



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI  
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**VARIABILIDAD GEOGRÁFICA E INTERSEXUAL DEL VENENO DE  
*Tityus nororientalis* (SCORPIONES, BUTHIDAE) EN RATONES C57BL/6**

Asesor

Leonardo De Sousa

Trabajo de Grado presentado por

Aguilera Rodríguez, Rebeca Nohemí

Curupe Martínez, Luz Marina

Granados Ramos, Isabel Cristina

Como requisito parcial para optar al título de **MEDICO-CIRUJANO**

Barcelona, septiembre de 2010



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI  
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD  
COMISIÓN TRABAJO DE GRADO

**DECLARACIÓN JURADA**

El Trabajo de Grado presentado por las Estudiantes Universitarias **Aguilera Rodríguez, Rebeca Nohemí** C.I. № V-17.418.771, **Curupe Martínez, Luz Marina** C.I. № V-16.718.417 y **Granados Ramos, Isabel Cristina** C.I. № V-17.900.865, titulado “**VARIABILIDAD GEOGRÁFICA E INTERSEXUAL DEL VENENO DE *Tityus nororientalis* (SCORPIONES, BUTHIDAE) EN RATONES C57BL/6**”, ha sido aprobado por el Jurado Evaluador, quienes lo han encontrado correcto en su contenido y forma de presentación; asimismo, declaran que los datos presentados son responsabilidad exclusiva de los autores, en fe de lo cual firman:

Profa. Mercedes del Valle Matos

**Miembro Principal**

Prof. Stefano Bónoli

**Miembro Principal**

Prof. Leonardo De Sousa

**Miembro Principal Asesor**

Profa. Rosibel Villegas

**Coordinadora Comisión de Trabajos de Grado**

Escuela de Ciencias de la Salud

Septiembre 2010

## RESUMEN

### VARIABILIDAD GEOGRÁFICA E INTERSEXUAL DEL VENENO DE *Tityus nororientalis* (SCORPIONES, BUTHIDAE) EN RATONES C57BL/6

Aguilera Rodríguez, Rebeca Nohemí; Curupe Martínez, Luz Marina y Granados Ramos, Isabel Cristina. Asesor De Sousa, Leonardo. Laboratorio de Toxinología, Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

El presente trabajo se realizó con el objeto de evaluar diferencias en los parámetros de producción de veneno y de toxicidad intersexual del veneno de una población de *Tityus nororientalis* González-Sponga, 1996 (Scorpiones, Buthidae) capturada en la localidad de Las Melenas, estado Sucre. La actividad biológica de los venenos de escorpiones machos y hembras fue ensayada luego de su inyección intraperitoneal en ratones hembra C57BL/6 de 15-25 g de peso. La letalidad fue cuantificada a través de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>), determinada según el método secuencial de Dixon y Mood para una hora de experimentación. El efecto clínico de los venenos se evaluó observando el curso temporal de toxicidad aguda experimental. Los resultados indicaron, en términos de producción de veneno, que cada hembra de *Tityus nororientalis*, por estimulación eléctrica, produce en promedio para peso y volumen, 1,18 mg y 8,16 µL de veneno; valores significativamente menores a los machos (en promedio 2,77 mg y 11,58 µL). La letalidad (en mg kg<sup>-1</sup>) del veneno de las hembras fue significativamente menor [8,43 (8,00-8,54)] al de los ejemplares macho [10,61 (10,07-11,30);  $p = 0,000001$ ]. En todos los casos, el cuadro clínico indicó neurotoxicidad aguda de los venenos ensayados; con signos predominantemente colinérgicos (con algunas manifestaciones adrenérgicas y centrales), similares a aquellos observados en humanos envenenados. Aunque

comparable en su naturaleza neurotóxica, el curso temporal de toxicidad entre los dos venenos es de magnitud y cinética diferencial fundamentalmente en la fase de toxicidad grave (sialorrea abundante, disnea bradipnea-apnea, exoftalmos y parálisis espástica); tales signos aparecieron de manera significativamente más temprana en el caso de los animales inyectados con el veneno de hembras de *Tityus nororientalis*. Los resultados obtenidos indicarían variaciones intersexuales del veneno en esta especie que podrían estar relacionadas con su expresión proteómica y que, adicionalmente, apuntaría a confirmar la alta complejidad de los venenos de este grupo taxonómico con expresión en diversidad toxinológica genérica dentro de la misma especie.

## **DEDICATORIA**

Primeramente agradezco a mi maravilloso Dios, por permitirme alcanzar esta meta y darme todo lo que tengo.

A mis queridos padres Dorelys de Aguilera y Jesús Aguilera, quienes siempre me han dado fuerzas y de su ayuda incondicional.

A mis seis hermanos: Heidi, Nataly, Dorelys, Gabriela, Salvador y Antonio Aguilera, quienes han estado a mi lado en los buenos y malos momentos brindándome su apoyo y cariño.

A mis compañeras de tesis: Isabel Granados y Luz Marina Curupe que me han acompañado en este proyecto brindándome su colaboración y amistad.

A mis especiales amigos: Víctor Pabón, Dulce Adrian, Yonny Salazar, Eglenis Rojas y demás amigos que colaboraron en mi formación como persona y en la realización de esta tesis.

A mi estimado y excepcional tutor el Dr. Leonardo De Sousa, quien con su carisma, humildad y dedicación nos brindo todo su apoyo.

Finalmente a todos aquellos profesores y personas que supieron dejar una huella imborrable en mi corazón por medio de sus enseñanzas.

Rebeca Nohemí Aguilera Rodríguez

## **DEDICATORIA**

A Dios, fuente de mi fe y esperanza.

A mis queridos y amados Padres Raquel Martínez y Dorgelis Curupe. No existen palabras que puedan expresar lo agradecida que estoy por su incondicional apoyo y por estar siempre presentes; “Gracias por creer en mí” representan sin duda alguna el pilar fundamental de mi existencia. Este logro es una realidad basada en su confianza, esmero y dedicación.

A mí querida y amada hermana Laura Curupe, por su presencia.

A Edgar José Guerra amigo incondicional, compañero de vida; gracias por tu apoyo y por estar presente en los momentos difíciles.

A mi madrina Ludys Isis y a mi abuelo Raúl Martínez por sus consejos y apoyo.

A mis queridos tíos, primos y amigos, por estar presentes en la consecución de este logro.

A mis amigas y compañeras tesistas Isabel Granados y Rebeca Aguilera y a mi querido Profesor Leonardo De Sousa; por tanto apoyo, valiosos consejos y enseñanzas.

Luz Marina Curupe Martínez

## **DEDICATORIA**

Primeramente quisiera agradecer a Dios por la vida que tengo y vivo; por las cosas buenas y malas que he pasado y la fuerza que me da para seguir adelante.

A mis padres: Belkis Ramos y Yonny Granados; así como mis tres hermanos: Johnny, Adriana y María de Jesús que me apoyan y han estado conmigo en todas las etapas de mi vida, los amo.

A José Gregorio Pérez que ha sido mi amigo, mi compañero y novio que adoro; constantemente ha participado y colaborado en todos mis proyectos y éxitos que he vivido.

A mis amigas: Carolina, Gior y Mirjana; confiables que han contribuido a mi formación como persona y con su gran apoyo en mi tesis.

A mis compañeras de tesis: Luz Marina Curupe y Rebeca Aguilera que han pasado conmigo con esta tesis de todo, personas maravillosas que han soportado mis malos humores así como hemos compartido buenos momentos.

Finalizando y no siendo menos importante quisiera agradecer a nuestro asesor el Dr. Leonardo De Sousa; excelente persona que siempre contamos con su ayuda y su mano amiga, nunca nos dejó solas. Muchas Gracias.

Isabel Cristina Granados Ramos

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Oriente y Escuela de Ciencias de la Salud del Núcleo Anzoátegui por brindarnos la oportunidad de ser sus hijos académicos y así poder cumplir uno de nuestros más anhelados sueños; a través de sus conocimientos teóricos y prácticos llenos de ética, profesionalismo y mucha sabiduría.

Al Laboratorio de Toxinología, Secciones de Bioquímica y Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo Anzoátegui, por permitirnos el desempeño y elaboración de nuestro Trabajo de Grado, bajo el ejemplo de su gran experiencia en el ámbito de la investigación.

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento del Proyecto de Investigación (CI-3-040602-1342/07) titulado Biogeografía de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae). Caracterización morfológica, espacial y de historia natural.

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el financiamiento parcial de este trabajo por intermedio del Proyecto de Investigación en Red Nacional de Producción de Antivenenos N° 2007000672; mediante el Subproyecto 1: “Caracterización epidemiológica de los envenenamientos ofídicos y escorpiónicos en Venezuela, con taxonomía de las especies asociadas y bancos de venenos”, coordinado por el Dr. Leonardo De Sousa, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui y del Subproyecto 2: “Bioensayos para el estudio de la diversidad de toxinas de la fauna venenosa del país”, coordinado por el Dr. Adolfo Borges, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela; de los cuales esta propuesta forma parte.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	viii
ÍNDICE .....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPITULO I: EL PROBLEMA .....	16
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1.2 OBJETIVOS.....	18
1.2.1 General .....	18
1.2.2 Específicos.....	18
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	19
CAPITULO II: MARCO TEORICO .....	21
2.1 Taxonomía y Epidemiología .....	21
2.2 Características del veneno .....	23
2.3 Manifestaciones clínicas.....	23
CAPITULO III: MARCO METODOLOGICO .....	25
3.1 Materiales y Métodos .....	25
3.1.1 Fuente del veneno de escorpión .....	25
3.1.2 Fuente de los animales de experimentación .....	25
3.1.3 Extracción y purificación parcial del veneno .....	26
3.1.4 Determinación de la concentración de proteínas.....	27
3.1.5 Evaluación de la DL <sub>50</sub> y de los signos de toxicidad agudo experimental .....	29
3.2 Análisis estadísticos .....	30

CAPITULO IV. ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS.....	32
4.1 RESULTADOS .....	32
4.2 DISCUSIÓN.....	58
4.2.1 Significación de <i>Tityus nororientalis</i> como especie de importancia médica en el Nororiente de Venezuela.....	58
4.2.2 Utilidad del modelo múrido C57BL/6 para la evaluación del efecto del veneno de escorpiones de importancia médica en Venezuela .....	59
4.2.3 Diferencias y similitudes entre el envenenamiento experimental causado por el veneno de ejemplares hembras o machos de <i>Tityus nororientalis</i> .....	61
4.2.4 Alcances de los resultados y su contribución a la elaboración del mapa de letalidad de la escorpiofauna venezolana de importancia médica.....	66
CAPITULO V: CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	68
HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO .....	1

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos para el cálculo de la DL <sub>50</sub> del veneno de ejemplares hembra de <i>Tityus nororientalis</i> en ratones C57BL/6, administrado por vía intraperitoneal, para una hora de observación.....	36
Tabla 2. Datos para el cálculo de la DL <sub>50</sub> del veneno de ejemplares macho de <i>Tityus nororientalis</i> en ratones C57BL/6, administrado por vía intraperitoneal, para una hora de observación.....	38
Tabla 3. Frecuencia de muerte y secuencia de dosis administradas, por vía intraperitoneal, del veneno de ejemplares hembra de <i>Tityus nororientalis</i> en el modelo múrido C57BL/6. ....	39
Tabla 4. Frecuencia de muerte y secuencia de dosis administradas, por vía intraperitoneal, del veneno de ejemplares macho de <i>Tityus nororientalis</i> en el modelo múrido C57BL/6. ....	41
Tabla 5. Frecuencia de manifestaciones clínicas inducidas por toxicidad aguda del veneno de ejemplares hembra de <i>Tityus nororientalis</i> en ratones C57BL/6. ....	46
Tabla 6. Frecuencia de manifestaciones clínicas inducidas por toxicidad aguda del veneno de ejemplares macho de <i>Tityus nororientalis</i> en ratones C57BL/6. ....	47
Tabla 7. Comparación de las DL <sub>50</sub> del veneno de ejemplares de <i>Tityus nororientalis</i> provenientes de varias localidades del nororiente de Venezuela. ....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Extracción del veneno de un ejemplar de <i>Tityus quirogae</i> (Scorpiones, Buthidae) por estimulación eléctrica del telson. ....	28
Figura 2. Comparación de parámetros de producción de veneno entre hembras y machos de <i>Tityus nororientalis</i> (Scorpiones, Buthidae). ....	35
Figura 3. Determinación de la dosis letal cincuenta (DL <sub>50</sub> ) del veneno de ejemplares hembra de <i>Tityus nororientalis</i> por vip en ratones C57BL/6. Ratones hembra, cepa C57BL/6, con pesos entre 18,75 y 24,24 g fueron inyectados vip con el veneno de ejemplares hembra de <i>Tityus nororientalis</i> . Los animales fueron observados por 60 minutos. ....	42
Figura 4. Determinación de la dosis letal cincuenta (DL <sub>50</sub> ) del veneno de ejemplares macho de <i>Tityus nororientalis</i> por vip en ratones C57BL/6. DL <sub>50</sub> , vip, 60 minutos = 10,61 (10,07 – 11,30) µg.g <sup>-1</sup> de ratón. IV = 11,6%. ....	43
Figura 5. Comparación de las dosis letales cincuenta (DL <sub>50</sub> ) del veneno de ejemplares hembras y machos de <i>Tityus nororientalis</i> en ratones C57BL/6. Veneno de <i>Tityus nororientalis</i> ;.....	44
Figura 6. Comparación del curso temporal de toxicidad aguda experimental entre ratones fallecidos y sobrevivientes sometidos al veneno de ejemplares hembra de <i>Tityus nororientalis</i> . ....	50
Figura 7. Comparación del curso temporal de toxicidad aguda experimental entre ratones fallecidos y sobrevivientes sometidos al veneno de ejemplares macho de <i>Tityus nororientalis</i> . ....	51

Figura 8. Comparación del curso temporal de toxicidad aguda experimental entre ratones fallecidos y sobrevivientes sometidos al veneno de ejemplares hembra o macho de *Tityus nororientalis*..... 52

Figura 9. Comparación de un ratón C57BL/6 control con uno sobreviviente inyectado, por vip, con el veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* mostrando algunos signos de toxicidad aguda. .... 54

Figura 10. Comparación de un ratón C57BL/6 control con uno sobreviviente inyectado, por vip, con el veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* mostrando algunos signos de toxicidad aguda. .... 55

Figura 11. Ratón C57BL/6 sobreviviente inyectado por vip con el veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* mostrando el signo de Straub. .... 57

## INTRODUCCIÓN

La Dosis Letal Cincuenta ( $DL_{50}$ ) es la cantidad requerida de una droga o toxina que es capaz de producir la muerte en el cincuenta por ciento de una población de animales experimentales (Ross, 1996); su determinación es esencial para la estandarización de los venenos y antivenenos de origen natural (Sevcik, 1987).

En el Laboratorio de Toxinología, Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, desde el año 2000, se construye el mapa toxinológico de la escorpiofauna de la región nororiental y se optimiza un método para determinar el curso temporal de toxicidad y la actividad biológica del veneno de varias especies de bítidos orientales, entre ellos: *Tityus gonzalespongai*, *Tityus nororientalis*, *Tityus quirogae*, *Tityus tenuicauda* y *Rhopalurus laticauda*; para lo cual se ha utilizado el ratón negro homocigoto C57BL/6, el albino homocigoto BALBc y el albino no homocigoto NMRI (Marcano y Mundaray, 2000; Marín y Rodríguez, 2000; Boadas y Marcano, 2004; Turkali, 2004; De Sousa, 2006; Cornejo, 2008; Cova, 2008; Sánquiz y González, 2008; Da Cámara y col., 2008; Hurtado y col., 2008; De Sousa y col., 2009; De Sousa-Insana y Pino, 2009; Chadee, 2010); incorporando para alguno de los índices letales precedentes, los parámetros de producción de veneno (Chinchilla y Franco, 2003; De Sousa, 2006; Cornejo, 2008; De Sousa-Insana y Pino, 2009; Chadee, 2010) y sus perfiles cromatográficos (Valecillos, 2001; Jiménez y Paulo, 2001; De Sousa, 2006). Posteriormente, se anexaron los estudios histopatológicos a los ensayos de letalidad y curso temporal de toxicidad aguda experimental, correlacionando, en lo posible, las alteraciones histológicas con los efectos de los venenos (Albornoz y col., 2009; Salomón, 2009).

Recientemente, De Sousa-Insana y Pino (2009) y Chadee (2010) demostraron resultados toxinológicos de diferenciación de toxicidad intersexual, obtenidos para el veneno de una población de *Tityus nororientalis* capturados en Catuaro (localidad tipo de la especie). Los autores evidenciaron, entre hembras y machos, diferencias en los parámetros toxinológicos de producción de veneno, entre las  $DL_{50}$  y en la fase tardía del curso temporal de toxicidad. Bajo las condiciones experimentales establecidas, el veneno de las hembras fue significativamente más potente [ $DL_{50} = 9,46$  (8,91-9,46)  $mg.kg^{-1}$  de ratón], en términos de su índice letal, que el de los machos [ $DL_{50} = 13,36$  (12,58-13,36)  $mg.kg^{-1}$  de ratón). Las manifestaciones colinérgicas predominaron en el cuadro neurotóxico agudo; aunque demostraron diferencias intersexuales en el curso tardío; en este caso, algunos signos de toxicidad moderadamente grave se manifestaron de forma más temprana con el veneno de las hembras. Basados en estos resultados, los autores sugirieron la posibilidad de diferencias en la expresión proteómica del veneno de hembras y machos de *Tityus nororientalis* provenientes de una misma localidad o de localidades distantes.

Con este proyecto, se comprobó la variabilidad de toxicidad diferencial entre el veneno de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis* provenientes de otra localidad (Las Melenas, municipio Mariño, estado Sucre) del ámbito de distribución geográfica de la especie. Para tal fin, se determinó en ratones hembra de la cepa C57BL/6, por vía intraperitoneal y para 60 minutos de experimentación, las  $DL_{50}$  del veneno de hembras y machos de este taxón por el método secuencial de Dixon y Mood (1948), modificado por Sevcik (1987), y se compararon entre ambos venenos los parámetros de producción de veneno (expresados en miligramos de proteínas y volumen), las manifestaciones clínicas y el curso temporal de aparición de los signos inducidos como efecto tóxico del envenenamiento agudo experimental en esta cepa de ratón.

# CAPITULO I: EL PROBLEMA

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Dosis Letal Cincuenta ( $DL_{50}$ ) es la cantidad requerida de una droga o toxina que es capaz de producir la muerte en el cincuenta por ciento de una población de animales experimentales (Ross, 1996); su determinación es esencial para la estandarización de los venenos y antivenenos de origen natural (Sevcik, 1987).

En el Laboratorio de Toxinología, Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, desde el año 2000, se construye el mapa toxinológico de la escorpiofauna de la región nororiental y se optimiza un método para determinar el curso temporal de toxicidad y la actividad biológica del veneno de varias especies de bótidos orientales, entre ellos: *Tityus gonzalespongai*, *Tityus nororientalis*, *Tityus quirogae*, *Tityus tenuicauda* y *Rhopalurus laticauda*; para lo cual se ha utilizado el ratón negro homocigoto C57BL/6, el albino homocigoto BALBc y el albino no homocigoto NMRI (Marcano y Mundaray, 2000; Marín y Rodríguez, 2000; Boadas y Marcano, 2004; Turkali, 2004; De Sousa, 2006; Cornejo, 2008; Cova, 2008; Sánquiz y González, 2008; Da Cámara y col., 2008; Hurtado y col., 2008; De Sousa y col., 2009; De Sousa-Insana y Pino, 2009; Chadee, 2010); incorporando para alguno de los índices letales precedentes, los parámetros de producción de veneno (Chinchilla y Franco, 2003; De Sousa, 2006; Cornejo, 2008; De Sousa-Insana y Pino, 2009; Chadee, 2010) y sus perfiles cromatográficos (Valecillos, 2001; Jiménez y Paulo, 2001; De Sousa, 2006). Posteriormente, se anexaron los estudios histopatológicos a los ensayos de letalidad y curso temporal de toxicidad aguda experimental,



correlacionando, en lo posible, las alteraciones histológicas con los efectos de los venenos (Albornoz y col., 2009; Salomón, 2009).

Recientemente, De Sousa-Insana y Pino (2009) y Chadee (2010) demostraron resultados toxinológicos de diferenciación de toxicidad intersexual, obtenidos para el veneno de una población de *Tityus nororientalis* capturados en Catuaro (localidad tipo de la especie). Los autores evidenciaron, entre hembras y machos, diferencias en los parámetros toxinológicos de producción de veneno, entre las  $DL_{50}$  y en la fase tardía del curso temporal de toxicidad. Bajo las condiciones experimentales establecidas, el veneno de las hembras fue significativamente más potente [ $DL_{50} = 9,46$  (8,91-9,46)  $mg.kg^{-1}$  de ratón], en términos de su índice letal, que el de los machos [ $DL_{50} = 13,36$  (12,58-13,36)  $mg.kg^{-1}$  de ratón]. Las manifestaciones colinérgicas predominaron en el cuadro neurotóxico agudo; aunque demostraron diferencias intersexuales en el curso tardío; en este caso, algunos signos de toxicidad moderadamente grave se manifestaron de forma más temprana con el veneno de las hembras. Basados en estos resultados, los autores sugirieron la posibilidad de diferencias en la expresión proteómica del veneno de hembras y machos de *Tityus nororientalis* provenientes de una misma localidad o de localidades distantes.

Con este proyecto, se comprobó la variabilidad de toxicidad diferencial entre el veneno de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis* provenientes de otra localidad (Las Melenas, municipio Mariño, estado Sucre) del ámbito de distribución geográfica de la especie. Para tal fin, se determinó en ratones hembra de la cepa C57BL/6, por vía intraperitoneal y para 60 minutos de experimentación, las  $DL_{50}$  del veneno de hembras y machos de este taxón por el método secuencial de Dixon y Mood (1948), modificado por Sevcik (1987), y se compararon entre ambos venenos los parámetros de producción de veneno (expresados en miligramos de proteínas y volumen), las manifestaciones clínicas y el curso temporal de aparición de los signos

inducidos como efecto tóxico del envenenamiento agudo experimental en esta cepa de ratón.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 General**

Evaluar la variabilidad geográfica e intersexual de toxicidad del veneno de una población de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) capturada en la localidad de Las Melenas, municipio Mariño, estado Sucre, en ratones C57BL/6.

### **1.2.2 Específicos**

1. Obtener el veneno de ejemplares, machos y hembras, de *Tityus nororientalis* por estimulación eléctrica.
2. Establecer el volumen de veneno eyectado por machos y hembras.
3. Cuantificar la cantidad de proteínas contenidas en el veneno de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis*.
4. Determinar, para una hora de observación y en ratones hembra C57BL/6, la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) del veneno de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis*.
5. Examinar los signos clínicos y el curso temporal de aparición de las manifestaciones clínicas inducidas como efecto de toxicidad aguda

experimental del veneno de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis*.

6. Comparar entre los venenos de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis* y entre las localidades de su ámbito de distribución geográfica, los parámetros de producción de veneno, índices letales y curso temporal de toxicidad aguda.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

El veneno de los arácnidos venezolanos, incluyendo el de los escorpiones genera cuadros de morbi-mortalidad que ameritan interés médico y de investigación en nuestro país (Borges, 1996; De Sousa y col., 2000; Borges y col., 2002; De Sousa y col., 2005; Borges y De Sousa, 2006; De Sousa y col., 2007b; Kiriakos y col., 2008). En Venezuela, la escorpiofauna cuenta con una amplia distribución geográfica (González-Sponga, 1996a; Manzanilla y col., 2002; Manzanilla y De Sousa, 2003; Rojas-Runjaic y De Sousa, 2007), coincidiendo las áreas de riesgo potencial para los envenenamientos escorpiónicos con los de dispersión del género *Tityus* (Borges, 1996; De Sousa y col., 2000; Borges y De Sousa, 2006). En tal sentido, la población venezolana que se encuentra ubicada en las regiones de los sistemas montañosos del país y sus zonas de piedemonte, fundamentalmente localizadas en la franja nortecostera, constituyen las áreas endémicas para el accidente causado por varias especies como *Tityus zulianus* (piedemonte andino del Lago de Maracaibo, región occidental), *Tityus discrepans* (región centro norte costera) y *Tityus nororientalis* (región nororiental) (Borges, 1996; De Sousa y col., 2000; Borges y De Sousa, 2006, 2009; De Sousa y Borges, 2009). En este sentido, comprobar los hallazgos de De Sousa-Insana y Pino (2009) y de Chadee (2010) sobre la variabilidad de toxicidad

diferencial del veneno obtenido de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en la cepa de ratón C57BL/6; complementaría los conocimientos relacionados con la elaboración del mapa de letalidad de las especies de *Tityus* propuesto por Borges (1996) y, más recientemente, para una demarcación del país en “Provincias Toxinológicas” planteada por Borges y De Sousa (2006, 2009).

## CAPITULO II: MARCO TEORICO

### 2.1 Taxonomía y Epidemiología

El Orden Scorpiones, basado en análisis filogenéticos propuestos por Prendini y Wheeler (2005), está organizado en 18 familias agrupando más de 1500 especies. La familia Buthidae, con 80 géneros, posee la más amplia distribución geográfica en el mundo y contiene los taxa de mayor importancia médica (Borges, 1996; De Sousa y col., 2000; Borges y De Sousa, 2006).

En Venezuela, de las 18 familias, cinco están presentes (Buthidae, Chactidae, Euscorpiidae, Hemiscorpidae y Scorpionidae) agrupando 17 géneros y 184 especies descritas hasta el año 2006 (Rojas-Runjaic y De Sousa, 2007). El género *Tityus*, comprobadamente de trascendencia médica en el país (González-Sponga, 1996a; Mota y col., 1994; Porras y col., 1994; De Sousa y col., 1995; Borges, 1996; De Sousa y col., 1996, 1997, 1999, 2000; Borges y col., 2002; De Sousa y col., 2005; Salinas y Salinas, 2005; Borges y De Sousa, 2006; Mejias y col., 2007; De Sousa y col., 2008a, 2008b; Borges y De Sousa, 2009; De Sousa y Borges, 2009) es el más diverso con 52 especies (Rojas-Runjaic y De Sousa, 2007); representando prácticamente un tercio del total de todos los *Tityus* (160) descritos desde Costa Rica hasta el norte de Argentina y algunas islas del Caribe (Fet y Lowe, 2000; Borges y De Sousa, 2006).

De Sousa y colaboradores en el año 2000, plantearon la existencia de cuatro grandes áreas (macroregiones) endémicas de escorpionismo debidas al género *Tityus*: (a) la andina (estados Táchira, Mérida, Trujillo y zona sur del lago de Maracaibo), (b) centro-occidental (estados Lara y Falcón), (c) la centro-norte-costera (norte de los

estados Carabobo y Aragua, estados Miranda, Vargas y Distrito Capital) y, finalmente, la macroregión nororiental, conformada por los estados Anzoátegui, Monagas y Sucre; abarcando el macizo Oriental (sistema montañoso de Paria y la serranía del Turimiquire, con sus áreas de piedemonte) (De Sousa y col., 1999; De Sousa y col., 2000). Recientemente, Borges y De Sousa (2006) actualizaron los criterios clínicos, epidemiológicos, toxinológicos y taxonómicos para redefinir las macroregiones de escorpionismo y agregar a las existentes, las macroregiones deltana, zuliana y la guayano-amazónica (Borges y De Sousa, 2006).

En gran parte de la macroregión nororiental habita *Tityus nororientalis* (González-Sponga, 1996a; Díaz y col., 2005); taxón posiblemente incriminado en la mayoría de los envenenamientos ocurridos en el estado Sucre [y parte de los sucedidos en Anzoátegui (área noreste) y Monagas (centro-norte)] (De Sousa, en preparación). Tiene su localidad tipo en Catuaro (municipio Ribero) y con distribución en el embalse El Clavellino (municipio Ribero), Mariguitar (municipio Bolívar), Pericantar, San Antonio del Golfo (municipio Mejía) y hacienda La Rinconada, Cumanacoa (municipio Montes). Sin embargo, investigaciones en curso demuestran, al presente, que es la especie con el mayor rango de distribución territorial en el nororiente venezolano. Los resultados actuales indican un incremento de su distribución dentro del estado Sucre y hasta los estados Anzoátegui y Monagas (abarcando áreas donde antes no se había reportado su presencia). Más recientemente, la especie se localizó en el caserío Las Melenas (municipio Mariño), en Macuro (municipio Valdez), Península de Paria, estado Sucre y en Capure (municipio Pedernales), estado Delta Amacuro (De Sousa, en preparación).

## 2.2 Características del veneno

El veneno de algunas especies contiene toxinas que producen perturbación severa de los procesos de excitación y conducción del impulso nervioso, alteran procesos que inducen la liberación desorganizada de neurotransmisores fundamentalmente autonómicos (Borges y De Sousa, 2009). Dichos componentes tóxicos, presentes en los venenos de algunos bñtidos, son proteínas de baja masa molecular, entre 6000 y 9000 Da, esenciales en el efecto tóxico, y causantes de las alteraciones fisiológicas observadas tanto en el modelo experimental como en el humano (Borges y col., 2004a, b; Borges y col., 2006a, b; Borges y Rojas-Runjaic, 2007). Sus componentes más letales son las  $\alpha$ - y  $\beta$ -toxinas, cuyos blancos moleculares son los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje-dependiente en las membranas excitables, modificando los mecanismos de permeabilidad iónica fundamentales para la homeostasis celular de varios órganos y sistemas (Becerril y col., 1995; Becerril y col., 1997; Borges y col., 1999; Tsushima y col., 1999; Barona y col., 2006; Borges y De Sousa, 2006; Borges y col., 2006a; Leipold y col., 2006; Borges y col., 2008). Sus efectos farmacológicos posteriores se deben, al menos en parte, a la descarga de catecolaminas y acetilcolina como resultado de la despolarización de terminales pre- y post-ganglionares del sistema nervioso autonómico, produciendo los signos y síntomas clásicos observados en el escorpionismo (humano, veterinario y experimental) (Borges y col., 1990; Saldarriaga y Otero, 2000; Mazzei de Dávila y col., 2002; Borges y col., 2004a; Borges y De Sousa, 2006; De Sousa y col., 2007a).

## 2.3 Manifestaciones clínicas

El envenenamiento escorpiónico es un complejo sindromático principalmente asociado a disfunción en los sistemas cardiorrespiratorio, nervioso e inflamatorio (De Sousa y col., 1995; Sofer y col., 1996; Mazzei de Dávila y col., 1997; Otero y col.,

1998; Voronon y col., 1999; Mazzei de Dávila y col., 2002; Otero y col., 2004; Borges y De Sousa, 2006; De Sousa y col., 2007a). El envenenamiento humano por algunas especies de *Tityus* representa una emergencia pediátrica en Brasil (Lourenço y Cuellar, 1995; Biondi-Queiroz y col., 1996; Lourenço y col., 1996), Colombia (Otero y col., 1998; Saldarriaga y Otero, 2000; Gómez y col., 2002; Otero y col., 2004; Gómez y Otero, 2007), Panamá (Coronado y col., 2008) y Venezuela (Borges, 1996; De Sousa y col., 2000; Borges y De Sousa, 2006; De Sousa y col., 2007a; De Sousa y Borges, 2009). Las manifestaciones clínicas tóxicas del escorpionismo dependen de la especie y tamaño del animal, de la cantidad de veneno inyectado, del peso corporal del individuo afectado y de su susceptibilidad, siendo más grave la toxicidad en los niños, en especial en los menores de ocho años, y en los ancianos (Borges y De Sousa, 2006; De Los Ríos, 2006).

Las manifestaciones clínicas pueden agruparse en aquellas de tipo colinérgico (vómitos, dolor abdominal, sialorrea, náuseas, diaforesis, bradicardia sinusal, hipotensión arterial, bradipnea, broncoespasmo, diarrea, miosis, calambres, fasciculaciones musculares) y las de tipo adrenérgico (palidez cutánea, frialdad de extremidades, piloerección, taquicardia sinusal, hipertensión arterial, taquipnea, priapismo, midriasis). Debe destacarse que, en los pacientes envenenados, puede predominar la clínica colinérgica o la adrenérgica o presentarse una combinación de ambas. Las complicaciones más importantes son las alteraciones cardíacas, la pancreatitis y el edema agudo de pulmón. En los pacientes graves, es posible observar agitación psicomotriz, convulsiones, cambios electrocardiográficos, insuficiencia cardíaca, insuficiencia respiratoria o edema pulmonar agudo y shock, así como coagulación intravascular diseminada y anemia hemolítica (Illanes, 1981; Dehesa-Dávila, 1989; Biondi-Queiroz y col., 1996; Sofer y col., 1996; Voronon y col., 1999; Spirandeli-Cruz, 1999; Otero y col., 2004; Borges y De Sousa, 2006; De Sousa y col., 2007a; Gómez y Otero, 2007).



## **CAPITULO III: MARCO METODOLOGICO**

### **3.1 Materiales y Métodos**

#### **3.1.1 Fuente del veneno de escorpión**

Para la ejecución de la presente investigación se capturó la especie *Tityus nororientalis* en el caserío rural de Las Melenas (10°40'57''N, 62°37'17''W; 785 m de altitud; GPS Garmin®) municipio Mariño, estado Sucre, localidad de su ámbito de distribución geográfica. Durante el día fueron localizados bajo troncos, en el interior de la corteza parcialmente desprendida de los árboles, en el interior de troncos en proceso de descomposición y en la base de plantas de cafeto (*Coffea arabica*) o de cacao (*Theobroma cacao*). Durante la noche se utilizaron lámparas portátiles de luz ultravioleta. Posteriormente, se trasladaron al Laboratorio de Toxinología, Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, donde se mantuvieron vivos para la extracción de su veneno.

#### **3.1.2 Fuente de los animales de experimentación**

Se utilizaron 30 ratones hembra, cepa C57BL/6 (según método estandarizado por De Sousa y col., 2009), adquiridas en el Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y disponibles en el área del Laboratorio de Toxinología. Los animales permanecieron con ciclos de iluminación natural, a temperatura ambiente y alimentación e hidratación *ad libitum*.

Se siguieron los lineamientos de investigación en Toxinología, utilizando animales de experimentación, según el Código Ético de la *International Society on Toxinology (IST)*, refrendado por sus miembros en ocasión del 6<sup>th</sup> *European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins* (Basilea, Suiza, Agosto de 1984) donde se estableció: (a) Disminuir al mínimo el período de sufrimiento de los animales de experimentación y no someterlos a procedimientos dolorosos extremos, (b) utilizar el menor número posible de animales, (c) sólo se requerirán para investigar los mecanismos de acción de las toxinas de origen natural, (d) el uso de la DL<sub>50</sub> sólo procederá, con fines científicos, para la estandarización de los venenos y de los antivenenos de origen natural, (e) para establecer este índice letal se debe utilizar alrededor de 12 animales, acompañando los resultados del tiempo de supervivencia y los exámenes patológicos de los ejemplares sometidos a este procedimiento. En tal sentido, el método de Dixon y Mood (1948) es uno de los más apropiados. Por lo anterior, en esta investigación se siguieron los lineamientos éticos relacionados con experimentación animal según De Sousa y colaboradores (2009).

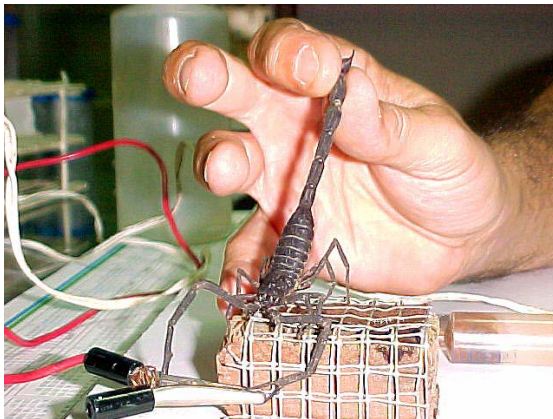
### **3.1.3 Extracción y purificación parcial del veneno**

Los escorpiones fueron ordeñados por estimulación eléctrica (figura 1), utilizando un neuroestimulador (Phipps-Bird<sup>®</sup>, modelo 611) según técnica desarrollada en el Laboratorio de Alacranología, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Bolívar (Quiroga y col., 1982; Parrilla-Álvarez, 1999). El veneno eyectado de ejemplares hembras y machos, fue recogido de forma separada en tubos capilares de 100 µL de capacidad y luego transferidos a tubos Eppendorf de 1,5 mL. El veneno fue suspendido en 1 ml de agua bidestilada y agitado en vortex (Super-Mixer<sup>®</sup>). Consecutivamente, se centrifugó a 14 000 g (Labnet para tubos Eppendorf<sup>®</sup>, modelo Z180M) por 20 minutos para separar los restos celulares de la fase soluble que contiene las proteínas con actividad farmacológica. Se realizaron diluciones del

veneno, cuando fue necesario 1/5, 1/10 o 1/20, en agua bidestilada como paso previo a la cuantificación de las proteínas contenidas en el veneno (De Sousa y col., 2009).

### 3.1.4 Determinación de la concentración de proteínas

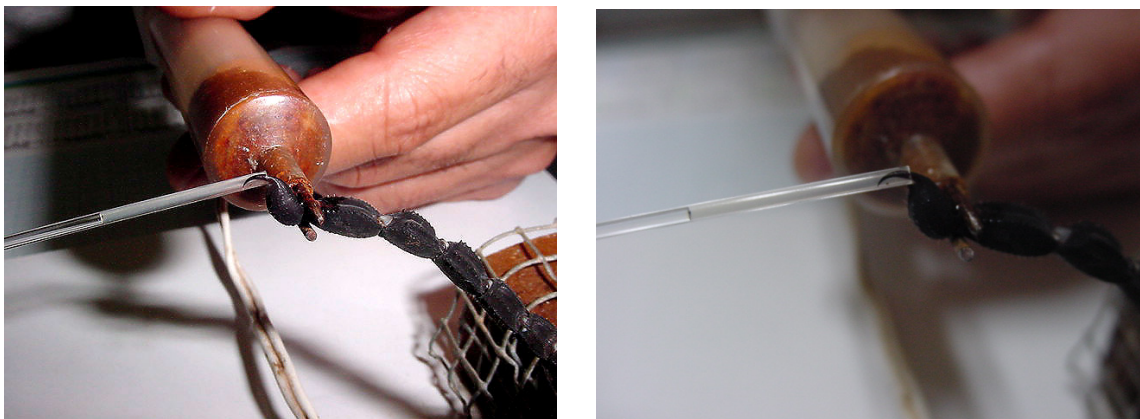
Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble, obtenida en el proceso de centrifugación, mediante lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Jenway®, modelo 6405 UV/vis, a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de absorbancia (a esta longitud) representó una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (Possani y col, 1977; Parrilla, 1999).



A



b



C

d

Figura 1. Extracción del veneno de un ejemplar de *Tityus quirogae* (Scorpiones, Buthidae) por estimulación eléctrica del telson.

(a) y (b). Ejemplar macho de *Tityus quirogae* sobre la rejilla metálica del equipo de extracción de veneno. (c) y (d). Electrodo estimulador ubicado en la región intersegmental, entre el quinto segmento del metasoma y el telson. Posterior a 10 trenes de pulso, de aproximadamente de 5 segundos cada uno, se obtiene el veneno eyectado desde el acúleo en tubos capilares (Pyrex, Corning®) (fotografías tomadas en De Sousa, 2006).

Se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble, obtenida en el proceso de centrifugación, mediante lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Jenway®, modelo 6405 UV/vis, a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de (ésta concentración fue verificada con una curva de calibración). Alícuotas de 1 ml del veneno, de ejemplares hembras y machos, se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso para evaluar su actividad biológica en el modelo

múrido C57BL/6, el resto fue liofilizado (liofilizador Labconco®) y almacenado a -20°C (De Sousa, 2006; De Sousa y col., 2009).

### 3.1.5 Evaluación de la DL<sub>50</sub> y de los signos de toxicidad agudo experimental

Las DL<sub>50</sub> del veneno, de ejemplares machos y hembras, de *Tityus nororientalis*, para una hora de experimentación, se determinó por el método secuencial de Dixon y Mood (1948), modificado por Sevcik (1987). Para detalles del método consultar De Sousa y col. (2009).

El veneno fue inyectado, por vía intraperitoneal (vip), con una microjeringa Hamilton® de 50 µL de capacidad, en ratones hembra C57BL/6. Las dosis administradas se calcularon según el peso (balanza digital, Denver Instrument®, modelo XS-3009 precisión 0,01 g) de cada animal experimental. Para la administración del veneno se procedió al siguiente esquema de trabajo para cada veneno: en el primer ratón C57BL/6, por vip, se utilizó una dosis inicial de: Anti-log  $X_1 = 1$  (10 µg.g<sup>-1</sup> de ratón); si este primer animal respondió con la muerte, el segundo ratón recibiría una dosis  $X_2$  calculada como Anti-log( $X_1$ ) -  $d$ , donde  $d$  es un factor constante también establecido por experiencia previa ( $d = 0,05$ ); en cambio, si el primer animal se mantiene vivo, entonces, el segundo recibiría una dosis  $X_2$  calculada como Anti-log( $X_1$ ) +  $d$ . El procedimiento continuó y la dosis del siguiente animal sería:  $X_n = \text{Anti-log}(X_{n-1}) - d$  o  $X_n = \text{Anti-log}(X_{n-1}) + d$  si el animal no murió o se mantuvo vivo durante los 60 minutos de duración del experimento. La corrida válida se consideró completa al obtener cuatro ciclos muerte-no muerte o no muerte-muerte [† 0 † 0 † 0 † 0 † ⊗, ó 0 † 0 † 0 † 0 † 0 ⊗; donde † indica muerte, 0 supervivencia y ⊗ la dosis que debería ser administrada al siguiente animal (punto final)]. Para establecer las DL<sub>50</sub> se calcularon las medianas de las dosis a partir del primer punto

de inflexión que incluyó además el valor de la dosis que recibiría el siguiente animal [punto final: ⊗] (De Sousa y col., 2009).

Los signos clínicos expresados como efecto de toxicidad aguda experimental inducida por la inyección intraperitoneal del veneno de *Tityus nororientalis*, fueron observados meticulosamente durante los 60 minutos de experimentación y tabulados cronológicamente. Los ratones que sobrevivieron, al finalizar el tiempo establecido de observación, fueron sacrificados por dislocación cervical. Se utilizó un animal testigo al cual se administró solución fisiológica en volumen similar al del grupo experimental (De Sousa, 2006; De Sousa y col., 2009).

### **3.2 Análisis estadísticos**

El programa Excel V-5.1 (Microsoft Corporation<sup>®</sup>, 2002) se utilizó para automatizar los cálculos y para elaborar las gráficas de las  $DL_{50}$ . Todos los resultados experimentales se procesaron por métodos estadísticos no paramétricos o de libre distribución: (a) se calcularon las medianas de los datos válidos a partir del punto de inflexión, según Hodges y Lehmann y sus límites de confianza (entre paréntesis) al 95% de certeza para calcular las  $DL_{50}$  y para el tiempo de aparición de los signos de toxicidad aguda experimental y (b) las diferencias entre medianas fueron probadas por el análisis de variancia de Kruskal-Wallis, con un nivel de significación  $p < 0,05$  (De Sousa y col., 2009). Para el procesamiento de los datos por métodos estadísticos no paramétricos se utilizó el programa V-8.2 desarrollado por el Dr. Carlos Sevcik, Laboratorio de Neurofarmacología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC).

Para comparar los parámetros de producción de veneno y las frecuencias de algunos signos de toxicidad, entre los venenos de hembras y machos y entre las localidades, se empleó la prueba de diferencias de proporciones con muestreo

independiente (valor de  $Z$ ; método paramétrico) con un nivel de significación  $p < 0,05$ ; para ello se usó el programa PRIMER que acompaña el libro Primer of Biostatistics, quinta edición, Mc Graw-Hill (Glantz, 2002). Se evaluó el Índice de Variabilidad de las  $DL_{50}$  mediante la siguiente fórmula: Índice de Variabilidad =  $(\text{Límite superior} - \text{Límite inferior}) / \text{Mediana de la } DL_{50} \times 100$ .

## CAPITULO IV. ANALISIS Y PRESENTACION DE RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS

Se realizó una salida de campo para capturar la especie *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en una plantación de cafeto ubicada en las inmediaciones de la población de Las Melenas (municipio Mariño, estado Sucre); la jornada se realizó entre el 04 y 06 de julio de 2008. Se capturó un total de 16 ejemplares (11 hembras y 5 machos).

Después de un período de aclimatación de quince días a las condiciones del laboratorio, se procedió al ordeño eléctrico de su veneno (catalogando el veneno extraído, en el Banco de Venenos del Laboratorio de Toxinología, como Lote 4; ♀♀ con una concentración de 9,12 mg/mL y ♂♂ con 10,42 mg/mL).

Las 11 hembras, por estimulación eléctrica, produjeron 13,03 mg de veneno. Cada ejemplar, en promedio para peso y volumen, originó 1,18 mg en 8,16  $\mu$ L. Los cinco machos, produjeron 13,88 mg; en promedio, 2,77 mg en 11,58  $\mu$ L. Al respecto, las hembras producen menor cantidad de proteínas y volumen que los machos ( $z = 2,42$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 2).

En la tablas 1 y 2 se presentan los datos necesarios para el cálculo de las  $DL_{50}$  del veneno de hembras y machos de *Tityus nororientalis*, en ratones hembra, C57BL/6, observados durante 60 minutos.



El total de ratones C57BL/6 para evaluar el veneno de hembras de *Tityus nororientalis* fue  $n = 20$  [corrida + siguiente animal (punto final)] (tabla 1) y para el de machos  $n = 17$  [corrida + siguiente animal (punto final)] (tabla 2). El punto de inflexión (fenómeno muerte no-muerte o no-muerte muerte) se ubicó en  $R_4$  para el veneno de las hembras (tabla 1) y en  $R_3$  para el veneno de los machos (tabla 2).

La corrida válida para calcular la  $DL_{50}$ , del veneno de las hembras de *Tityus nororientalis*, fue desde  $R_4$  hasta  $R_{19} + R_{20}$  (punto final) [ $n = 17$ ]; y, para evaluar los signos de toxicidad aguda experimental<sup>13</sup> hasta  $R_{19}$  [ $n = 16$ ] (tabla 1). Para la  $DL_{50}$  de los machos, la corrida válida fue desde  $R_3$  hasta  $R_{16} + R_{17}$  (punto final) [ $n = 15$ ]; y para los signos de toxicidad aguda desde  $R_3$  hasta  $R_{16}$  [ $n = 14$ ]. La cantidad de veneno de escorpiones hembra, utilizada en la experiencia, fue de  $3350,66 \mu\text{g}$  (3,35 mg) (tabla 1) y de los machos  $3572,99 \mu\text{g}$  (3,57 mg) (tabla 2). Para cada veneno se utilizó un ratón control, el cual no desarrolló ninguna manifestación clínica de toxicidad posterior a la inyección de  $20 \mu\text{L}$  de solución salina al 0,90% (m/v).

La frecuencia de muerte causada por la administración del veneno, en la corrida válida, de machos y hembras de *Tityus nororientalis* se presenta en las tablas 3 y 4. Para el de las hembras (tabla 3), la mayor regularidad de muerte ( $n = 3$ ; 42,8%) ocurrió con la dosis C ( $8,91 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Con la B y D ( $7,94$  y  $10,00 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente) la frecuencia fue baja ( $n = 2$ ; 28,6%) y con la A ( $7,08 \mu\text{g g}^{-1}$ ) no ocurrió mortalidad. Con el veneno de los machos, la mayor mortalidad ( $n = 3$ ; 37,5%) ocurrió con la dosis C ( $11,22 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y D ( $12,59 \mu\text{g g}^{-1}$ ) seguida de la B ( $10,00 \mu\text{g g}^{-1}$ ) ( $n = 2$ ; 25,0%). Cuando se administró la A ( $7,94 \mu\text{g g}^{-1}$ ) no ocurrió *exitus letalis*.

Las  $DL_{50}$ , para 60 minutos de observación, del veneno de hembras y machos de *Tityus nororientalis*, administrado por vía intraperitoneal, en ratones C57BL/6, se presentan en las figuras 3 y 4. Las  $DL_{50}$  se calcularon por el método no paramétrico

de Hodges y Lehmann y el resultado se presenta como la mediana y sus límites al 95% de confianza (entre paréntesis). Para el veneno de las hembras, la  $DL_{50}$  fue 8,43 (8,00 – 8,54)  $\mu\text{g g}^{-1}$  de ratón y para los machos de 10,61 (10,07 – 11,30)  $\mu\text{g g}^{-1}$  de ratón; el índice de variabilidad fue de 6,4% para el veneno de las hembras y 11,6% para el de los machos. En la figura 5 se comparan las  $DL_{50}$  calculadas para los venenos de hembras y machos de *Tityus nororientalis* capturados en Las Melenas, municipio Mariño, estado Sucre. Los resultados demostraron que las hembras de esta especie y, de esta localidad, poseen un veneno significativamente más potente ( $p = 0,000001$ ) que el de los machos.

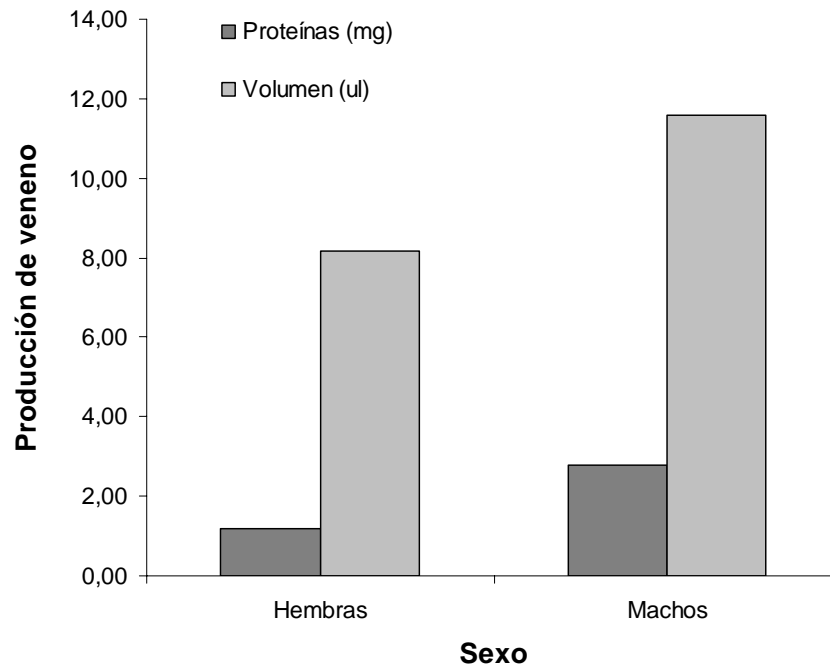


Figura 2. Comparación de parámetros de producción de veneno entre hembras y machos de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae).

Tabla 1. Datos para el cálculo de la  $DL_{50}$  del veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* en ratones C57BL/6, administrado por vía intraperitoneal, para una hora de observación.

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (Anti-Log)	DOSIS ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	DOSIS TOTAL ( $\mu\text{g}$ )	VOLUMEN ( $\mu\text{l}$ )	MUERTE (minutos)
CORRIDA NO VÁLIDA						
1	20,11	1,00	10,00	201,10	22,1	†: 35
2	19,13	0,95	8,91	170,45	18,7	†: 43
3	20,37	0,90	7,94	161,73	17,7	†: 40
			Sub-total	533,28		
CORRIDA VÁLIDA						
4	18,95	0,85	7,08	134,02	14,7	0
5	20,04	0,90	7,94	159,12	17,4	0
6	24,24	0,95	8,91	215,98	23,7	0
7	23,10	1,00	10,00	231,00	25,3	†: 45
8	21,83	0,95	8,91	194,50	21,3	0
9	19,96	1,00	10,00	199,60	23,4	†: 35
10	23,70	0,95	8,91	211,17	24,8	†: 42
11	19,35	0,90	7,94	153,64	18,0	†: 43
12	20,60	0,85	7,08	145,84	17,1	0
13	20,94	0,90	7,94	166,26	19,5	0
14	18,75	0,95	8,91	167,06	19,6	†: 45
15	20,22	0,90	7,94	160,55	18,8	†: 52
16	20,43	0,85	7,08	144,64	16,9	0
17	22,50	0,90	7,94	178,65	20,9	0
18	21,49	0,95	8,91	191,47	22,5	†: 41
19	20,64	0,90	7,94	163,88	19,2	0
			Sub-total	2817,38		
			Total	3350,66		

SIGUIENTE ANIMAL

20

0,95

8,91

⊗

---

Ratones válidos:  $R_5 \rightarrow R_{19}$

†: Ratón con *exitus*

⊗: Punto final

Tabla 2. Datos para el cálculo de la  $DL_{50}$  del veneno de ejemplares macho de *Tityus nororientalis* en ratones C57BL/6, administrado por vía intraperitoneal, para una hora de observación.

RATÓN (n)	PESO (g)	DOSIS (Anti-Log)	DOSIS ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	DOSIS TOTAL ( $\mu\text{g}$ )	VOLUMEN ( $\mu\text{l}$ )	MUERTE (minutos)
CORRIDA NO VÁLIDA						
1	21,12	1,00	10,00	211,20	20,3	0
2	20,06	1,05	11,22	225,07	21,6	0
			Sub-total	436,27		
CORRIDA VÁLIDA						
3	17,67	1,10	12,59	222,47	21,3	†: 49
4	19,80	1,05	11,22	222,17	21,3	0
5	19,32	1,10	12,59	243,24	23,3	†: 40
6	19,96	1,05	11,22	223,95	21,5	†: 43
7	20,54	1,00	10,00	205,40	19,7	0
8	23,09	1,05	11,22	259,07	24,9	0
9	23,21	1,10	12,59	292,21	28,0	†: 35
10	19,43	1,05	11,22	218,00	20,9	†: 42
11	21,78	1,00	10,00	217,80	20,9	†: 48
12	19,22	0,95	8,91	171,25	16,4	0
13	23,14	1,00	10,00	231,40	22,2	†: 32
14	20,01	0,95	8,91	179,09	17,2	0
15	22,93	1,00	10,00	229,30	22,0	0
16	19,73	1,05	11,22	221,37	21,2	†: 40
			Sub-total	3136,72		
			Total	3572,99		
SIGUIENTE ANIMAL						
17		1,10	12,59			⊗

Ratones válidos:  $R_3 \rightarrow R_{16}$

†: Ratón con *exitus*

⊗: Punto final

Tabla 3. Frecuencia de muerte y secuencia de dosis administradas, por vía intraperitoneal, del veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* en el modelo mrido C57BL/6.

RATON	Anti-log Dosis ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de ratón)			
	0,85 (7,08 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) DOSIS A	0,90 (7,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) DOSIS B	0,95 (8,91 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) DOSIS C	1,00 (10,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) DOSIS D
CORRIDA NO VÁLIDA				
1				†: 35
2			†: 43	
3		†: 35		
CORRIDA VÁLIDA				
4	0			
5		0		
6			0	
7				†: 45
8			0	
9				†: 35
10			†: 42	
11		†: 43		
12	0			
13		0		
14			†: 45	
15		†: 52		
16	0			
17		0		
18			†: 41	
19		0		
SIGUIENTE ANIMAL				
20			⊗	

FRECUENCIA				
DE MUERTE [†]	0	2	3	2
CORRIDA	(0,0%)	(28,6%)	(42,8%)	(28,6%)
VÁLIDA				
	n = 7 (100%)			
†:	indica	0:	indica	⊗: indica siguiente animal (punto final del experimento)



Tabla 4. Frecuencia de muerte y secuencia de dosis administradas, por vía intraperitoneal, del veneno de ejemplares macho de *Tityus nororientalis* en el modelo múrdo C57BL/6.

RATON	Anti-log Dosis ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de ratón)			
	0,90 (7,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) DOSIS A	1,00 (10,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) DOSIS B	1,05 (11,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) DOSIS C	1,10 (12,59 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) DOSIS D
CORRIDA NO VÁLIDA				
1		0		
2			0	
CORRIDA VÁLIDA				
3				†: 49
4			0	
5				†: 40
6			†: 43	
7		0		
8			0	
9				†: 35
10			†: 42	
11		†: 48		
12	0			
13		†: 32		
14	0			
15		0		
16			†: 40	
SIGUIENTE ANIMAL				
17		⊗		
FRECUENCIA DE				
MUERTE [†]	0	2	3	3
CORRIDA VÁLIDA	(0,0%)	(25,0%)	(37,5%)	(37,5%)
n = 8 (100%)				
†:	indica	0:	indica	⊗: indica siguiente animal (punto final del experimento)

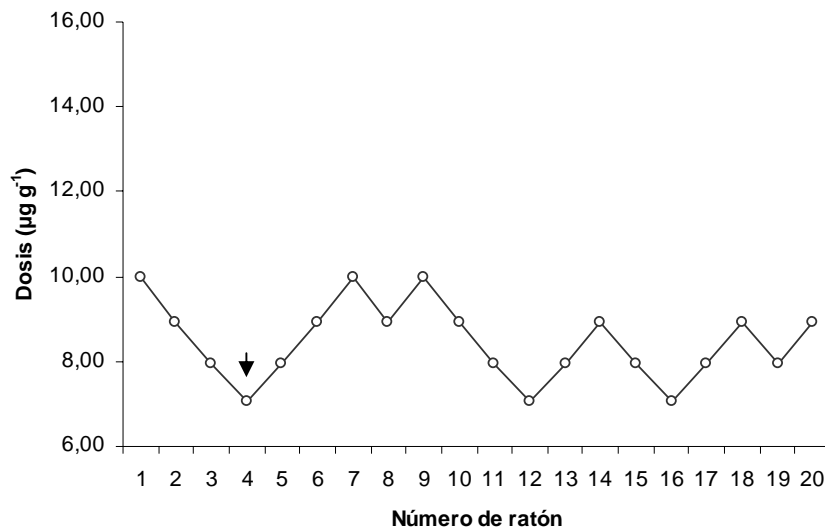


Figura 3. Determinación de la dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) del veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* por vip en ratones C57BL/6. Ratones hembra, cepa C57BL/6, con pesos entre 18,75 y 24,24 g fueron inyectados vip con el veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis*. Los animales fueron observados por 60 minutos.

La flecha indica el punto de inflexión e inicio de los datos válidos para el cálculo de la  $DL_{50}$ . El resultado se presenta como la mediana y sus límites para un 95% de confianza (entre paréntesis):  $DL_{50}$ , vip, 60 minutos = 8,43 (8,00 – 8,54)  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ratón. IV = 6,4%.

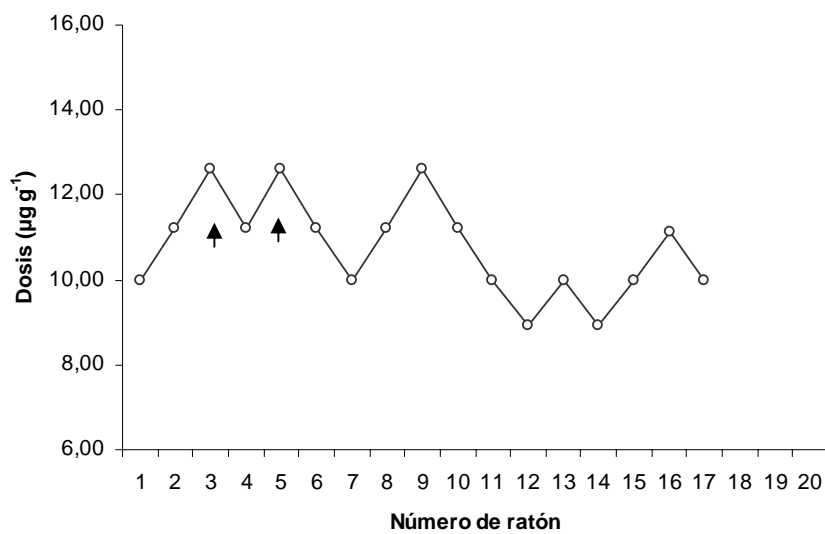


Figura 4. Determinación de la dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) del veneno de ejemplares macho de *Tityus nororientalis* por vip en ratones C57BL/6.  $DL_{50}$ , vip, 60 minutos = 10,61 (10,07 – 11,30)  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de ratón. IV = 11,6%.

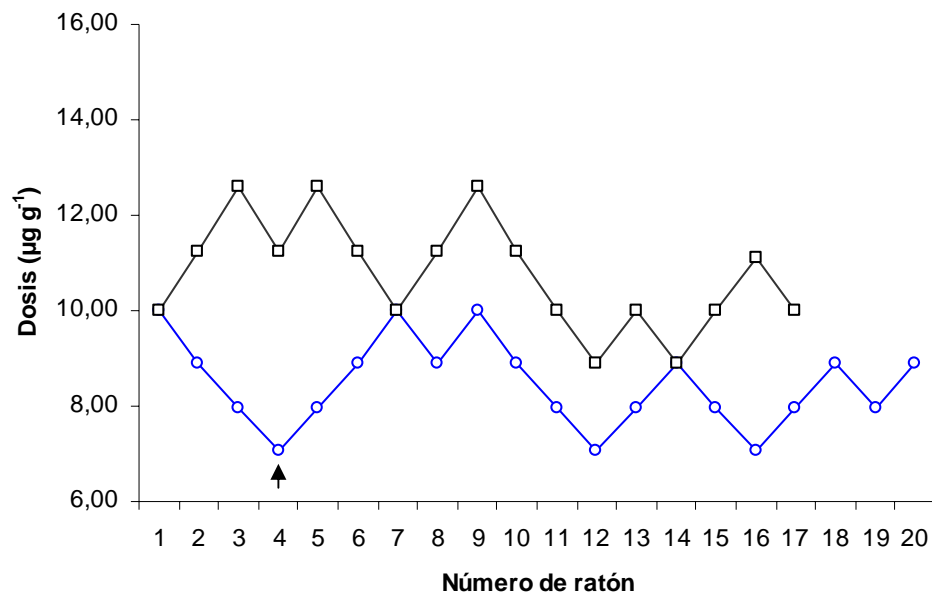


Figura 5. Comparación de las dosis letales cincuenta ( $DL_{50}$ ) del veneno de ejemplares hembras y machos de *Tityus nororientalis* en ratones C57BL/6. Veneno de *Tityus nororientalis*;

$DL_{50}$ , vip, 60 minutos: ♀♀ = 8,43 (8,00 – 8,54)  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ratón (color azul). ♂♂ = 10,61 (10,07 – 11,30)  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ratón (color negro). Kruskal-Wallis = 18,05;  $p = 0,000001$ .

En las tablas 5 y 6 se presentan las frecuencias de los signos clínicos inducidos por efecto de toxicidad aguda experimental del veneno, de ejemplares hembras y machos, de *Tityus nororientalis* en ratones C57BL/6. Con el veneno de las hembras (tabla 5), se observaron 27 signos clínicos de toxicidad. En el 100% de los casos, correspondientes a la corrida válida, hiperactividad inicial, movimientos deglutorios, limpieza de nariz/boca, signo de Straub, taquipnea y sialorrea leve. En 93,8% piloerección y marcha atáxica. Luego sialorrea abundante (87,5%), convulsiones, disnea (respiración abdominal forzada que evolucionó a bradipnea/apnea), secreción ocular, defecación pastosa, contractura de la piel de la región dorsal y distensión abdominal (75,0%). Seguidamente, en el 62,5% exoftalmos, hipotonía del tren posterior y temblores generalizados. Con menor frecuencia parálisis espástica (43,8%); deshidratación (31,3%), defecación líquida (18,8%); micción, relajación de esfínteres, hipoactividad (12,5%) e hipotonía del tren posterior (6,3%). Algunos signos se observaron fundamentalmente en la población de ratones que fallecieron por efecto tóxico del veneno: bradipnea/apnea (7/7 ratones muertos y 5/9 ratones sobrevivientes), defecación pastosa (7/7 muertos y 5/9 vivos), temblores generalizados (7/7 muertos y 3/9 vivos), exoftalmos (7/7 muertos y 3/9 vivos), hipotonía del tren posterior (7/7 muertos y 3/9 vivos) y parálisis espástica (7/7 muertos y 0/9 vivos).

Similarmente, con el veneno de los machos (tabla 6), se observaron 25 signos clínicos de toxicidad; con frecuencias equivalentes a las desarrolladas por toxicidad aguda con el veneno de las hembras. Análogamente, el veneno de los machos, produce algunos signos observados fundamentalmente en la población de ratones que fallecieron: temblores generalizados (8/8 muertos y 2/6 vivos), bradipnea/apnea (8/8 ratones muertos y 3/6 ratones sobrevivientes), exoftalmos (8/8 muertos y 2/6 vivos), parálisis espástica (8/8 muertos y 0/6 vivos) e hipotonía del tren posterior (8/8 muertos y 2/6 vivos).

Tabla 5. Frecuencia de manifestaciones clínicas inducidas por toxicidad aguda del veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* en ratones C57BL/6.

CONDICIÓN	MUERTOS	VIVOS		
	N = 7	N = 9	N	%
<b>RATÓN (N) ⇒</b>				
<b>SIGNO DE TOXICIDAD</b>	R <sub>7</sub> , R <sub>9</sub> , R <sub>10</sub> , R <sub>11</sub> ,	R <sub>4</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>8</sub> , R <sub>12</sub> ,		
Hiperactividad	7/7	9/9	16	100
Movimientos deglutorios	7	9	16	100
Rascado de nariz/boca	7	9	16	100
Signo de Straub	7	9	16	100
Disnea: taquipnea	7	9	16	100
Sialorrea (inicio)	7	9	16	100
Limpieza nariz boca	7	9	16	100
Piloerección	7	8	15	93,8
Marcha atáxica	6	9	15	93,8
Sialorrea abundante	7	7	14	87,5
Convulsiones	7	5	12	75,0
Disnea: RAF	7	5	12	75,0
Defecación pastosa	7	5	12	75,0
Disnea: bradipnea/apnea	7	5	12	75,0
Contractura piel del dorso	6	6	12	75,0
Distensión abdominal	6	6	12	75,0
Secreción ocular	6	6	12	75,0
Exoftalmos	7	3	10	62,5
Hipotonía tren posterior	7	3	10	62,5
Temblores generalizados	7	3	10	62,5
Parálisis espástica	7	0	7	43,8
Deshidratación	1	5	5	31,3
Defecación líquida	1	2	3	18,8
Micción	1	1	2	12,5
Relajación de esfínteres	1	1	2	12,5
Hipoactividad	1	1	2	12,5
Hipotonía tren anterior	0	1	1	6,3

RAF: respiración abdominal forzada

Tabla 6. Frecuencia de manifestaciones clínicas inducidas por toxicidad aguda del veneno de ejemplares macho de *Tityus nororientalis* en ratones C57BL/6.

CONDICIÓN	MUERTOS N = 8	VIVOS N = 6	N	%
<b>RATÓN (N) ⇔</b>				
<b>SIGNO DE TOXICIDAD</b>	R <sub>3</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>9</sub> ,	R <sub>4</sub> , R <sub>7</sub> , R <sub>8</sub> , R <sub>12</sub> ,		
Hiperactividad	8/8	6/6	14	100
Movimientos deglutorios	8	6	14	100
Rascado de nariz/boca	8	6	14	100
Signo de Straub	8	6	14	100
Disnea: taquipnea	8	6	14	100
Sialorrea (inicio)	8	6	14	100
Limpieza nariz boca	8	6	14	100
Piloerección	8	5	13	92,8
Marcha atáxica	7	6	13	92,8
Sialorrea abundante	8	5	13	92,8
Convulsiones	8	4	12	85,7
Disnea: RAF	8	3	11	78,6
Defecación pastosa	8	3	11	78,6
Disnea: bradipnea/apnea	8	3	11	78,6
Contractura piel del dorso	7	4	11	78,6
Distensión abdominal	7	4	11	78,6
Secreción ocular	7	4	11	78,6
Exoftalmos	8	2	10	71,4
Hipotonía tren posterior	8	2	10	71,4
Temblores generalizados	8	2	10	71,4
Parálisis espástica	8	0	8	57,0
Deshidratación	1	3	4	28,6
Defecación líquida	1	3	4	28,6
Micción	1	1	2	14,3
Relajación de esfínteres	1	1	2	14,3
Hipoactividad	1	1	2	14,3
Hipotonía tren anterior	0	1	1	7,1

RAF: respiración abdominal forzada

El tiempo de aparición de los signos inducidos por efecto de toxicidad aguda, del veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis*, fue gradual en los animales de la corrida válida (figura 6). Los signos inmediatos de toxicidad aguda, en los primeros 10 minutos, fueron hiperactividad, seguida de taquipnea, piloerección, inicio de sialorrea, distensión abdominal, limpieza nariz/boca y movimientos deglutorios. Posterior a estos, en el espectro medio de toxicidad moderadamente grave, entre los 10 y 20 minutos, se instaló evacuación pastosa, inicio de secreción ocular, contractura de la piel del dorso, signo de Straub, convulsiones, marcha atáxica y temblores/fasciculaciones. Tardíamente como expresión de toxicidad grave, después de los 20 minutos, sialorrea abundante (23,0 m), hipotonía del tren posterior (24,5 m), temblores generalizados (25,0 m), disnea caracterizada por periodos de bradipnea alternada con apnea (27,5 m) hasta finalmente la sobrevivencia de los animales. En algunos casos otro signo de toxicidad severa fue la relajación de esfínteres.

La sialorrea abundante y la disnea (caracterizada por respiración forzada abdominal evolucionando a bradipnea-apnea), como signos de toxicidad grave, se expresaron prematuramente en el grupo de ratones que murieron (sialorrea = 14,0 m; disnea = 17,0 m) cuando se compararon con los vivos (sialorrea = 23,0 m; disnea = 27,0 m) ( $p = 0,0001$ ) (figura 6). El exoftalmos bilateral (21,0 m) y la parálisis espástica (39,0 m), en el espectro de toxicidad severa, surgen casi exclusivamente en este grupo. La parálisis espástica precede a la muerte (40,0 m) de los animales.

Similarmente, con el veneno de los machos (figura 7), el tiempo de aparición de los signos fue gradual; caracterizados por los tres grupos de signos: (1) los inmediatos (primeros 10 minutos), (2) los del espectro medio de toxicidad moderadamente grave (entre los 10 y 20 minutos) y los de presentación tardía como expresión de toxicidad grave (después de los 20 minutos). Al igual que con el veneno de las hembras, los signos de sialorrea abundante y la disnea (caracterizada por respiración forzada abdominal evolucionando a bradipnea-apnea) se expresaron prematuramente



en el grupo de ratones que murieron (sialorrea = 19,0 m; disnea = 22,5 m) cuando se compararon con los vivos (sialorrea = 28,0 m; disnea = 36,0 m) ( $p = 0,0001$ ) (figura 7). El exoftalmos bilateral (28,0 m) y la parálisis espástica (44,0 m), en el espectro de toxicidad severa, surgen casi exclusivamente en este grupo. La parálisis espástica precede a la muerte (45,0 m) de los animales.

En la figura 8 se comparan los cursos temporales de toxicidad aguda, entre las poblaciones de ratones C57BL/6 fallecidos y sobrevivientes, al utilizar el veneno de machos y hembras de *Tityus nororientalis*. Con ambos venenos la sialorrea abundante y la bradipnea-apnea se expresaron prematuramente en el grupo de ratones que murieron ( $p = 0,0001$ ). Con ambos venenos el exoftalmos bilateral y la parálisis espástica son signos casi exclusivos del grupo de ratones que fallecieron. En todos los casos la parálisis espástica antecedió la muerte de los animales.

Existen diferencias significativas ( $p = 0,04$ ), entre ambos venenos y entre los grupos de supervivientes y fallecidos, cuando se compara sialorrea abundante, exoftalmos bilateral y especialmente bradipnea/apnea, como expresión de toxicidad grave (después de los 20 minutos). Aunque no significativos, la parálisis espástica y la muerte ocurrieron relativamente más temprano en los ratones inyectados con el veneno de los ejemplares hembra de *Tityus nororientalis*.

Los efectos de toxicidad aguda se presentan en las figuras 9, 10 y 11: facies tóxica y piloerección, signos de estimulación muscarínica (sialorrea, secreción ocular y defecación pastosa), signo de Straub, convulsiones e hipotonía muscular. Los signos antes de morir fueron los periodos de bradipnea/apnea con cianosis peribucal. La parálisis espástica se manifestó inmediatamente antes de la muerte de todos los ratones en la que el animal adoptaba una posición parecida al opistótono con hiperextensión del tren posterior. Todos los ratones, antes del *exitus letalis*, presentaron apnea prolongada.

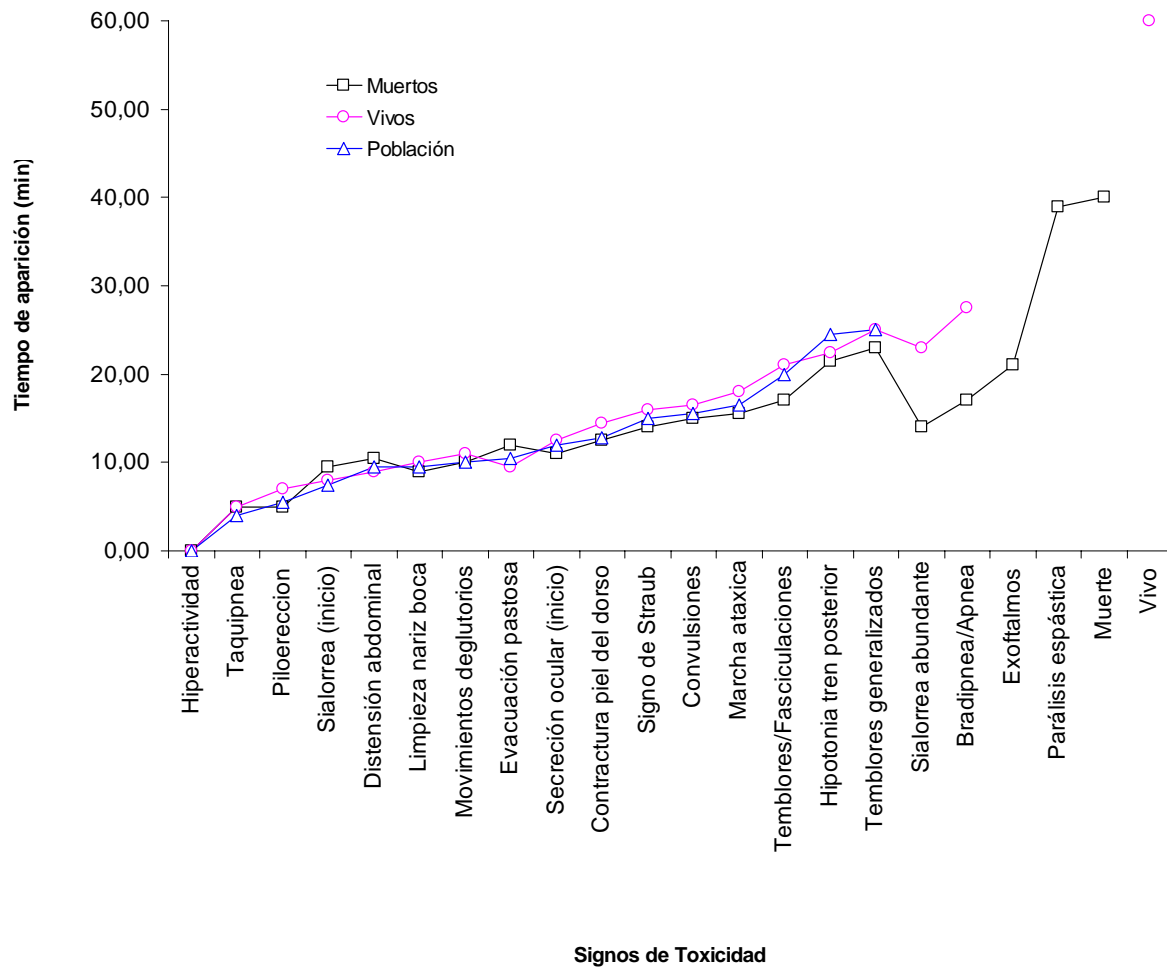


Figura 6. Comparación del curso temporal de toxicidad aguda experimental entre ratones fallecidos y sobrevivientes sometidos al veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis*.

La línea azul representa los valores de la mediana de tiempo de aparición de los signos clínicos sin diferencias significativas entre los ratones vivos y muertos.

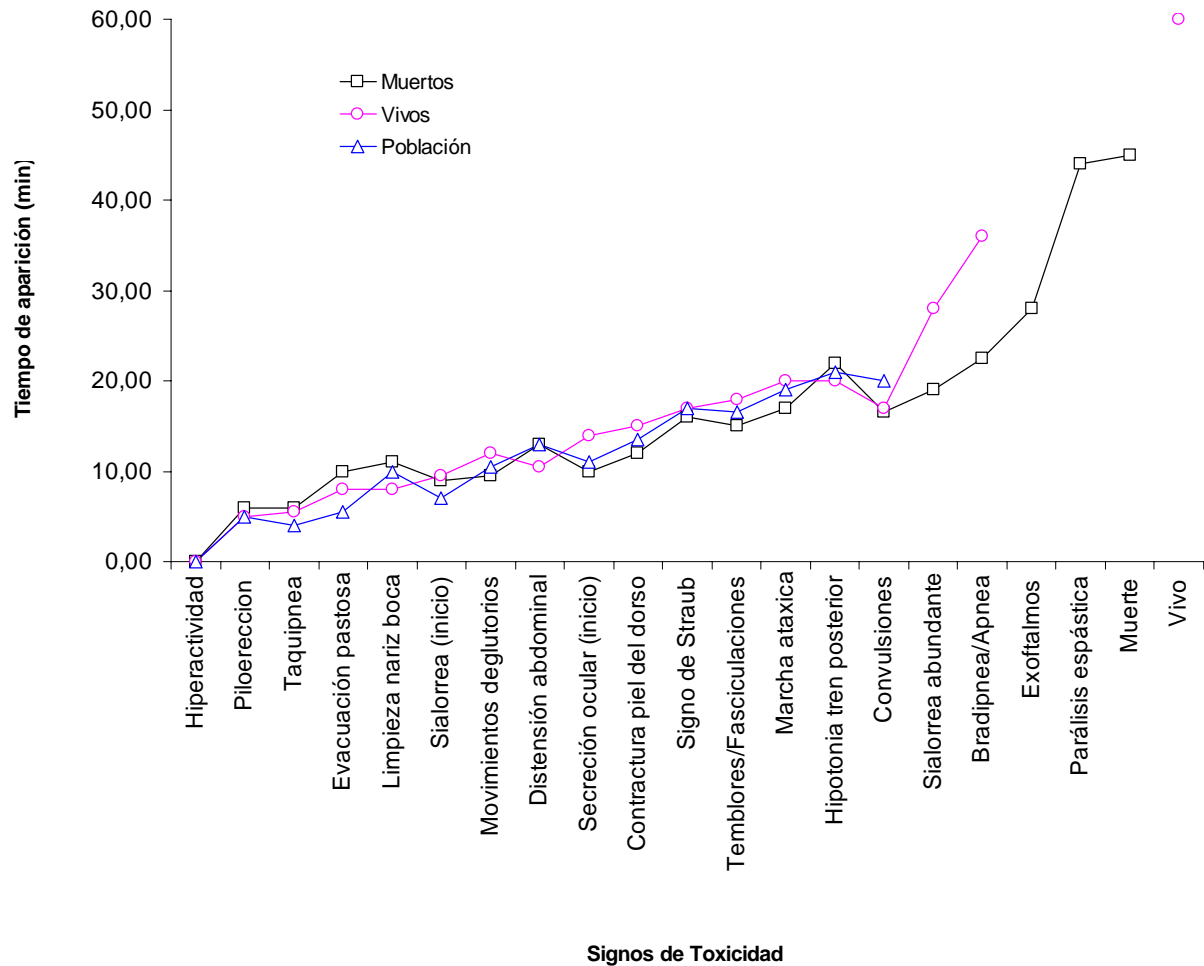


Figura 7. Comparación del curso temporal de toxicidad aguda experimental entre ratones fallecidos y sobrevivientes sometidos al veneno de ejemplares macho de *Tityus nororientalis*.

La línea azul representa los valores de la mediana de tiempo de aparición de los signos clínicos sin diferencias significativas entre los ratones vivos y muertos.

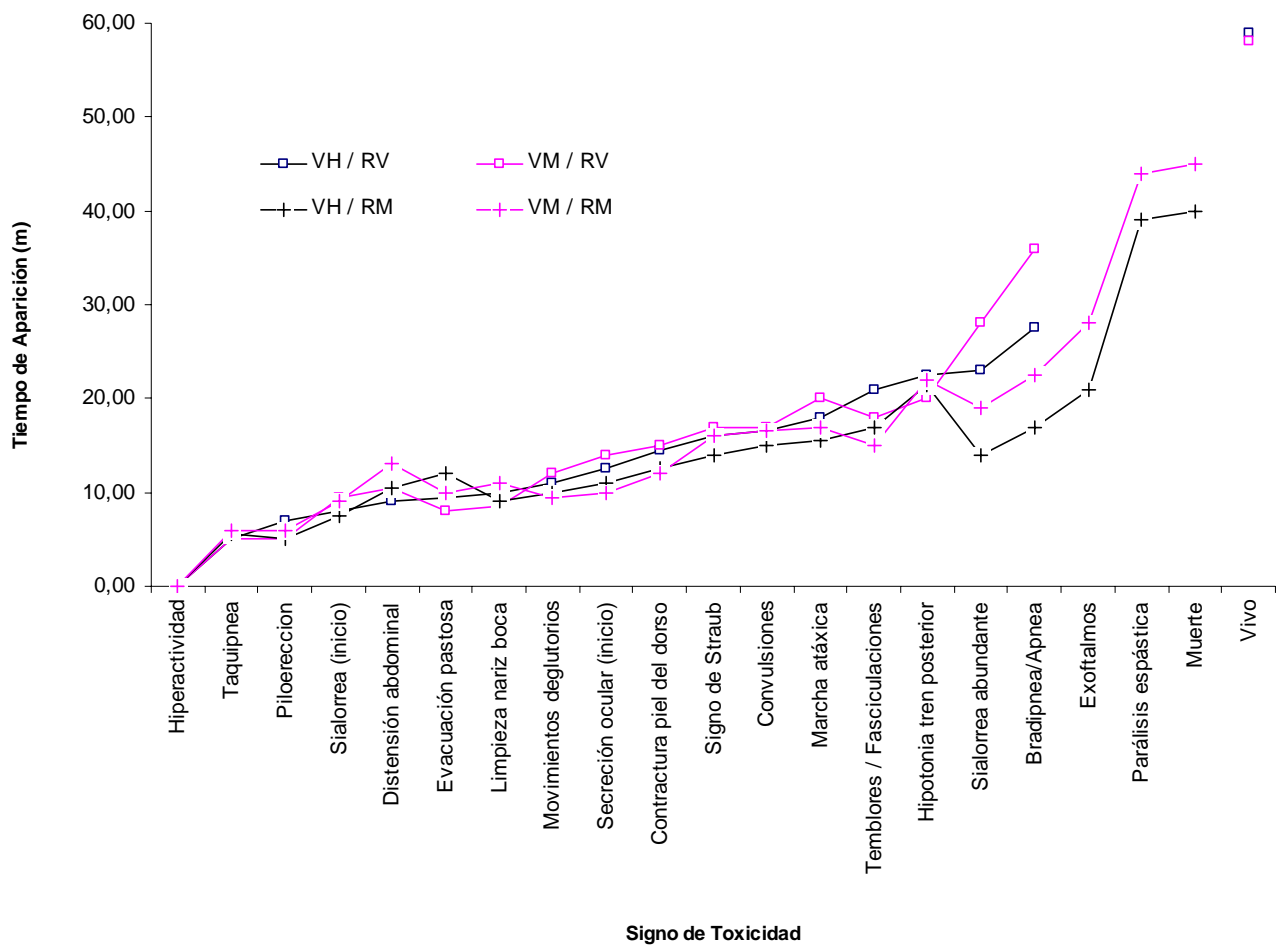
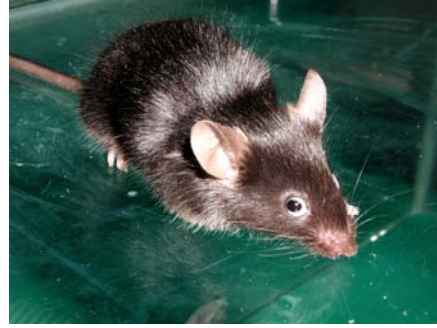


Figura 8. Comparación del curso temporal de toxicidad aguda experimental entre ratones fallecidos y sobrevivientes sometidos al veneno de ejemplares hembra o macho de *Tityus nororientalis*.

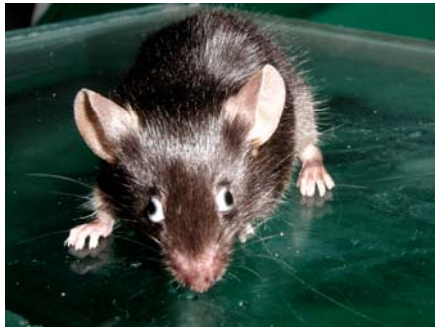
La línea de color negro indica el veneno de los ejemplares hembra (VH) de *Tityus nororientalis*; el fucsia el de los machos (VM). El símbolo (□) indica los ratones sobrevivientes (RV) y el símbolo (+) los fallecidos (RM) por efecto tóxico de los venenos.



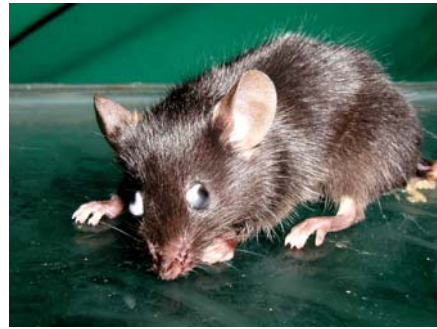
a



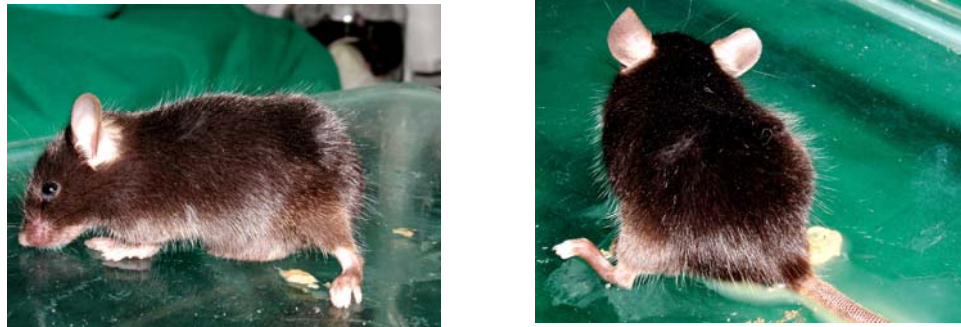
b



c



d



e

f

Figura 9. Comparación de un ratón C57BL/6 control con uno sobreviviente inyectado, por vip, con el veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* mostrando algunos signos de toxicidad aguda.

(a) Ratón testigo (sano). (b), (c) y (d) Secreción ocular evidente. En (c y d), nótese exoftalmos bilateral (e) Hipotonía, defecación pastosa y distensión abdominal. (f) Defecación líquida (observada con baja frecuencia).



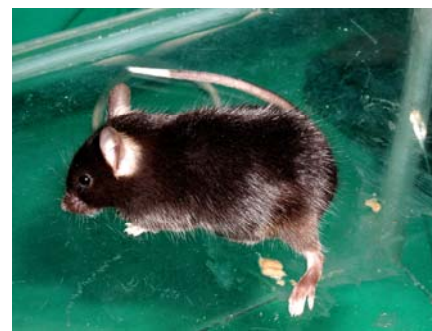
a



b



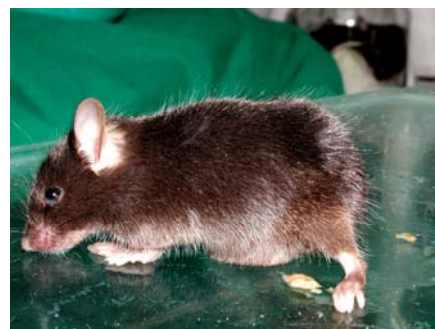
c



d



e



f

Figura 10. Comparación de un ratón C57BL/6 control con uno sobreviviente inyectado, por vip, con el veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis*

mostrando algunos signos de toxicidad aguda.

(a) Ratón testigo (sano). (b) Piloerección (nótese la postura del animal mostrando debilidad muscular del tren posterior). (c), (d), y (e) Hipotonía. En (f) nótese defecación pastosa y distensión abdominal).





Figura 11. Ratón C57BL/6 sobreviviente inyectado por vip con el veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis* mostrando el signo de Straub.

## 4.2 DISCUSIÓN

### 4.2.1 Significación de *Tityus nororientalis* como especie de importancia médica en el Nororiente de Venezuela

Estudios epidemiológicos recientes han permitido establecer que las especies *Tityus zulianus*, *Tityus discrepans* y *Tityus nororientalis* son, respectivamente, los taxa responsables del mayor número de envenenamientos en las zonas Andina, Centro-Norte y Nor-oriental (Borges y De Sousa, 2006). En este trabajo se utilizó el veneno de una población de *Tityus nororientalis* capturada en la localidad de Las Melenas, municipio Mariño, estado Sucre. Investigaciones en curso demuestran, al presente, que es la especie con el mayor rango de distribución territorial en el nororiente venezolano (De Sousa en preparación).

El presente trabajo es el segundo en demostrar toxicidad diferencial entre el veneno de ejemplares hembras y machos de *Tityus nororientalis*. Previamente De Sousa-Insana y Pino (2009) y Chadee (2010) habían demostrado este comportamiento toxicológico intersexual para una población de *Tityus nororientalis* capturada en la localidad tipo de la especie localizada en Catuaro, municipio Ribero del estado Sucre. Al comparar los efectos de cada veneno, de esta especie, inyectado por vía intraperitoneal, en ratones C57BL/6 y al evaluar el curso temporal de aparición de los signos, inducidos como efecto tóxico del envenenamiento agudo experimental; se pudo observar que independientemente del sexo de procedencia del veneno (hembras o machos), utilizado en esta investigación, los signos valorados en los ratones son característicos de un cuadro neurotóxico agudo, el cual ya ha sido reportado clásicamente para otros escorpiones de importancia médica en Venezuela (Borges y De Sousa, 2006; De Sousa, 2006; Cornejo, 2008; Cova, 2008; Da Camara y col.,

2008; Hurtado y col., 2008; Sanquíz y González, 2008; Albornoz y col., 2009; De Sousa y col., 2009; De Sousa-Insana y Pino, 2009; Chadee, 2010). Cova (2008) señala que el veneno de diferentes especies venezolanas de *Tityus* produce un síndrome específico que, aunque comparable en su naturaleza neurotóxica, en apariencia, son de magnitud y cinética exclusivas de cada taxón. Con los resultados aquí presentados se refuerza ese concepto propuesto por Cova (2008) demostrando diferencias intersexuales, para una misma especie, entre la magnitud y la cinética de toxicidad cuando se compararon los dos venenos ensayados.

#### **4.2.2 Utilidad del modelo múrido C57BL/6 para la evaluación del efecto del veneno de escorpiones de importancia médica en Venezuela**

El envenenamiento escorpiónico experimental es un complejo sindromático asociado fundamentalmente a disfunción en los sistemas cardiorrespiratorio y nervioso (central y periférico) e inflamatorio (no evaluado en este trabajo) (Sofer y col., 1996; Mazzei de Dávila y col., 1997; Voronov y col., 1999; Otero y col., 1998; Mazzei de Dávila y col., 2002; Otero y col., 2004; Borges y De Sousa, 2006; De Sousa y col., 2007; Borges y De Sousa, 2009); produciendo los signos y síntomas clásicos observados en el escorpionismo (humano, veterinario y experimental). Por lo tanto, los signos clínicos observados por cualquiera de los venenos utilizados (procedentes de ejemplares hembras o machos de *Tityus nororientalis*) son diversos y de cuatro tipos generales: (1) los colinérgicos postganglionares tanto muscarínicos como nicotínicos producto de hiperestimulación del sistema nervioso parasimpático; predominantes sobre los otros mecanismos, (2) las adrenérgicas postganglionares por hiperestimulación del simpático, (3) los del sistema motor y (4) los centrales que incluyen las convulsiones tónico-clónicas con base en transmisión colinérgica. Estos mecanismos coinciden con lo observado en humanos envenenados por especies de escorpiones del género *Tityus* en diferentes regiones endémicas de Venezuela y otros

países de América del Sur (De Sousa y col., 2000; Borges y De Sousa, 2006, Borges y col., 2010). Esta similitud valida el uso del modelo mûrido, especialmente de la cepa C57BL/6, para la estimaci3n del efecto de venenos de escorpi3n procedentes de diferentes 1reas endémicas en el pa3s; modelo propuesto previamente en otros trabajos (Marcano y Mundaray, 2000; Mar3n y Rodr3guez, 2000; Boadas y Marcano, 2004; Turkali, 2004; De Sousa, 2006; Cornejo, 2008; Cova, 2008; Hurtado y col., 2008; Albornoz y col., 2009; De Sousa y Borges, 2009; De Sousa y col., 2009; De Sousa-Insana y Pino, 2009; Chadee, 2010).

Hurtado y colaboradores (2008) indicaron que el 3ndice letal cincuenta, del veneno de *Tityus nororientalis* (capturados en la localidad de Las Melenas, municipio Mariño, Península de Paria, estado Sucre) fue significativamente menor ( $p = 0,000001$ ) en ratones hembra C57BL/6 ( $DL_{50} = 8,43 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$  de rat3n) que el obtenido en ratones NMRI ( $DL_{50} = 28,18 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$  de rat3n); y 3ste, menor ( $p = 0,000001$ ) que el obtenido en los BALBc ( $DL_{50} = 40,07 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$  de rat3n); demostrando una mayor sensibilidad de C57BL/6 al efecto t3xico del veneno de esta especie. Por lo cual, los autores proponen la utilidad de la cepa C57BL/6 como un excelente modelo funcional, de bioensayo, para evaluar los venenos de escorpiones venezolanos. Recientemente, Albornoz y colaboradores (2009) y Salom3n (2009) incorporaron los estudios histopatol3gicos a los ensayos de letalidad y curso temporal de toxicidad aguda, correlacionando, en lo posible, las posibles alteraciones de la arquitectura histol3gica con las manifestaciones cardiovasculares que, en apariencia, se desarrollan en los humanos. Los autores, adicionalmente, indicaron que en las cepas homocig3ticas (BALBc y C57BL/6) las alteraciones mioc1rdicas y renales fueron m1s acentuadas.

#### **4.2.3 Diferencias y similitudes entre el envenenamiento experimental causado por el veneno de ejemplares hembras o machos de *Tityus nororientalis***

Los resultados obtenidos en el presente trabajo relacionados con los índices de letalidad y el curso temporal de toxicidad, especialmente en su fase tardía, confirman que en el síndrome de envenenamiento experimental causado por la toxinas de *Tityus nororientalis*, en ratones C57BL/6, es sexo-específico, quiere decir, depende del sexo (hembras o machos) de origen del veneno.

Borges y colaboradores (2006b), mediante estudios moleculares y de espectrometría de masas, demostraron que los mapas proteicos de los venenos de *Tityus discrepans* y de *Tityus zulianus* son exclusivos de cada uno de ellos; por lo cual, igualmente podría existir la posibilidad que las divergencias entre los venenos de machos y hembras de *Tityus nororientalis* sean producto de diferencias en la abundancia de los componentes tóxicos comunes y/o a la presencia de toxinas específicas para cada uno de ellos. Similarmente Borges y colaboradores (2000a) indicaron que *Tityus imei*, especie de distribución restringida a la vertiente sur de la Sierra de Portuguesa, contiene en su veneno neurotoxinas con características a las anteriormente mencionadas, detectadas por espectrometría de masas. Resultados preliminares indican, para otros *Tityus* venezolanos de importancia médica, la presencia de componentes exclusivos para cada uno de ellos, aún cuando poseen masas muy cercanas, que corresponden al intervalo de las toxinas activas para los canales de sodio (Borges y De Sousa, 2006; Borges y col., 2006a,b). La técnica MALDI-TOF ha permitido establecer que la huella peptídica (para el mencionado intervalo de 6-8 kDa) es especie-específico (Borges, comunicación personal), de tal manera que las diferencias clínicas observadas, en diferentes regiones del país, pueden tener como base diferencias en los proteomas de las glándulas de veneno de las especies involucradas. Esta ideas planteadas por Borges y colaboradores (2006a,b;

Borges, comunicación personal) podrían tener su paralelo dentro de una misma especie cuando se evalúa la procedencia del veneno según el sexo del escorpión.

*Tityus nororientalis*, la especie de más amplia distribución en el Nororiente (De Sousa en preparación), es un taxón polimórfico desde el punto de vista de la composición de su veneno, según lo reportado por Borges *et al.* (2008), quienes hallaron diferencias apreciables en el patrón electroforético de los venenos de ejemplares provenientes de Alto Llano (Anzoátegui) y Caripe (Monagas); demostrando proteómas distintos. La tabla 7 demuestra cualitativamente tal polimorfismo, desde el punto de vista de los títulos letales ( $DL_{50}$ ), mediante la diferencia en toxicidad entre los venenos producidos por distintas poblaciones de *Tityus nororientalis* de Anzoátegui (Alto Llano, municipio Sotillo), Monagas (Sabana de Piedra, municipio Caripe) y Sucre (Las Melenas, municipio Mariño o Catuaro, municipio Ribero), previamente evaluados, comparados con la población de ejemplares hembras o machos de *Tityus nororientalis* (Las Melenas, municipio Mariño) que se presenta en este trabajo. Las comparaciones de los índices letales indicarían dos grupos de toxicidad para los venenos de los ejemplares hembra: (a) uno más potente conformado por las poblaciones de escorpiones provenientes de Las Melenas (Península de Paria, Sucre) y de Sabana de Piedra (Serranía del Turimiquire, Monagas) y (b) uno menos potente para los de Alto Llano (Serranía del Turimiquire, Anzoátegui) y Catuaro (Serranía del Turimiquire, Sucre); sin embargo, el límite de confianza de la  $DL_{50}$  del veneno de los ejemplares hembra, de Catuaro, se ubicaría entre los dos grupos de toxicidad. Estos resultados confirmarían, en apariencia, el alto grado de polimorfismo del veneno; posiblemente relacionado con la expresión proteómica de los venenos de escorpiones provenientes de distintas localidades. El grupo de machos capturados en Las Melenas difiere de la toxicidad del veneno obtenido de las hembras; patrón toxinológico similar al exhibido por machos y hembras de *T. nororientalis* provenientes de Catuaro (De Sousa-Insana y Pino, 2009; Chadee, 2010). Estos resultados indicarían que los venenos más potentes estarían

relacionados con la hembra de esta especie; suposición que debería ser evaluada por otras técnicas como MALDI-TOFF para demostrar diferencias cuantitativas entre estos venenos.

Estos resultados toxinológicos, de diferenciación intersexual, obtenidos para la población de *Tityus nororientalis* de Las Melenas en este trabajo y de Catuaro (De Sousa-Insana y Pino, 2009; Chadee, 2010), necesitaría reconfirmación para otras poblaciones de este taxa del nororiente venezolano y para otros *Tityus* de importancia médica en nuestro país. Por lo pronto, los resultados indicarían la necesidad de utilizar venenos combinados de hembras y machos, en este caso de *Tityus discrepans*, para la preparación del anti-suero venezolano disponible actualmente.

Aunque comparable en su naturaleza neurotóxica, el curso temporal de toxicidad es de magnitud y cinética diferencial en la fase de toxicidad grave (sialorrea abundante, disnea bradipnea-apnea y exoftalmos) entre los venenos evaluados. En tal sentido, Hurtado y colaboradores (2008) indicaron que el espectro medio de toxicidad moderadamente grave y el de toxicidad grave, inducido con el veneno de ejemplares hembra de *Tityus nororientalis*, aunque común, es en apariencia de cinética distinta para las tres cepas de ratones (NMRI, BALBc y C57BL/6) evaluadas en su trabajo. Demostraron que el tiempo de muerte de los ratones, en los tres modelos, fue similar (ocurrió alrededor de los 40 minutos); sin embargo, al comparar las tendencias existieron varios signos que presentaron diferencias, entre ellas los temblores generalizados, signo de Straub, secreción ocular, marcha atáxica y exoftalmos. Lo cual se convierte en una evidencia que soportaría estos resultados.

Otros arácnidos como *Coremiocnemis tropix* (Araneae, Theraphosidae) muestran variaciones toxinológicas intersexuales en su veneno. Para esta especie de araña, los machos presentan componentes ligeramente más potentes que el de las hembras, cuando se evaluó su toxicidad en insectos (grillos); mientras que las hembras poseen efectos más prominentes sobre los tejidos de vertebrados (preparación de unión

neuromuscular de pollo). Similarmente, estas diferencias intersexuales fueron observadas en los patrones de composición de los venenos, de ambos sexos, obtenidos por metodología de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Herzig y Hodgson, 2009). Estos resultados apoyarían la posibilidad de diferencias en la expresión proteómica del veneno de hembras y machos de *Tityus nororientalis* provenientes de una misma localidad o de localidades distantes. Todas las evidencias apuntarían a confirmar la alta complejidad de los venenos de este grupo taxonómico en el nororiente venezolano.



Tabla 7. Comparación de las DL<sub>50</sub> del veneno de ejemplares de *Tityus nororientalis* provenientes de varias localidades del nororiente de Venezuela.

Población de <i>Tityus nororientalis</i>	DL <sub>50</sub>	Límites de confianza	Kruskall - Wallis; <i>p</i>
	mg×kg <sup>-1</sup>		
	♂♂ = 10,61	10,07 – 11,30	
Las Melenas, Sucre Δ	18,05; <i>p</i> = 0,000001		
	♀♀ = 8,43	8,00 – 8,54	
Las Melenas, Sucre †	♀♀ = 8,43	7,94 – 8,91	0,00; ns
Sabana de Piedra, Monagas ‡	♀♀ = 8,43	7,94 – 8,91	
	7,35; <i>p</i> = 0,03		
Alto Llano, Anzoátegui (*)	♀♀ = 9,46	9,46 – 10,00	
Altos de Sucre (Δ)	♀♀ = 9,46	8,91 – 10,00	0,00; ns
	♀♀ = 9,46	8,91 – 9,46	
Catuaro, Sucre (§)	18,95; <i>p</i> = 0,00001		
	♂♂ = 13,36	12,58 – 13,36	

Δ Este trabajo

† Cova, 2008 y Hurtado *et al.*, 2009

‡ Marín y Rodríguez, 2001

\* Turkali, 2004

Δ Romero, 2010

§ De Sousa-Insana y Pino, 2009 y Chadee, 2010

#### **4.2.4 Alcances de los resultados y su contribución a la elaboración del mapa de letalidad de la escorpiofauna venezolana de importancia médica**

El presente trabajo reconfirma que el síndrome del envenenamiento por escorpiones del género *Tityus* en vertebrados es especie-específico (Borges *et al.*, 2004b; 2006a; Cova, 2008); pero también, en apariencia, supeditado al origen sexual del veneno. Estos resultados se suman al conjunto de evidencias moleculares, inmunológicas, bioquímicas, fisiológicas e histopatológicas, ya disponibles, que indicarían que el veneno de *Tityus nororientalis* es altamente complejo. Cova (2008) sugiere que tal complejidad podría estar relacionada, posiblemente, con variaciones estructurales y/o funcionales de las toxinas que constituyen el veneno.

En definitiva, con este trabajo se presentan nuevos elementos que vienen a reforzar los criterios toxinológicos que determinan la macroregión endémica de escorpionismo en la región Nororiental e Insular (De Sousa y col., 1995; 1996; 1997; 1999; 2005; 2006b; 2007a) de Venezuela (De Sousa y Borges, 2009, y adicionalmente contribuye con la elaboración del mapa de letalidad de las especies de *Tityus* propuesto por Borges (1996) y, más recientemente, para una demarcación del país en “Provincias Toxinológicas” planteada por Borges y De Sousa (2006; 2009) y Borges y colaboradores (2010) para una comprensión integral del escorpionismo en el país.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES

Existen diferencias en los parámetros toxicológicos de producción de veneno entre hembras y machos de *Tityus nororientalis* capturados en Las Melenas, estado Sucre.

La  $DL_{50}$  del veneno de las hembras, bajo las condiciones experimentales establecidas, fue de 8,43 (8,00 – 8,54)  $mg.kg^{-1}$  de ratón y para los machos de 10,61 (10,07 – 11,30)  $mg.kg^{-1}$  de ratón.

El veneno de las hembras fue significativamente más potente, en términos de su índice letal, que el de los machos.

Los venenos de hembras y machos capturados en Las Melenas son más potentes que los venenos de *Tityus nororientalis* capturados en su localidad tipo ubicada en Catuaro.

Las manifestaciones colinérgicas, con cualquiera de los venenos, predominaron en el cuadro neurotóxico agudo.

Aunque comparable en su naturaleza neurotóxica, el curso temporal de toxicidad es de magnitud y cinética diferencial en la fase de toxicidad grave (sialorrea abundante, disnea bradipnea-apnea y exoftalmos) entre los venenos evaluados.

Los resultados indicarían la posibilidad de diferencias en la expresión proteómica del veneno de hembras y machos de *Tityus nororientalis* provenientes de una misma localidad o de localidades distantes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Albornoz E., Cedeño O., Perei<sup>40</sup>. Cambios histopatológicos agudos causados por el veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones: Buthidae) en miocardio de ratones NMRI, BALBc y C57BL/6. Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
2. Barona J., Batista C., Zamudio F., Gómez-Lagunas F., Wanke E., Otero R., Possani L. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764: 76-84.
3. Becerril B., Corona M., García C., Bolívar L., Possani L. 1995. Cloning of genes encoding scorpion toxins: an interpretative review. *Journal of Toxicology and Toxins Review*, 14: 339 – 357.
4. Becerril B., Marangoni S., Possani L. 1997. Toxins isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*, 35: 821-835.
5. Biondi-Queiroz I., García-Santana V., Rodrigues D. 1996. Estudio retrospectivo do escorpionismo na Região Metropolitana de Salvador (RSM)-Bahia, Brasil. *Sitientibus*, 15: 273-285.
6. Boadas J., Marcano J. 2004. Cuantificación del volumen, cantidad de proteínas y evaluación de la toxicidad del veneno de *Rhopalurus laticauda* (Scorpiones: Buthidae). Trabajo de grado para optar al título de Médico

Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.

7. Borges A. 1996. Escorpionismo en Venezuela. *Acta Biológica Venezuelica*, 16: 65-75.
8. Borges A., De Sousa L. 2006. Escorpionismo en Venezuela: una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. *Revista de la Facultad de Farmacia (UCV)*, 69: 15-27.
9. 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.
10. Borges A., De Sousa L. 2009. Una aproximación multidisciplinaria para el estudio del envenenamiento por *Tityus discrepans* en Venezuela. En: *Enfoques y Temáticas en Entomología*. Arriv El Souki, M. y Herrera, B. (eds). Ediciones Astrodata, Caracas. Págs. 137-153.
11. Borges A., Arantes E., Gilglio J. 1990. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Venezuela scorpion *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon*, 28: 1011-1017.
12. Borges A., Tsushima R., Backx P. 1999. Antibodies against *Tityus discrepans* venom do not abolish the effect of *Tityus serrulatus* venom on the rat sodium and potassium channels. *Toxicon*, 37: 868-881.
13. Borges A., Arandia J., Colmenares-Árias Z., Vargas A., Alfonso M. 2002. Caracterización epidemiológica y toxicológica del envenenamiento por *Tityus*

*zulianus* (Scorpiones, Buthidae) en el estado Mérida, Venezuela. *Revista Facultad de Medicina (UCV)*, 25: 76-79.

14. Borges A., Trejo E., Vargas A., Céspedes G., Hernández A., Alfonzo M. 2004a. Pancreatic toxicity in mice elicited by *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* scorpion venom. *Investigación Clínica*, 45: 269-276.
15. Borges A., Alfonzo M., García C., Winand N., Leipold E., Heinemann S. 2004b. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel  $\beta$ -toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon*, 43: 671-684.
16. Borges A., De Sousa L., Manzanilla J. 2006a. Description of a New *Tityus* species (Scorpiones: Buthidae) from Sierra de Portuguesa, western Venezuela, based on morphological and mitochondrial DNA evidence. *Zootaxa*, 1107: 49-68.
17. Borges A., García C., Lugo E., Alfonzo M., Jowers M., Op den Camp H. 2006b. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones: Buthidae): Molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142: 240-252.
18. Borges A., De Sousa L., Espinoza J., Santos R., 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.
19. Borges A., Rojas-Runjaic FJM, Diez N, Facks J, Segura A and De Sousa L. 2010. Envenoming by the scorpion *Tityus breweri* González-Sponga in the Guayana Shield, Southeast Venezuela: Report of a case, reactivity towards

antivenom and proposal for a toxinological partitioning of the Venezuelan scorpion fauna. *Wilderness Environmental Medicine*, 21, in press.

20. Chadee R. 2010. Evaluación de la actividad biológica del veneno de ejemplares machos y hembras de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo múrido C57BL/6. Trabajo de grado para optar al título de Licenciada en Bioanálisis, Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumana.
21. Chinchilla Y., Franco L. 2003. Cuantificación del volumen y de la cantidad de proteínas del veneno de varias especies de *Tityus* de la Región Nororiental de Venezuela. Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
22. Cornejo P. 2008. Registro de *Tityus tenuicauda* Prendini, 2001 (Scorpiones, Buthidae) para Venezuela. Aspectos farmacológicos de su veneno. Trabajo de grado para optar al título de *Magíster Scientiarium* en Biología Aplicada, Postgrado en Biología Aplicada, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná.
23. Coronado L., Alvarado M., Dutari J. Características clínicas y epidemiológicas del alacranismo. Periodo 2002-2007. Hospital del Niño, Panamá. *Revista Pediátrica de Panamá*, 37(2): 36-46, 2008.
24. Cova Y. 2008. Evaluación de la actividad biológica del veneno de tres especies venezolanas de importancia médica del género *Tityus* (Scorpiones, Buthidae). Trabajo de grado para optar al título de Licenciada en Bioanálisis, Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumana.

25. Da Cámara N., Rivas R., Rojas P. 2008. Evaluación de la actividad biológica y dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) del veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en ratones NMRI. Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
26. De Los Ríos M. 2006. Alacranes con hábitos de invasión del ambiente antrópico depositados en la Colección de Escorpiones del Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
27. De Sousa L. 2006. Especie de *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) de la serranía del Turimiquire, nororiente de Venezuela. Caracterización morfológica, geográfica y toxinológica. Trabajo de Ascenso a Profesor Asociado, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Barcelona.
28. De Sousa L., Borges A. 2009. Escorpiones y escorpionismo en Venezuela. En: *Enfoques y Temáticas en Entomología*. Arrivillaga, J.; El Souki, M. & Herrera, B. (eds). Ediciones Astrodata, Caracas. Págs. 154-165.
29. De Sousa L., Kiriakos D., Jiménez J., Michelli D., Rodríguez C., Mirabal J., Quiroga M. 1995. Accidente cerebrovascular isquémico por emponzoñamiento escorpiónico: observación clínica. *Saber*, 7: 7-14.
30. De Sousa L., Bónoli S., Quiroga M., Parrilla P. 1996. Scorpion sting in Montes Municipality of the State of Sucre, Venezuela: geographic



- distribution. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38: 147-152.
31. De Sousa L., Parrilla P., Tillerio L., Valdivieso A., Ledezma E., Jorquera A., Quiroga M. 1997. Scorpion poisoning in the Acosta and Caripe counties of Monagas State, Venezuela. Part I: characterization of some epidemiological aspects. *Cadernos de Saúde Pública*, 13: 45-51.
  32. De Sousa L., Bónoli S., Parrilla-Álvarez P., Ledezma E., Jorquera A., Quiroga M. 1999. The proposal of a new endemic macroregion for scorpionism in Venezuela. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 5: 111.
  33. De Sousa L., Parrilla-Álvarez P., Quiroga M. 2000. An epidemiological review of scorpion sting in Venezuela. The northeastern region. Review article. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6: 127-165.
  34. De Sousa L., Vázquez D., Salazar D., Valecillos R., Vázquez D., Rojas M., Parrilla-Álvarez P., Quiroga M. 2005. Mortalidad en humanos por envenenamientos causados por invertebrados y vertebrados en el estado Monagas. *Investigación Clínica*, 46: 246-254.
  35. De Sousa L., Manzanilla J., Parrilla-Álvarez P. 2006. Nueva especie de *Tityus* (Scorpiones: Buthidae) del Turimiquire, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 54: 489-504.
  36. De Sousa L., Boadas J., Kiriakos D., Borges A., Boadas J., Marcano J., Turkali I., De Los Ríos M. 2007a. Scorpionism due to *Tityus neoespartanus* (Scorpiones, Buthidae) in Margarita Island, northeastern Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40: 681-685.

37. De Sousa L., Manzanilla J., Cornejo-Escobar P. 2007b. Depredación sobre serpiente colúbrida por *Latrodectus* cf. *geometricus* Koch, 1841 (Araneae: Theridiidae). *Ciencia*, 15: 410-412.
38. De Sousa L., Borges A., Manzanilla J., Biondi I., Avellaneda E. 2008a. Second record of *Tityus bahiensis* from Venezuela: Epidemiological implications. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 14: 170-177.
39. De Sousa L., Manzanilla J., Borges A., Cornejo-Escobar P., Gregoriani T. 2008b. Discovery and description of the male of *Tityus uquirensis* (Scorpiones: Buthidae) from Paria Peninsula, northeastern Venezuela. *Zootaxa*, 1828: 57-68.
40. De Sousa L., Parrilla-Álvarez P., Pérez Di Gaeta P., Romero L., Quiroga M. 2009. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo C57BL/6. *Saber*, 21: 50-62.
41. De Sousa-Insana L., Pino O. 2009. Estudio comparativo de la actividad biológica del veneno de ejemplares hembras y machos de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en el modelo murino C57BL/6. Trabajo de Grado para optar al Título de Bachiller en Ciencias, Cátedra de Metodología de la Investigación, Colegio Juan Jacobo Rousseau, Puerto La Cruz.
42. Dehesa-Dávila M. 1989. Epidemiological characteristics of scorpion sting in Leon, Guanajuato, Mexico. *Toxicon*, 27: 281-285,

43. Díaz R., Obregón D., Romero A. 2005. Distribución y ecología de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en los estados Anzoátegui, Monagas y Sucre. Notas sobre su historia natural. Trabajo de grado para optar al título de Bachiller en Ciencias, Cátedra de Metodología de la Investigación, Colegio Juan Jacobo Rousseau, Puerto La Cruz.
44. Dixon W., Mood A. 1948. A method for obtaining and analyzing sensitivity data. *Journal of the American Statistical Association*, 43: 109-126.
45. Fet V., Lowe G. 2000. Family Buthidae C. L. Koch, 1837. En: *Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998)*. Fet, V.; Sissom, W.; Lowe, G. & Braunwalder, M. (eds). New York Entomological Society, New York. Págs.. 54-286.
46. Gómez J., Otero R. 2007. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública*, 25: 50-60.
47. Gómez J., Otero R., Núñez V., Saldarriaga M., Díaz A., Velásquez M. 2002. Aspectos toxinológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *MEDUNAB*, 5: 159-165.
48. González-Sponga M. 1996a. *Guía para identificar escorpiones de Venezuela Cuadernos Lagoven*. Caracas.
49. González-Sponga M. 1996b. Arácnidos de Venezuela: seis nuevas especies del género *Tityus* y redescrición de *Tityus pococki* Hirts, 1907, *Tityus*

*rugosus* (Schekel, 1932) *n. comb.* y *Tityus nematochirus* Mello-Leitão, 1940 (Scorpionida: Buthidae). *Acta Biologica Venezuelica*, 16: 1-38.

50. Glantz S. 2002. *Primer of Biostatistics*, 5<sup>th</sup> edición, Mc Graw- Hill.
51. Hurtado A., Montaña L., Rodríguez F. 2008. Comparación de la actividad biológica y dosis letal cincuenta del veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en ratones albinos de las cepas NMRI y BALBc. Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
52. Illanes A. 1981. *Farmacología de los venenos de escorpión*. Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo de Bolívar, Ciudad Bolívar.
53. Jiménez M., Paulo M. 2001. Separación en fracciones de los constituyentes proteicos del veneno de *Tityus gonzalespongai* (Scorpionida: Buthidae). Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
54. Kiriakos D., Núñez P., Parababire Y., García M., Medina J., De Sousa L. 2008. First report of human Latrodectism in Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42: 202-204.
55. Leipold E., Hansel A., Borges A., Heinemann S. 2006. Subtype specificity of scorpion  $\beta$ -toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is

determined by the pore loop of domain-3. *Molecular Pharmacology*, 70: 340-347.

56. Lourenço W., Cuellar O. 1995. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. Review article. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 1: 51-62.
57. Lourenço W., Cloudsley-Thompson J., Cuéllar O., von Eickstedt V., Barraviera B., Knox M. 1996. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *Journal Venomous Animals Toxins*, 2: 121-134.
58. Manzanilla J., De Sousa L. 2003. Ecología y distribución de *Rhopalurus laticauda* Thorell, 1876 (Scorpiones: Buthidae) en Venezuela. *Saber*, 15: 3-14.
59. Manzanilla J., De Sousa L., Quiroga M., López H., Parrilla-Álvarez P. 2002. Morfología externa de *Rhopalurus laticauda* (Scorpiones: Buthidae). *Saber*, 14: 94-102.
60. Marcano M., Mundaray J. 2000. Toxicidad aguda y evaluación de la Dosis Letal Cincuenta (DL<sub>50</sub>) en ratones C57BL/6 inducida por el veneno de una nueva especie del género *Tityus* (*Tityus* n. sp. 1.) del estado Monagas. Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
61. Marín D., Rodríguez A. 2000. Toxicidad aguda y evaluación de la Dosis Letal Cincuenta (DL<sub>50</sub>) en el modelo múrido C57BL/6 inducida por el veneno de *Tityus* sp. de Sabana de Piedra, estado Monagas. Trabajo de grado para optar

al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.

62. Mazzei de Dávila C., Parra M., Fuenmayor A., Salgar N., González Z., Dávila D. 1997. Scorpion envenomation in Mérida, Venezuela. *Toxicon*, 35: 1459-1462.
63. Mazzei de Dávila C., Dávila D., Donis J., Arata-Bellarbarba G., Villarreal V., Barboza L. 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*, 40: 1339-1346.
64. Mejias-R R., Yánez C., Árias R., Mejias-R R., de Árias Z., Luna J. 2007. Ocurrencia de escorpionismo en los distritos sanitarios del estado Mérida. *Investigación Clínica*, 48: 147-153.
65. Mota J., Ghersy de Nieto M., Bastardo M., Rodríguez J., Duque L., Freytez L. 1994. Emponzoñamiento escorpiónico: clínica y laboratorio usando antivenina. *Boletín del Hospital de Niños (Caracas)*, 30: 35-40.
66. Otero R., Uribe F., Sierra A. 1998. Envenenamiento escorpiónico en niños. *Actualizaciones Pediátricas*, 8: 88-92.
67. Otero R., Navio E., Céspedes F., Núñez M., Lozano L., Moscoso E., Matallana C., Arsuza N., García J., Fernández D., Rodas J., Rodríguez O., Zuleta J., Gómez J., Saldarriaga M., Quintana J., Núñez V., Cárdenas S., Barona J., Valderrama R., Paz N., Díaz A., Rodríguez O., Martínez M., Maturana R., Beltrán L., Mesa M., Paniagua J., Flórez E., Lourenço W. 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological

and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98: 742-750.

68. Parrilla-Álvarez P. 1999. Caracterización inmunológica parcial del veneno y toxoide de escorpiones venezolanos del género *Tityus*. Trabajo de grado para optar al título de *Magíster Scientiarium* en Biología, Centro de Estudios Avanzados, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.
69. Porras J., Rosillo-González M., Guirado-Pastor M. 1994. Escorpionismo por *Tityus discrepans*. Estudio retrospectivo 1983-1986. *Archivos Venezolanos de Pediatría y Puericultura*, 57: 98-105.
70. Prendini L., Wheeler W. 2005. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics*, 21: 446-494.
71. Quiroga M., Illanes A., González A., Jaramillo E. 1982. Mantención de escorpiones en el laboratorio, Orden Scorpionida, Buthidae, *Rhopalurus laticauda* (Thorell, 1876). Influencia de la alimentación. *Acta Científica Venezolana*, 33: 502-508.
72. Rojas-Runjaic F., De Sousa L. 2007. Catálogo de los escorpiones de Venezuela (Arachnida: Scorpiones). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 40: 281-307.
73. Ross M. 1996. Pharmacodynamics. Mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. *In*: Hardman, J.; Limbird, L.; Molinoff, P.; Ruddon, R. y Goodman-Gilman A. (Ed), Goodman and

Gilman, the pharmacological basis of therapeutics. Ninth Edition. New York: McGraw-Hill, pp. 29-41.

74. Saldarriaga M., Otero R. 2000. Los Escorpiones: aspectos ecológicos, biológicos y toxinológicos. *Med-UNAB*, 3: 17-23.
75. Salinas P., Salinas P. 2005. Emponzoñamiento escorpiónico en pacientes atendidos en el hospital de Santa Cruz de Mora, Mérida, Venezuela. *Revista de Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes*, 12: 1-4.
76. Salomón L. 2009. Cambios histológicos causados por el veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) en riñones de ratones BALBc, NMRI y C57BL/6. Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
77. Sanquíz M., González Z. 2008. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus nororientalis* en ratones de la cepa BALB/c. Trabajo de grado para optar al título de Bachiller en Ciencias, Cátedra de Metodología de la Investigación, Colegio Nuestra Señora de Lourdes, Puerto La Cruz.
78. Sevcik C. 1987. DL<sub>50</sub> determinations: Objections to the method of Beccari as modified by Molinengo. *Toxicon*, 25: 779-783.
79. Sofer S., Gueron M., White R., Lifshitz M., Apte N. 1996. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*, 34: 389-392.



80. Spirandeli-Cruz E. 1999. Biología dos Escorpíes. En: *Venenos: Aspectos clínicos y terapêuticos dos acidentes por Animais Peçonhentos*. Barraviera, B. (Ed.). EUPB/Editora de Publicações Biomédicas, Rio de Janeiro. Pp. 135-150.
81. Tsushima R., Borges A., Backx P. 1999. Inactivated state dependence of sodium channel modulation by B-scorpion toxin. *European Journal of Physiology (Pflügers Archives)*, 437: 661-668.
82. Turkali I. 2004. Evaluación de la actividad biológica del veneno de *Tityus nororientalis* (Scorpiones, Buthidae) de Alto Llano, municipio Sotillo, estado Anzoátegui. Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
83. Valecillos R. 2001. Separación cromatográfica de las fracciones del veneno de una nueva especie del género *Tityus* (*T. quirogae*). Trabajo de grado para optar al título de Médico Cirujano, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona.
84. Voronov E., Apte N., Sofer S. 1999. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 5: 5-3.

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO

<b>Título</b>	<b>VARIABILIDAD GEOGRÁFICA E INTERSEXUAL DEL VENENO DE <i>Tityus nororientalis</i> (SCORPIONES, BUTHIDAE) EN RATONES C57BL/6</b>
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Aguilera Rodríguez, Rebeca Nohemí	<b>CVLAC</b>	17.418.771
	<b>e-mail</b>	<a href="mailto:rebekita105@hotmail.com">rebekita105@hotmail.com</a>
	<b>e-mail</b>	
Curupe Martínez, Luz Marina	<b>CVLAC</b>	16.718.417
	<b>e-mail</b>	<a href="mailto:curupeluz@hotmail.com">curupeluz@hotmail.com</a>
	<b>e-mail</b>	
Granados Ramos, Isabel Cristina	<b>CVLAC</b>	17.900.865
	<b>e-mail</b>	<a href="mailto:gran_isabell@hotmail.com">gran_isabell@hotmail.com</a>
	<b>e-mail</b>	

### Palabras o frases claves:

Toxicidad, dosis letal 50, escorpiónico, envenenamientos, veneno.
---

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Escuela de Ciencias de la Salud	Medicina
	Toxinología
	Farmacología

### Resumen (abstract):

El presente trabajo se realizó con el objeto de evaluar diferencias en los parámetros de producción de veneno y de toxicidad intersexual del veneno de una población de *Tityus nororientalis* González-Sponga, 1996 (Scorpiones, Buthidae) capturada en la localidad de Las Melenas, estado Sucre. La actividad biológica de los venenos de escorpiones machos y hembras fue ensayada luego de su inyección intraperitoneal en ratones hembra C57BL/6 de 15-25 g de peso. La letalidad fue cuantificada a través de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>), determinada según el método secuencial de Dixon y Mood para una hora de experimentación. El efecto clínico de los venenos se evaluó observando el curso temporal de toxicidad aguda experimental. Los resultados indicaron, en términos de producción de veneno, que cada hembra de *Tityus nororientalis*, por estimulación eléctrica, produce en promedio para peso y volumen, 1,18 mg y 8,16 µL de veneno; valores significativamente menores a los machos (en promedio 2,77 mg y 11,58 µL). La letalidad (en mg kg<sup>-1</sup>) del veneno de las hembras fue significativamente superior [8,43 (8,00-8,54)] al de los ejemplares macho [10,61 (10,07-11,30);  $p = 0,000001$ ]. En todos los casos, el cuadro clínico indicó neurotoxicidad aguda de los venenos ensayados; con signos predominantemente colinérgicos (con algunas manifestaciones adrenérgicas y centrales), similares a aquellos observados en humanos envenenados. Aunque comparable en su naturaleza neurotóxica, el curso temporal de toxicidad entre los dos venenos es de magnitud y cinética diferencial fundamentalmente en la fase de toxicidad grave (sialorrea abundante, disnea bradipnea-apnea, exoftalmos y parálisis espástica); tales signos aparecieron de manera significativamente más temprana en el caso de los animales inyectados con el veneno de hembras de *Tityus nororientalis*. Los resultados obtenidos indicarían variaciones intersexuales del veneno en esta especie que podrían estar relacionadas con su expresión proteómica y que, adicionalmente, apuntaría a confirmar la alta complejidad de los venenos de este grupo taxonómico con expresión en diversidad toxinológica genérica dentro de la misma especie.

## HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>Mercedes del Valle Matos</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLA	8.032.140
	e-mail	<a href="mailto:mmatosb@cantv.net">mmatosb@cantv.net</a>
	e-mail	
<b>Stefano Bónoli</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLA	11.727.468
	e-mail	<a href="mailto:sbonoli@cantv.net">sbonoli@cantv.net</a>
	e-mail	
<b>Leonardo De Sousa</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLA	14.214.493
	e-mail	<a href="mailto:leonardodesousa@yahoo.com">leonardodesousa@yahoo.com</a>
	e-mail	

### Fecha de discusión y aprobación:

Año                  Mes          Día

2010	09	30
------	----	----

Lenguaje: spa

**HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO****Archivo(s):**

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
<b>diferencias.intersexuales.venenos.escorpiones.doc</b>	<b>Application/Word</b>

**Caracteres en los nombres de los archivos:** A B C D E F G H I J K L M N  
O P Q R S T U V W X Y Z. a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z. 0 1 2 3  
4 5 6 7 8 9.

**Alcance:**

**Espacial:** Escuela de Ciencias de la Salud

**Temporal:** \_\_\_\_\_

**Título o Grado asociado con el trabajo:**

**Médico Cirujano**

---

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Pre Grado

**Área de Estudio:**

**Secciones de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas**

---

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**

**Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui**

---

**HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO****Derechos:**

De acuerdo al Artículo 44 del Reglamento de Trabajos de Grado: “Los Trabajos de Grado son de exclusiva propiedad de la Universidad y solo podrán ser utilizados a otros fines con el consentimiento del Núcleo respectivo, quien lo participará al Consejo Universitario”

---

---

Aguilera R.; Rebeca

**AUTOR**

Curupe M.; Luz

**AUTOR**

Granados R.; Isabel

**AUTOR**

---

De Sousa, Leonardo

**TUTOR**

Matos, Mercedes

**JURADO**

Bónoli, Stefano

**JURADO**

---

Profa. Rosibel  
Villegas

**Coordinadora de la Comisión de Trabajos de Grado  
POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS**