hammoudi-Triki D., Laraba-Djebari F. 2008. Pathophysiological effects of *Androctonus australis* Hector scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. *Exp. and Toxicol. Pathol.* 60:373-380.
- Adler G., Gerhard G., Schick J., Rohr G., Kern H.F. 1983. Effects of in vivo cholinergic stimulation of rat exocrine pancreas. *Am. J. Physiol.* 244(6):G623-G629.
- Al-Bahrani A.Z., Ammori B.J. 2005. Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis. *Clin. Chim. Acta* 362(1-2):26-48.
- Almeida F.M., Pimenta A.M., De Figueiredo, S.G. Santoro M.M., Martin-Eauclaire M.F., Diniz C.R., De Lima M.E. 2002. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 40(7):1041-1045.
- Alvarenga L.M., Diniz C.R., Granier C., Chávez-Olórtegui C. 2002. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon* 40(1):89-95.
- Alvarenga L.M., Machado de Avila R.A., Amim P.R., Martins M.S., Kalapothakis E., de Lima M.E., Santos R.G., Granier C., Chávez-Olórtegui C. 2005. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 46:664-671.
- Alves R., Falcão do Nascimento, R., Ferreira P.S., Kerntopf M.R., Abreu L.M., Mota de Sousa C., Martins R., Sousa D., Rodríguez de Queiroz M.G., Toyama M.H., Fonteles M.C., Martins A.M., Monteiro H. 2005. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 46:271-276.
- Augustine S., Buckley J., Tachikawa S., Lokhandwala M. 1982. Involvement of central noradrenergic mechanisms in the rebound hypertension following clonidine withdrawal. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4(3):449-455.

- Barona J., Otero R., Núñez V. 2004. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: Capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica* 24(1):42-49.
- Bartholomew C. 1970. Acute Scorpion Pancreatitis in Trinidad. *Brit. Med. J.* 1:666-668.
- Bartholomew C., McGeeney K.F., Murphy J.J., Fitzgerald O., Sankaran H. 1976. Experimental studies on the aetiology of acute scorpion pancreatitis. *Br. J. Surg.* 63(10):807-810.
- Batista C.V., D'Suze G., Gomez-Lagunas F., Zamudio F.Z., Encarnacion S., Sevcik C., Possani L.D. 2006. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics* 6(12):3718-3727.
- Benschop R.J., Rodriguez-Feuerhahn M., Schedlowski M. 1996. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain. Behav. Immun.* 1092:77-91.
- Bertazzi D.T., de Assis-Pandochi A.I., Azzolini A.E., Talhaferro V.L., Lazzarini M., Arantes E.C. 2003. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, Ts TX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon* 41(4):501-508.
- Blanco M., Rodríguez-Acosta A., Pulido-Mendez M., Rodríguez C., González L. 1999. Pancreas ultrastructural alterations in mice inoculated with *Tityus discrepans* (Buthidae) venom. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 31(1):51-56.
- Bock J.U., van Zwieten P.A. 1971. The central hyperglycaemic effect of clonidine. *Eur. J. Pharmacol.* 16(3):303-310.
- Borges A., Arantes E., Giglio J. 1990. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (Karsh). *Toxicon* 28(9):1011-1017.
- Borges A. 1996. Escorpionismo en Venezuela. *Acta Biol. Venez.* 16(3):65-75.
- Borges A., Arandia J., Colmenares de Arias Z., Vargas A., Alfonzo M. 2002. Caracterización epidemiológica y toxicológica del envenenamiento por *Tityus zulianus* (Scorpiones, Buthidae) en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista de la Facultad de Medicina*, 25(1): 60-63.

- Borges A., De Sousa L. 2006. Escorpionismo en Venezuela: Una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. *Rev. Fac. Farmacia (Caracas)* 69:15-27.
- Borges A., De Sousa L., Espinoza J., Santos R., Kalapothakis E., Valadares D, Chávez-Olórtegui C. 2008. Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian Antivenoms. *Toxicon* 51:66-79.
- Borges A., García C., Lugo E., Alfonzo M., Jowers M., Op den Camp H. 2006a. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* (Scorpiones, Buthidae): Molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 142:240-252.
- Borges A., Lugo E., Rojas F., García C. 2005. Toxicidad del Veneno del Escorpión *Tityus perijanensis* y Neutralización por el Antiveneno Anti-*Tityus discrepans*. *Acta Cient. Venez.* 56 (supl. I), 67.
- Borges A., Rojas-Runjaic F. 2007. *Tityus perijanensis* González-Sponga (Scorpiones, Buthidae): Molecular assessment of its geographical distribution and venom lethality of Venezuelan populations. *Toxicon* 50:1005-1010.
- Borges A., Rojas-Runjaic F.J., Faks J.G., Op den Camp H.J., De Sousa L. 2010. 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 Environ. Med.* 21(4):282-290.
- Borges A., Op den Camp H.J., De Sanctis J.B. 2011. Specific activation of human neutrophils by scorpion venom: a flow cytometry assessment. *Toxicol In Vitro* 25(1):358-367.
- Borges A., Silva S., Op den Camp H., Velasco E., Alvarez M., Alfonzo M., Jorquera A., De Sousa L., Delgado O. 2006b. In vitro leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Parasitol. Res.* 99(2):167-173.
- Borges A., Trejo E., Vargas A.M., Céspedes G., Hernández A., Alfonzo M.J. 2004. Pancreatic toxicity in mice elicited by *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* scorpion venoms. *Invest. Clin.* 45(3):269-276.

- Borges A, Tsushima R.G., Backx P.H. 1999. Antibodies against *Tityus discrepans* venom do not abolish the effect of *Tityus serrulatus* venom on the rat sodium and potassium channels. *Toxicon* 37(6):867-881.
- Borges CM., Silveira M.R., Aparecida M., Beker C.L., Freire-Maia L., Teixeira M.M. 2000. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. *J. Leukoc. Biol.* 67(4):515-519.
- Boyer L.V., Theodorou A.A., Berg R.A., Mallie J. 2009. Antivenom for critically ill children with neurotoxicity from scorpion stings. *New Engl. J. Med.* 360(20):2090-2098.
- Brooks F.P. 1973. The neurohumoral control of pancreatic exocrine secretion. *Am. J. Clin. Nut.* 26:291-310.
- Catterall W.A. 1986. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Biochem.* 55:953-955.
- Cestèle S., Catterall W. 2009. Toxins targeting mammalian sodium channels. En: de Lima, M., Pimenta A., Martin-Eauclaire M., Zingali R., Rochat H (Eds.). *Animal Toxins: State of the Art.* Editora UFMG, Brasil. Pp 99-121.
- Cestèle S., Qu V., Rogers J.C., Rochat H., Scheuer T., Catterall W.A. 1998. Voltage sensor-trapping enhanced activation of sodium channel by beta scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 21:919-931.
- Chávez-Olórtegui C., Kalapothakis E. 1997. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon* 35:1523-1529.
- Chávez-Olórtegui C., Kalapothakis E., Ferreira A.M., Ferreira A.P., Diniz C.R. 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35(2):213-221.
- Chávez-Olórtegui C., Molina F., Granier C. 2002. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha- and beta-toxins from the venom *Tityus serrulatus* scorpion. *Mol. Immunol.* 38(11):867-876.
- Chang, J., Blazek E., Skowronek M., Marinari L., Carlson R. 1987. The antiinflammatory action of guanabenz is mediated through 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 142(2):197-205.

- Cheng J.W., Shi C.X., Schloithe A.C., Toouli J., Saccone G.T. 2004. Scorpion venom stimulates biliary/duodenal motility and pancreatic exocrine secretion. *Neurogastroenterol. Motil.* 16(4):447-454.
- Chippaux J.P., Goyffon M. 2008. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica* 107:71-79.
- Chuang R.S., Jaffe H., Cribbs L., Perez-Reyes E., Swartz K.J. 1998. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* 1(8):668-674.
- Coelho J.C., Gouma D.J., Moody F.G., Li Y.F., Weisbrodt N.W. 1986. Influence of autonomic drugs on the motility of the sphincter of Oddi in the opossum. *Surg. Gynecol. Obstet.* 163(3):209-214.
- Cohen L., Karbat I., Gilles N., Froy O., Corzo G., Angelovici R., Gordon D., Gurevitz M. 2004. Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative “hot spot” common to all scorpion  $\beta$ -toxins affecting  $\text{Na}^+$  channels. *J. Biol. Chem.* 279(9):8206-8211.
- Conway E.L., Jarrott B. 1980. Clonidine distribution in the rat: temporal relationship between tissue levels and blood pressure response. *Br. J. Pharmacol.* 71(2):473-478.
- Corrado A.P., Antônio A., Diniz C.R. 1968. Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*), an unusual sympathetic postganglionic stimulant. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 164:253-258.
- Cortez-Retamozo V., Lauwereys M., Hassanzadeh G., Gobert M., Conrath K., Muyldermans S., De Baetselier P., Revets H. 2002. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer* 98(3):456-462.
- Couraud F., Jover E. 1984. Mechanisms of action of scorpion toxin. In: Tu, A. (Ed.). *Handbook of Natural Toxins vol 2.*, Marcel Dekker, New York, pp. 659-678.
- Cunha-Melo J.R., Freire-Maia L., Tafuri W.L., Maria T.A. 1973. Mechanism of action of purified scorpion toxin on the isolated rat intestine. *Toxicon* 11:81-84.
- Cusinato D.A., Souza A.M., Vasconcelos F., Guimarães L.F., Leite F.P., Gregório Z.M., Giglio J.R., Arantes E.C. 2010. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 56(8):1477-86.

- D'Suze G., Comellas A., Pesce L., Sevcik C., Sánchez de León R. 1999. *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through an indirect mechanism. *Toxicon* 37(1):173-180.
- D'Suze G., Schwartz E., García-Gómez B.I., Sevcik C., Possani L.D. 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. *Biochimie* 91:1010-1019.
- D'Suze G., Moncada S., González C., Sevcik C., Aguilar V., Alagón A. 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon* 41(3):367-75.
- D'Suze G., Salazar V., Diaz P, Sevcik C., Azpurua H., Bracho N. 2004. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* 44:851-60.
- D'Suze G., Sevcik C., Ramos M. 1995. Presence of curarizing polypeptides and a pancreatitis-inducing fraction without muscarinic effects in the venom of the venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (Karsh). *Toxicon* 33(3):333-345.
- De Lima M., Martin-Eauclaire M., Chávez-Olórtegui C., Diniz C., Granier C. 1993. *Tityus serrulatus* toxins display a complex pattern of antigenic reactivity. *Toxicon* 31:223-227.
- De Matos I.M., Talvani A., Rocha O.O., Freire-Maia L., Teixeira M.M. 2001. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon* 39(6):863-7.
- De Rezende N. A., Borges M., Campolina D., Chávez-Olórtegui C., Ribeiro C., Santos Amaral C. 1995. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52(3):277-280.
- De Sousa L., Bonolo S., Quiroga M., Parrilla P. 1996. Scorpion sting epidemiology in Montes Municipality of the State of Sucre, Venezuela: geographic distribution. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38:147-152.
- De Sousa L., Parrilla-Álvarez P., Quiroga M. 2000. An epidemiological review of scorpion stings in Venezuela: the Northeastern region. *J. Venom. Anim. Toxins.* 6:127-165.

- DeBin J.A., Strichartz G.R. 1991. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 29(11):1403-1408.
- Dehesa-Dávila M., Possani L.D. 1994. Scorpionism and Serotherapy in Mexico. *Toxicon* 32: 1015-1018.
- De-Matos I.M., Talvani A., Freire-Maia L., Teixeira M.M. 2001. Evidence for the role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon* 39:861-867.
- Diniz C.R., Torres J.M. 1968. Release of an acetylcholine-like substance from guinea-pig ileum by scorpion venom. *Toxicon* 5:277-281.
- El Ayeb M., Delori P., Rochat H. 1983. Immunochemistry of scorpion alpha-toxins: antigenic homologues checked with radioimmunoassay (RIA). *Toxicon* 21:709-716.
- Elenkov I.J., Ronald W., Chrousos G.P., Vizy S. 2000. The Sympathetic Nerve-An Integrative Interface Between Two Supersystems: The Brain and the Immune System. *Pharmacological Reviews* 52(4):595-638.
- Espino-Solis G., Rião-Umbarila L., Baltasar B., Possani L. 2009. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. *J. Prot.* 72(2):183-199.
- Fet V., Lowe G. 2000. Genus *Tityus* C. L. Koch, 1836. En: Fet V., Sissom W.R., Lowe G., Braunwalder M.E. *Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998)*. New York Entomol. Soc. 690 pp.
- Fletcher P. L. Jr., Fletcher M., Possani L.D. 1992. Characteristics of pancreatic exocrine secretion produced by venom from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Eur. J. Cell Biol.* 58:259-270.
- Fletcher P. L., Fletcher M., Fainter L. K., Terrian D. M. 1996. Action of New World scorpion venom and its neurotoxins in secretion. *Toxicon* 34 (11-12):1399-1411.
- Fontecilla-Camps J.C., Habersetzer-Rochat C., Rochat H. 1988. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:7443-7447.
- Frank R. 1992. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48:9217-9232.

- Freire-Maia L. 1995. Peripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. J. Toxic. –Toxin Rev. 14:423-435.
- Freire-Maia L., Campos J.L., Amaral C.F.S. 1994. Approaches to the Treatment of Scorpion Envenoming. Toxicon 32:1009-1112.
- Fukuhara Y.D., Reis M.L., Dellalibera-Joviliano R., Cunha F.Q., Donadi E.A. 2003. Increased levels of IL1-, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. Toxicon 41:49-55.
- Gallagher S., Sankaran H., Williams J.A. 1981. Mechanism of scorpion toxin-induced enzyme secretion in rat pancreas. Gastroenterology 80(5 pt 1):970-973.
- Gazarian K.G., Gazarian T., Hernández R., Possani L. 2005. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. Vaccine 23:3357-3368.
- Gjörstrup P. 1984. Effects of some alpha-adrenoceptor stimulating and blocking agents on the salivary secretion in the rabbit. Acta Physiol. Scand. 120(4):567-577.
- Goldsby R., Kindt T., Osborne B. 2000. Immunology, 4<sup>th</sup> ed. Freeman and Co. USA. 670 pp.
- González de Buitrago J.M., Ferreiro A., Rodríguez-Segade M., Sánchez-Pozo A. 1998. Bioquímica clínica. McGraw Hill Interamericana, España. Pp 483-497.
- González-Sponga M. A. 1997. Guía para identificar Escorpiones de Venezuela. Cuadernos Lagoven. Caracas. Ediciones Lagoven. 204 pp.
- González-Sponga M. A. 2002. Venezuelan Arachnids. Four new species of the genus *Tityus* (Scorpionida: Buthidae). Bol. Acad. Cienc. Fís. Mat. Nat. LXII:49-66.
- González-Sponga M. A. 2005. Arácnidos de Venezuela. Redescipción de *Tityus discrepans* (Karsh, 1879) (Scorpionida: Buthidae). Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales 161-162:91-100.
- Gordon D., Gurevitz M. 2003. The selectivity of scorpion  $\alpha$ -toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. Toxicon 41:125-128.
- Gordon D., Savarin P., Gurevitz M., Zinn-Justin S. 1998. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. J. Toxicol. Toxin Rev. 17:131-159.

- Goyffon M., Vachon M., Broglio N. 1982. Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon* 20:337-344.
- Granier C., Novotny J., Fontecilla-Camps J., Fourquet P., El Ayeb M., Bahraoui E. 1989. The antigenic structure of a scorpion toxin. *Mol. Immunol.* 26:503-515.
- Green G.J., Wilson H., Yates M.S. 1979. The effect of clonidine on centrally and peripherally evoked submaxillary salivation. *Eur. J. Pharmacol.* 53(3):297-300.
- Griesbacher T., Lembeck F. 1992. Effects of the bradykinin antagonist, HOE 140, in experimental acute pancreatitis. *Br. J. Pharm.* 107(2):356-360.
- Griesbacher T., Rainer I., Tiran B., Fink E., Lembeck F., Peskar B.A. 2003. Mechanism of kinin release during experimental acute pancreatitis in rats: evidence for pro- as well as anti-inflammatory roles of oedema formation. *Br. J. Pharmacol.* 139(2):299-308.
- Gronski P., Seiler F.R., Schwick H.G. 1991. Discovery of antitoxins and development of antibody preparations for clinical uses from 1890 to 1990. *Mol. Immunol.* 28:1321-1332.
- Gurevitz M., Zilberberg N., Froy O., Turkov M., Wilunsky R., Karbat I., Anglister J., Shaanan B., Pelhate M., Adams M., Gilles N., Gordon D. 2002. Diversification of toxic sites on a conserved protein scaffold – a scorpion recipe for survival. En: Menez A. (Ed.), *Perspectives in Molecular Toxinology*, Wiley, Chichester, England, pp. 239-253.
- Gutiérrez J.M., León G., Lomonte B. 2003. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. *Clin. Pharmacokinet.* 42(8):721-741.
- Herrera M., León G., Segura A., Meneses F., Lomonte B., Chippaux J.P., Gutiérrez J.M. 2005. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon* 46(7):775-781.
- Holst J.J., Schaffalitzky de Muckadell O.B., Fahrenkrug J. 1979. Nervous control of pancreatic exocrine secretion in pigs. *Acta Physiol. Scand.* 105:33-51.
- Ismail M. 1995. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* 33(7):825-858.
- Ismail M., Abd-Elsalam M.A. 1988. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon* 26:233-256.

- Ismail M., Abd-Elsalam M.A. 1996. Serotherapy of scorpion envenoming: pharmacokinetics of antivenoms and a critical assessment of their usefulness. *Toxicon* 34(2):147.
- Ismail M., Abdullah M.E., Morad A., Ageel A.M. 1980. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labeled venom from the scorpion *Androctonus amorexi* (And & Sar). *Toxicon* 18:301-308.
- Ismail M., Fatani A.J., Dabees T.T. 1992. Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and an effect of kallikrein-kinin inhibitors. *Toxicon* 30(10):1257-1279.
- Jaworek J., Nawrot-Porabka K., Leja-Szpak A., Konturek S.J. 2010. Brain-gut axis in the modulation of pancreatic enzyme secretion. *J. Phys. Pharmacol.* 61(5):523-531.
- Johnson S.G., Ellis C.J., Levitt M.D. 1976. Mechanism of increased renal clearance of amylase/creatinine in acute pancreatitis. *New Engl. J. Med.* 295(22):1214-7.
- Kaplan L., Pesce A. 1989. *Clinical Chemistry: Theory, analysis and correlation* (2<sup>nd</sup> ed.). The C.V. Mosby Company, USA. Pp 347-358.
- Karbat I., Frolow F., Froy O., Gilles N., Cohen L., Turkov M., Gordon D., Gurevitz M. 2004. Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion alpha-toxins. *J. Biol. Chem.* 279(3):31679-31686.
- Klupp H., Knappen F., Otsuka Y., Streller I., Teichmann H. 1970. Effects of Clonidine on central sympathetic tone. *Eur. J. Pharmacol.* 10(2):225-229.
- Kobinger W., Walland A. 1972. Facilitation of vagal reflex bradycardia by an action of clonidine on central receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 19(2):210-217.
- Konturek S.J., Zabielski R., Konturek J.W., Czarnecki J. 2003. Neuroendocrinology of the pancreas; role of brain-gut axis in pancreatic secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 481:1-14.
- Koss M.C., Christensen H.D. 1979. Evidence for a Central Postsynaptic Action of Clonidine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 307:45-50.
- Lampel M., Kern H.F. 1977. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.* 373(2):97-117.
- Laloo D.G., Theakston R.D. 2003. Snake antivenoms. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41(3) :277-290.

- Laune D., Molina F., Ferrieres G., Villartd S., Bes C., Rieunier F., Chardes T., Granier C. 2002. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J. Immun. Methods* 267:53-70.
- Lechin F., van der Dijs B. 2008a. Arginine-induced pancreatitis: involvement of the autonomic nervous system? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294:G1450-G1451.
- Lechin F., van der Dijs B. 2008b. Crosstalk between the autonomic nervous system and the central nervous system: mechanistic and therapeutic considerations for neuronal, immune, vascular, and somatic based diseases. In: Maiese K. (Editor). *Neurovascular medicine: pursuing cellular longevity for healthy aging*. Oxford University Press, New York. Pp 101-152.
- Legros C., Kaabi H., El Ayeb M., Céard B., Vacher H., Bougis P., Martin-Eauclaire M. 2002. Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine* 20:934-942.
- Levine R., Glauser F., Berk E. 1975. Enhancement of the amylase/creatinine clearance ratio in disorders other than acute pancreatitis. *New. Engl. J. Med.* 292(7):329-332.
- Loewy A.D., Franklin M.F., Haxhiu M.A. 1994. CNS monoamine cell groups projecting to pancreatic vagal neurons: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. *Brain Res.* 638(1-2):248-260.
- Loiacono R.E., Story D.F. 1986. Effect of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists on cholinergic transmission in guinea-pig isolated atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 334(1):40-47.
- Lourenço W.R. 1994. Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities. *Biogeographica* 70:155-160.
- Lourenço W.R., 2002. *Scorpions of Brazil*. Les Editions de l'If, Paris. 306 pp.
- Love J., Yi E., Smith T. 2007. Autonomic pathways regulating pancreatic exocrine secretion. *Autonomic Neurosc: Basic and Clin.* 133:19-34.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr LA, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 265-275.

- Machado de Avila R.A., Alvarenga L.M., Tavares C.A., Molina F., Granier C., Chávez-Olórtegui C. 2004. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon* 44(3):233-241.
- Magalhães M., Pereira M., Amaral C., Rezende N., Campolina D., Bucarechi F. Gazzinelli R.T., Cunha-Melo J.R.. 1999. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 37:1155-1164.
- Maria W.S., Velarde D.T., Alvarenga L.M., Nguyen C., Villard S., Granier C., Chávez-Olórtegui C. 2005. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon* 46:210-217.
- Marten A., Beales D., Elias E. 1977. Mechanism and specificity of increased amylase/creatinine clearance ratio in pancreatitis. *Gut* 18:703-708.
- Martin-Eauclaire M.F., Céard B., Ribeiro A.M., Diniz C.R., Rochat H., Bougis P.E. 1994. Biochemical, pharmacological and genomic characterization of TsIV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett.* 342(2):181-184.
- Martin-Eauclaire M.F., Couraud F. 1995. Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms. In: Chang W., Dyer R.S. (Eds.), *Handbook of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York, pp. 683-716.
- Mazzei de Dávila C., Dávila D., Donis J., de Bellabarba G., Villareal V, Barboza J. 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 40:1339-1346.
- Mendes T.M., Maria W.S., Granier C., Chávez-Olórtegui C., Kalapothakis E. 2004. Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies. *Toxicon* 44:617-624.
- Mermet C., Quintin L. 1991. Effect of clonidine on catechol metabolism in the rostral ventrolateral medulla: an in vivo electrochemical study. *Eur. J. Pharmacol.* 204(1):105-107.
- Miyasaka K., Rohtman S.S. 1981. Endocrine secretion of alpha-amylase by the pancreas. *Am. J. Physiol.* 241(2):G170-5.

- Mohamed A.H., Hani-Ayobe M., Beskharoun M.A., el-Damarawy N.A. 1972. Glycaemic responses to scorpion venom. *Toxicon* 10(2):139-149.
- Molina F., Laune D., Gougat C., Pau B., Granier C. 1996. Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Peptide Res.* 9:151-155.
- More S.S., Kiran K.M., Gadaq J.R. 2004. Dose-dependent serum biochemical alterations in Wistar albino rats alter *Palamneus gravimanus* (Indian Black scorpion) envenomation. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 15(3-4):263-275.
- Mota J.V., Ghersy J.V., de Nieto M.T. 1998. Clinical evaluation of the early use of scorpion antivenom in patients poisoned by *Tityus discrepans* scorpions. 6th Panamerican Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. September 21-26. Hotel Laguna Mar, Isla de Margarita, Venezuela. Resumen Th-pO-10.
- Mota J.V., Ghersy J.V., de Nieto M.T., Bastardo M., Rodríguez J., Duque L., Freytez L.A. 1994. Emponzoñamiento escorpiónico: clínica y laboratorio usando antivenina. *Bol. Hosp. Niños (Caracas)* 30:35-40.
- Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De Waard M., Sabatier J-M. 2004. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* 378:717-726.
- Nakamura T., Yoshimura M., Shinnick-Gallagher P., Gallagher J.P., Akasu T. 1984. Alpha 2 and alpha 1-adrenoceptor mediate opposing actions on parasympathetic neurons. *Brain Res.* 323(2):349-353.
- Niebergall-Roth E., Singer M.V. 2001. Central and peripheral neural control of pancreatic exocrine secretion. *J. Phys. Pharmacol.* 52(4):523-538.
- Nirathanan S., Pil J., Abdel-Mottaleb Y., Sugahara Y., Gopalakrishnakone P., Joseph J.S., Sato K., Tytgat J. 2005. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1 from *Heterometrus spinifer* venom. *Biochem. Pharmacol.* 69(4):669-678.
- Novaes G., Catanzaro O.L., Beraldo W.T., Freire-Maia L. 1982. Effect of purified scorpion toxin (Tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. *Toxicon* 20(5):847-853.

- Oda S., Fujimura H., Sasaki Y., Ohneda A. 1991.  $\alpha_2$ -Adrenergic Modulation of Glucagon and Insulin Secretions in Sheep. *Tohoku J. Exp. Med.* 163:101-110.
- Omran M.A., Abdel-Rahman M.S. 1992. Effect of scorpion *Leiurus quinquestriatus* (H&E) venom on the clinical chemistry parameters of the rat. *Toxicol Lett* 61(1):99-109.
- Pantoja J.L., Renner I.G., Abramson S.B., Edmonson H.A. 1983. Production of Acute Hemorrhagic Pancreatitis in the Dog Using Venom of the Scorpion, *Buthus quinquestriatus*. *Dig. Dis. Sci.* 28(5):429-439.
- Peres A.C., Nonaka P.N., Camillo de Carvalho P., Toyama M.H., Melo e Silva C.A., Vieira R., Dolhnikoff M., Zamuner S.R., Franco de Oliveira L.V. 2009. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon* 53(7-8):779-785.
- Petricevich V.L., Hernández A., Coronas F.I., Possani L.D. 2007. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon* 50:666-675.
- Pimenta A.M., De Lima M.E. 2005. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J. Pept. Sci.* 11:670-676.
- Pimenta A.M., De Marco A., De Lima M.E., Martin-Eauclaire M.F., Bougis P.E. 2003. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17(5):413-418.
- Poggioli de Scannone, J. 1996. Suero antiescorpiónico. Desarrollo y producción. Resúmenes del I Taller. Los Escorpiones y sus Toxinas, Biología, Clínica y Toxicología. Caracas, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, p. 11.
- Polikarpov I., Junior M.S., Marangoni S., Toyama M.H., Teplyakov A. 1999. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. *J. Mol. Biol.* 290(1):175-184.
- Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J. 1999. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur. J. Biochem.* 264:287-300.

- Prophet E., Mills B., Arrington J., Sobin L., Heffess C., Mullick F. (Eds.). 1992. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) Washington D.C. 280 pp.
- Quiroga, M., De Sousa L., Parrilla-Álvarez P. 2000. The description of *Tityus caripitensis*. A new Venezuelan scorpion (Scorpionida, Buthidae). J. Venom. Anim. Toxins. 6:99-117
- Rabito S.F., Orstavik T.B., Scicli A.G., Schork A., Carretero O.A. 1983. Role of the autonomic nervous system in the release of rat submandibular gland kallikrein into the circulation. Circ. Res. 52(6):635-641.
- Rand M.J., Rush M., Wilson J. 1969. Some observations on the inhibition of salivation of ST 155 [2-(2,6-dichlorophenylamine)-2-imidazolidine hydrochloride, Catapres, Catapresan]. Eur. J. Pharmacol. 5:168-172.
- Revelo M.P., Bambirra E.A., Ferreira A.P., Diniza C.R., Chávez-Olórtegui C. 1996. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. Toxicon 34(10):1119-1125.
- Reyes-Lugo M., Rodríguez-Acosta A. 2001. Scorpion envenoming by *Tityus discrepans* Pocock, 1897 in the Northern Coastal Region of Venezuela. Rev Cient FCV-LUZ XI(5):412-417.
- Ribeiro E.L., Pinto M.C.L., Labarrère C.R., Paes P.R.O., Paes-Leme F.O., Chávez-Olórtegui C., Melo M.M. 2010. Biochemical profile of dogs experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon 55:1125-1131.
- Rivière G., Choumet V., Audebert F., Sabouraud A., Debray M., Scherrmann J.M., Bon C. 1997. Effect of antivenom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. J. Pharmacol. Exp. Ther. 281(1):1-8.
- Rodríguez de la Vega R., Possani L. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup> channels. Toxicon 43:865-875.
- Rodríguez de la Vega R., Possani L. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. Toxicon 46:831-844.

- Rodríguez-Acosta A., Pulido-Mendez M., Strauss M., Finol H.J., Rodríguez L., González L., Blanco M. 2000. Salivary gland ultrastructural alterations in mice inoculated with *Tityus discrepans* (Buthidae) venom. *J Submicroscop Cytol Pathol* 32(2):241-245.
- Rozé C., Chariot J., Appia F., Pascaud X., Vaille C. 1981. Clonidine inhibition of pancreatic secretion in rats: a possible central site of action. *Eur J Pharm* 76:381-390.
- Sankaran H., Bartholomew C., Fitzgerald O., McGeeney K.F. 1977. Secretory effect of the venom of the scorpion *Tityus trinitatis* on rat pancreatic slices. *Toxicon* 15(5):441-446.
- Shulov A., Zlotkin E. 1969. A simple device for collecting scorpion venoms. *Toxicon* 2:169-170.
- Sidach S.S., Mintz I.M. 2002. Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. *J. Neurosci.* 22(6):2023-2034.
- Skoglund G., Lundquist I., Ahrén B. 1987.  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor activation increases plasma glucagon levels in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 143:83-88.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1):76-85.
- Smythe G., Bradshaw J., Gleeson R., Grunstein H., Nicholson M. 1985. The central vs. peripheral effects of clonidine on ACTH, corticosterone and glucose release. *Eur. J. Pharmacol.* 111:401-403.
- Solberg L., Brooks F.P. Cholinergic control of rabbit pancreas secretion. 1969. *Am. J. Dig. Dis.* 14(11):782-787.
- Strasser R.H., Ihl-Vahl R., Marquetant R. 1992. Molecular biology of adrenergic receptors. *J. Hypertens.* 10(6):501-506.
- Theakston R.D.G., Warrell D.A., Griffiths E. 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41:541-557.
- Timmermans P., van Zwieten P.A. 1977. Central and peripheral alpha-adrenergic effects of some imidazolidines. *Eur. J. Pharmacol.* 45(3):229-236.

- Tsurusaki M., Yoshida M., Akasu T., Nagatsu I. 1990. Alpha 2-adrenoceptors mediate the inhibition of cholinergic transmission in parasympathetic ganglia of the rabbit urinary bladder. *Synapse* 5(3):233-240.
- Tytgat J., Chandy K.G., Garcia M.L., Gutman G.A., Martin-Eauclaire, M.F., van der Walt J.J., Possani L.D. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: a-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:444-447.
- Valdivia H.H., Fuentes O., el-Hayek R., Morrisette J., Coronado R. 1991. Activation of the ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 266(29):19135-19138.
- Van Regenmortel M. H. 2001. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals* 29(3-4):209-213.
- Was S., Coleman F.H., Travagli R.A. 2007. Cholecystokinin-8s excites identified rat pancreatic-projecting vagal motoneurons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293(2):G484-G492.
- Wetzels J.F.M., Hafkenscheld J.C.M., Hessels M., Holtsma A.J., Koene R.A.P. 1988. Renal Clearance of Pancreatic and Salivary Amylase Relative to Creatinine Clearance in Patients with Renal Disease and Proteinuria. *Clin. Chem.* 34(3):589-591.
- Wheeler K.P., Watt D.D., Lazdunski M. 1983. Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pluggers Arch.* 397(2):164-165.
- Willems J., Noppe W., Moerman L., van der Walt J., Verdonck F. 2002. Cationic peptides from scorpion venom can stimulate and inhibit polymorphonuclear granulocytes. *Toxicon* 40:1679-1683.
- Yahi N., Devaux C., Mansuelle P., Defendini M.L., Granier C. 1992. Monoclonal antibodies to toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector: further characterization of epitope specificities and neutralization capacities. *Toxicon* 30(7):723-731.
- Zeng X.C., Corzo G., Hahin R. 2005. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life* 57(10):13-21.

Zlotkin E., Shulov A.S. 1969. A simple device for collecting scorpion venom. *Toxicon* 7(4):331-332.