

EFFECTO DEL VENENO ENTERO DE *Centruroides gracilis* (SCORPIONIDA:  
BUTHIDAE) SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

JULIANA GARCÍA NÚÑEZ



UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI

2011

EFFECTO DEL VENENO ENTERO DE *Centruroides gracilis* (SCORPIONIDA:  
BUTHIDAE) SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

JULIANA GARCÍA NÚÑEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

Directora

ALEJANDRA JEREZ

M. D., Ph. D. Estud.

Codirector

SANTIAGO CASTAÑO

Biólogo, MSc. Ph. D. Cand.

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2011

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
UNIVERSIDAD DEL VALLE

JULIANA GARCÍA NÚÑEZ, 1987

EFFECTO DEL VENENO ENTERO DE *Centruroides gracilis* (SCORPIONIDA:  
BUTHIDAE) SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

Temas: escorpiones, canales iónicos, venenos, margatoxina, cultivo celular, proliferación celular, cáncer.

## **NOTA DE APROBACIÓN**

El trabajo de grado titulado “Efecto del veneno entero de *Centruroides gracilis* (Scorpionida: Buthidae) sobre la proliferación celular *in vitro*” presentado por la estudiante JULIANA GARCÍA NÚÑEZ, para optar al título de Bióloga con mención en genética, fue revisado por el jurado y calificado como:

### **Aprobado**

---

Alejandra Jerez

Directora

---

Santiago Castaño

Codirector

---

Jurado

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera han aportado sus conocimientos para el desarrollo de este proyecto.

A mi directora Alejandra Jerez por su asesoría, apoyo y amistad.

A mi codirector Santiago Castaño por su respaldo incondicional y su amistad.

Al Dr. Óscar Gutiérrez por guiarme en el desarrollo de este trabajo, por su amabilidad y colaboración.

A Franklin Moreno por su ayuda para la colecta de los escorpiones y de su ordeño.

A Flavio Cerón por toda su cooperación en la parte experimental.

A José Guillermo Ortega por su asesoría y colaboración.

A William Criollo por su asesoría en el cultivo celular.

A mi amigo Diego Solarte por sus consejos y apoyo.

A Helberg Asencio y Silverio Garzón por sus consejos y amistad.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
3.1 Los venenos.....	15
3.1.1 Los venenos como alternativa terapéutica.....	19
3.1.2 La margatoxina de la especie <i>Centruroides gracilis</i> .....	22
3.2 Aspectos generales del cáncer.....	22
3.3 El rol de los canales iónicos en el cáncer.....	27
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
5.1 Obtención del veneno de escorpión.....	31
5.2 Cuantificación de proteínas en el veneno.....	31
5.3 Mediciones para la determinación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ).....	32
5.3.1 En <i>Artemia salina</i> .....	32
5.3.2 Prueba de hemólisis radial directa en placa.....	32
5.4 Preparación de la línea celular L929 en medio de cultivo.....	33
5.5 Preparación del veneno.....	33

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
5.6 Ensayo de viabilidad celular con azul de tripam.....	33
5.7 Análisis estadístico.....	34
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
6.1 Colecta y ordeño de especímenes.....	35
6.2 Cuantificación de proteínas en el veneno.....	36
6.3 Mediciones para la determinación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ).....	36
6.3.1 En <i>Artemia salina</i> .....	36
6.3.2 Prueba de hemólisis radial directa en placa.....	37
6.4 Evaluación de la proliferación celular.....	37
6.5 Análisis estadístico.....	40
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Representación esquemática de las glándulas de veneno de escorpiones de la familia Buthidae.....	18
Figura 2. Cascada metastática.....	23
Figura 3. Mecanismos propuestos por los que las corrientes de potasio ( $K^+$ ) promueven la proliferación celular en tumores.....	29
Figura 4. <i>Centruroides gracilis</i> .....	35
Figura 5. Veneno entero liofilizado de <i>C. gracilis</i> .....	36
Figura 6. Número total de células vs. Concentración de veneno entero seco.....	38
Figura 7. Ensayo de exclusión con azul de tripam sobre los fibroblastos.....	39
Figura 8. Cultivo de fibroblastos bajo efecto del veneno entero de <i>C. gracilis</i> .....	40



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Recuento del número total de células expuestas a diferentes concentraciones de veneno durante 72 horas de incubación.....	37
Tabla 2. Estadística descriptiva de la proliferación celular a diferentes dosis de veneno....	41
Tabla 3. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.....	41
Tabla 4. Efecto del veneno entero de <i>C. gracilis</i> a diferentes dosis ensayadas en <i>Mus musculus</i> .....	46

## 1. RESUMEN

El veneno de escorpión es considerado una fuente de toxinas con gran potencial farmacológico y terapéutico contra enfermedades respiratorias, cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes, neoplásicas, etc., lo que hace de estos venenos y toxinas un blanco para el desarrollo de nuevos fármacos. En Colombia hay una gran diversidad de escorpiones cuyos venenos aún no han sido caracterizados y que podrían ser fuentes de péptidos usados para este fin. Uno de ellos es *Centruroides gracilis* (Scorpionida: Buthidae) en cuya picadura prevalecen efectos de características neurotóxicas. En el presente trabajo se evaluó la capacidad citotóxica del veneno de *C. gracilis* sobre modelos *in vivo* e *in vitro*, para lo cual se colectaron 22 especímenes en el sur-oriente de Cali que fueron ordeñados por estimulación eléctrica del telson, obteniendo 23.2mg de veneno seco con una concentración de proteínas de 17.09µg/µl. Este veneno se utilizó a diferentes dosis para realizar pruebas de toxicidad en *Artemia salina* y eritrocitos humanos, no reportándose un efecto tóxico sobre ellos. Asimismo, se aplicaron concentraciones de veneno de 400, 600 y 800ng/µl sobre fibroblastos de la línea L929 y se encontró que no hay diferencias significativas entre las dosis empleadas con respecto a la proliferación celular ( $p=0.580$ ). Sin embargo, el veneno tiene una tendencia a incrementar la proliferación celular con la dosis máxima de 800ng/µl. Con esto se concluye que el veneno de *C. gracilis* carece de una toxicidad significativa para los biomodelos evaluados, pero podría tener una actividad mitogénica que requiere ser estudiada más a fondo, ya que esto puede enfocarse hacia la búsqueda de factores que promuevan la proliferación celular en otros campos terapéuticos, como el cultivo de células madre para el establecimiento de tejidos.

## 2. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Los escorpiones son artrópodos quelicerados distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Saldarriaga & Otero, 2000), siendo la familia Buthidae la más numerosa y ampliamente distribuida a nivel mundial, que representa cerca de 45 de 115 géneros (39%) y 600 de 1 200 especies descritas (50%) (Francke & Jones, 1982). En Colombia, existen cuatro géneros de búthidos: *Ananteris* (cinco especies), *Centruroides* (una especie), *Rhopalurus* (una especie) y *Tityus* (29 especies) (Otero *et al.*, 1998; Gómez & Otero, 2007).

La especie *Centruroides gracilis* Latreille (1804) se reporta en el sur de México y de la Florida, Centroamérica, las Antillas, Colombia y Venezuela (Lourenço, 1997). Su presencia en el Perú siempre fue considerada dudosa, pero recientemente ha sido confirmada en la provincia de Zarumilla, Tumbes (Escobar y Ochoa, 2003). En Colombia, esta especie se encuentra en la costa Caribe, Valle del Cauca, Cauca, en varias subregiones de Antioquia y en el valle del alto Magdalena en Tolima, Huila y Cundinamarca (Lourenço, 1997; Valderrama, 1993). Su veneno provoca un intenso dolor, pero no es tan potente como el de otras especies relacionadas (Francke & Jones, 1982), por lo que su picadura no es un problema de salud pública.

En general, los venenos están constituidos por enzimas y neuro/miotoxinas. Las enzimas hialuronidasas ayudan a la difusión tisular de otros componentes y las neuro/miotoxinas son péptidos de 30-70 aminoácidos actuando sináptica, presináptica o postsinápticamente sobre canales iónicos de células excitables (Ménez, 2002).

En los escorpiones, el veneno es una mezcla bioquímica compleja, formada principalmente por proteínas neurotóxicas de bajo peso molecular que ejercen su acción sobre dichos canales iónicos (Saldarriaga & Otero, 2000). También se encuentran oligopéptidos, nucleótidos, aminoácidos, mucus y otros compuestos orgánicos (Gwee, 2002).

La importancia médica y biológica de estos arácnidos ha hecho que a pesar de ser un grupo relativamente pequeño, se le haya dedicado gran atención desde el enfoque toxicológico y epidemiológico (Ponce & Moreno, 2005), dado que el escorpionismo es un problema de salud pública en muchos países. Sin embargo, otras líneas recientes de investigación relacionadas con el escorpionismo se han dirigido hacia el potencial farmacológico y terapéutico, como es el caso de los estudios cubanos que han sugerido que el veneno de su escorpión endémico *Rhopalurus junceus* tiene propiedades anticancerígenas (Hernández *et al.*, 2009).

El cáncer surge de la proliferación incontrolada y de la propagación de clones de células transformadas. El crecimiento de tumores malignos es determinado en parte por la capacidad proliferativa de un grupo de células y por la habilidad de éstas para invadir otros tejidos (Abbas *et al.*, 2007). Se estima que cada año aparecen 10 millones de casos nuevos en el planeta cuyo 70% resulta en muerte del paciente, por lo que para el año 2020 se espera que estos casos aumenten a 15 millones, el 60% de ellos en países en desarrollo, que cuentan sólo con el 5% de los recursos destinados a combatir este mal (Camacho, 2006).

Los tratamientos más habituales contra el cáncer son la radioterapia y la quimioterapia, ya sea individualmente o combinados. No obstante, estos tratamientos no son selectivos y

presentan efectos secundarios dolorosos, como irritación de la piel y quemaduras leves o moderadas, para el primer caso (The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 2010), y para el segundo, su falta de selectividad es causa de su toxicidad hacia los tejidos sanos o no neoplásicos de un individuo portador de cáncer (Skeel, 2007).

Pero dado que esta enfermedad es un problema grande de salud mundial y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños y adultos (Abbas *et al.*, 2007), en la que muchas veces los tratamientos no son efectivos o con el tiempo se produce una reincidencia del tumor o cuando los pacientes se encuentran en estado avanzado de su enfermedad o por la dificultad de producir una vacuna efectiva, la terapia con veneno de escorpión se ofrece como una alternativa.

Dada la importancia de explorar la eficiencia de esta alternativa terapéutica contra el cáncer, en el presente trabajo se propone establecer una metodología que permita medir el efecto del veneno del escorpión *Centruroides gracilis* presente en la ciudad de Cali, y que pertenece a la misma familia del escorpión azul *Rhopalurus junceus* presente en la isla de Cuba. Debido a la cercanía filogenética entre estas dos especies de la familia Buthidae, se podría sustentar que *C. gracilis* posea una batería similar de toxinas o compuestos derivados de la expresión genética que pudiera ejercer efectos tóxicos similares sobre las líneas celulares específicas de cáncer.

De esta manera, se pueden emplear diferentes líneas celulares en las que se evalúe la respuesta proliferativa del veneno de escorpión. Pero para lograr esto, primero hay que caracterizar el potencial citotóxico del veneno entero de *Centruroides gracilis* usando

diferentes modelos de citotoxicidad, para en trabajos posteriores medir su efectividad sobre las células cancerosas.

De encontrarse resultados que apunten a que el veneno entero del escorpión *C. gracilis* induce muerte celular sobre células cancerosas, entonces puede evaluarse y proyectarse su potencial uso como se hace con el producto ESCOZUL derivado *R. junceus*. Por otro lado, los datos de la toxicidad del veneno de *C. gracilis* aportarán información que explique la fisiopatología generada por esta especie con distribución hacia las zonas secas orientales del municipio de Cali.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Los venenos.

Los venenos están constituidos por dos componentes principales: enzimas y neuro/miotoxinas. Los venenos son ricos en proteasas que ejercen una actividad predigestiva (no en todos los taxa de Arthropoda), así como en fosfolipasas que digieren las membranas bilipídicas. Las enzimas hialuronidasas ayudan a la difusión tisular de otros componentes y las neuro/miotoxinas son péptidos de 30-70 aminoácidos actuando sináptica, presináptica o postsinápticamente sobre canales iónicos de células excitables. Las neurotoxinas provocan una rápida parálisis para facilitar la captura de la presa (Ménez, 2002). Por otro lado, se llama toxina a una molécula aislada, extraída o derivada del veneno de un animal, planta o microorganismo y que posee una acción específica (Gawade, 2007).

Los escorpiones usan su veneno para inmovilizar la presa y como mecanismo de defensa. Estas dos funciones podrían haber ejercido presiones de selección que favorecieron el desarrollo de venenos complejos (Polis, 1990), permitiendo que las proteínas neurotóxicas actúen a nivel de los canales iónicos, retardando la inactivación del sodio y prolongando así el potencial de acción, con aumento del tiempo para integrar la corriente generada por las membranas excitables de las células efectoras, e incrementando la liberación de acetilcolina y catecolaminas a nivel sináptico, tanto en las terminaciones músculo-esqueléticas, como en las neuronas anatómicas ganglionares (Charry, 2006).

En los escorpiones, el veneno es un "cocktail" compuesto por unos 80 péptidos de bajo peso molecular que se han aislado e identificado en mamíferos, insectos y crustáceos, por medio de cromatografía, electroforesis y ensayos de competición. Estas proteínas actúan sobre canales iónicos dependientes de voltaje (principalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en membranas excitables (tejido nervioso, glandular y muscular), modifican su permeabilidad iónica, las despolariza y produce liberación de neurotransmisores en las terminaciones postganglionares de los sistemas simpático y parasimpático (Barona *et al*, 2004). Esta alta especificidad de los venenos los hace buenos candidatos para el diseño de nuevos fármacos (Lewis & Garcia, 2003).

El cuadro clínico del envenenamiento depende de la predominancia de los efectos adrenérgicos o colinérgicos, o de la combinación de ambos (*op. cit.*), provocan una cascada de eventos farmacológicos adversos en la víctima, en primer lugar, dolor local debido a la serotonina y, en segundo lugar, acción neurotóxica sobre los centros nerviosos hipotalámicos simpáticos y parasimpáticos que producen manifestaciones sistémicas (sudoración, náuseas, vómito, sialorrea, problemas cardiorrespiratorios, entre otros) (Valderrama, 1993).

Sin embargo, estudios anteriores han revelado que el veneno de los escorpiones también están compuestos por escorpaminas (proteínas neurotóxicas), aminoácidos, proteasas, fosfodiesterasas y oxidasas (Keegan, 1969). Estas últimas tienen gran acción sobre los canales de sodio, lo cual repercute sobre la despolarización de las terminales nerviosas postganglionares con liberación de catecolaminas y acetilcolina. Contiene además



serotonina (5-hidroxitriptamina) de la que depende la producción de dolor y edema en el sitio de la picadura (Zúñiga *et al.*, 2008).

Las toxinas de todos los escorpiones están construidas con un segmento de  $\alpha$ -hélice y dos o tres hojas  $\beta$  antiparalelas estrechamente sostenidas por tres o cuatro puentes disulfuro que mantienen la conformación terciaria (Wallace, 2007). Las toxinas de cadena corta están compuestas de 23 a 47 aminoácidos que afectan principalmente canales de  $K^+$  (Tytgat *et al.*, 1999); y las toxinas de cadena larga contienen entre 59 y 76 aminoácidos que ejercen su acción sobre los canales de  $Na^+$  (D'Suze *et al.*, 2004).

Los venenos son producidos en tejidos o glándulas especializadas, que con frecuencia están conectadas con estructuras para su aplicación como aguijones y dientes. Los animales involucraron la necesidad de sus venenos como un mecanismo de defensa (pez león) o para la captura de la presa (serpientes y arañas). Los animales venenosos poseen un aparato de veneno compuesto por glándulas, ductos excretorios y estructuras de aplicación como colmillos, aguijones, espinas, quelíceras, etc. (Meier & White, 1995).

El veneno es producido por dos glándulas en la cola del escorpión, una a cada lado de la línea media, y es almacenado en dos sacos de veneno (vesícula) en el telson. Cada glándula se encuentra invertida medial y dorsalmente con músculos compresores que presionan las glándulas contra la cutícula a lo largo de las superficies lateral y ventral, exteriormente (Polis, 1990).

Las glándulas están separadas por un tabique medial muscular vertical. Cada glándula está provista de un ducto de salida que comunica al exterior por dos diminutas y estrechas aberturas justo antes de la punta del acúleo (Polis, 1990). Cada glándula está anexa a una membrana basal, en la que hay tejido conectivo; entre el tejido conectivo y el lumen hay una monocapa de epitelio secretorio glandular. En la familia Buthidae (Figura 1), este epitelio se pliega varias veces e incluso muestra ramificaciones laterales (Halse *et al.*, 1980). Estas estructuras anatómicas son importantes para la sobrevivencia de estos animales porque ellos dependen de su veneno para la captura de sus presas (Elgar *et al.*, 2006).

Las células epiteliales secretorias son de tipo apocrino, cuyo contenido es descargado en el lumen sin destrucción de las propias células, y las mismas células producen veneno tanto tiempo como el núcleo esté activo y el citoplasma exista (Keegan & Lockwood, 1971).

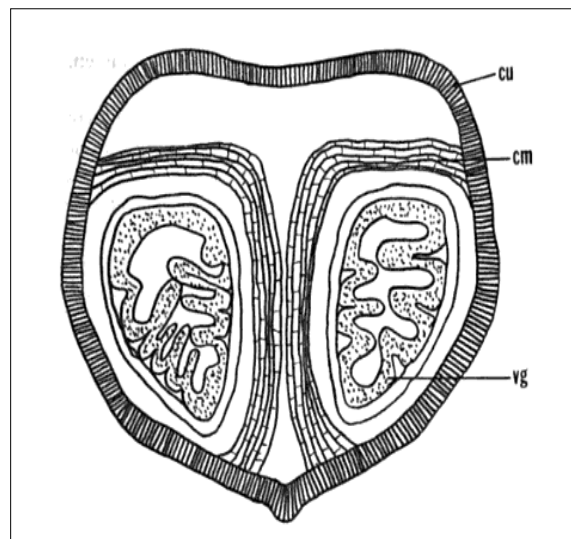


Figura 1. Representación esquemática de las glándulas de veneno de escorpiones de la familia Buthidae: cm (músculos compresores), cu (cutícula), vg (glándula de veneno). Fuente: Polis, 1990.

Cuando una toxina es introducida en el cuerpo de otro organismo vivo, una respuesta fisiológica se lleva a cabo, resultado de la inhibición o promoción de una reacción bioquímica compleja, en la que participa el sistema inmune induciendo anticuerpos neutralizantes o antitoxinas. Las toxinas pueden derivar su química del ambiente o de la dieta del animal hospedero, pero la producción de algunas toxinas requiere la codependencia de microorganismos asociados y del animal hospedero. Adicionalmente, la cantidad y calidad de las toxinas dependen de factores climáticos y de hábitat (Wallace, 2007).

La habilidad de una toxina para producir un efecto tóxico por acción a un único blanco podría depender de la dosis de toxina y/o de la conformación del sitio de unión. Los receptores pueden poseer un único sitio de unión para una toxina en particular o más de un sitio de unión para esa misma toxina. Si la dosis es baja, una mínima unión en un solo sitio sobre el receptor podría resultar en ninguna toxicidad medible. Si la dosis es alta, se incrementa la unión en un solo sitio o en múltiples sitios sobre el receptor, resultando en una toxicidad significativa (Wallace, 2007).

### **3.1.1 Los venenos como alternativa terapéutica.**

La biodiversidad y especificidad de los venenos y toxinas los hace una fuente única de plantillas estructurales para que nuevos agentes terapéuticos sean desarrollados. Por eso, desde la antigüedad, diferentes culturas como la china y la egipcia han usado los venenos de plantas y animales para curar varias enfermedades, de manera tal que los venenos han encontrado un nicho en el mercado farmacéutico (Gomes *et al.*, 2010).

De hecho, actualmente, las compañías farmacéuticas están consolidando la investigación en el potencial de los venenos para la próxima generación de drogas en la lucha contra el cáncer. Las células cancerosas pueden desarrollar un fenotipo de resistencia a multidrogas (MDR) en respuesta a la quimioterapia, lo que constituye uno de los principales obstáculos en la terapia contra el cáncer (Conti, 2004).

La quimioterapia y la radioterapia no proveen una protección adecuada, y además afectan también las células normales (Gomes *et al.*, 2010). Estos tratamientos se han usado ampliamente para bloquear la progresión del cáncer, pero estas terapias no siempre son sinónimo de éxito (Felipe *et al.*, 2006).

La búsqueda de una cura para el cáncer usando productos naturales se ha venido practicando por más de un siglo y todavía continúa. Desde entonces, muchos estudios se han llevado a cabo para dilucidar las propiedades anticancerígenas de los venenos y toxinas (Gomes *et al.*, 2010). Esto ha llevado a que los animales venenosos sean considerados una abundante fuente de péptidos antiproliferativos, algunos de los cuales están en ensayos clínicos como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer (Kastin, 2002).

Tal es el caso de la clorotoxina, un péptido básico de 36 aminoácidos del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus*, que bloquea los canales de cloro expresados en las células de glioma pero no en las células normales. Los canales de cloro se sobreexpresan en muchos tipos de cáncer, por lo que la clorotoxina posee actividad citolítica con alta selectividad por los tumores y gliomas de origen neuroectodérmico (Lyons *et al.*, 2002).

Estudios básicos sobre la estructura, actividad y blanco farmacológico de las toxinas, han llevado no sólo a un mejor entendimiento del papel de tales proteínas blanco en los procesos fisiológicos, sino también al desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a la activación o inhibición de un proceso fisiológico en particular. Los estudios futuros con este último grupo de toxinas deben estar dirigidos a la obtención del farmacóforo, tomando como punto de partida toda la información estructural y funcional disponible y las nuevas técnicas, como la síntesis de péptidos en fase sólida y la espectrometría de masas (Pereañez & Vargas, 2009).

Existen muchas maneras por las que un organismo puede responder a un compuesto tóxico, y el tipo de respuesta depende de numerosos factores. Aunque muchos de los efectos tóxicos de un compuesto tienen una base bioquímica, la expresión de dichos efectos puede ser diferente. Así, el desarrollo de tumores puede ser el resultado de un ataque a los ácidos nucleicos o la aparición de una generación anormal de células. La interacción de un compuesto tóxico con procesos metabólicos normales puede causar una respuesta fisiológica como parálisis, caída de la presión arterial o daño de un tejido o de un órgano (Timbrell, 2008).

Las respuestas tóxicas pueden ser del tipo “todo o nada” o pueden ser respuestas graduadas y se detectan gracias a los cambios fisiológicos y bioquímicos como la alteración de una vía metabólica particular o la aparición de una enzima o sustancia que sea indicativa de daño patológico, ya que cambios en la división celular o alteraciones en la síntesis de ATP o problemas en la permeabilidad de la membrana pueden afectar la regulación de las células o del organismo (*op. cit.*).

### 3.1.2 La margatoxina de la especie *Centruroides gracilis*.

La toxina del escorpión *Centruroides gracilis* se denomina margatoxina (MgTx), un péptido de 39 aminoácidos en su estructura primaria, con baja tasa de disociación y sin ningún efecto sobre los canales activados por calcio. Esta toxina es un inhibidor de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, como el canal  $K_v1.3$  de los linfocitos T (García-Calvo *et al.*, 1993).

La MgTx bloquea los canales  $K_v1.3$  en los linfocitos T humanos e impide la producción de interleucina 2 (IL-2), lo cual hace de esta toxina un poderoso agente inmunosupresor, que puede usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en el rechazo de transplantes, sin los efectos tóxicos de los medicamentos tradicionales como ciclosporina y ciclofosfamida. La MgTx también es útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y proliferativas de la piel, enfermedades respiratorias y alérgicas, enfermedades oculares, renales, hepáticas, vasculares, hemáticas y gastrointestinales (García-Calvo *et al.*, 1993).

### 3.2 Aspectos generales del cáncer.

El cáncer es un proceso multifactorial, en el que primero, las células adquieren un fenotipo maligno por la expresión de ciertos genes. Luego, las células tumorales proliferan masivamente y no sufren apoptosis (Felipe *et al.*, 2006). De esta manera, la patogénesis involucra cambios dinámicos en el genoma que pueden afectar la homeóstasis normal de los tejidos por la transformación de células a un fenotipo maligno, las cuales exhiben una multiplicación y diseminación incontroladas (Prevarskaya *et al.*, 2010) (Figura 2).

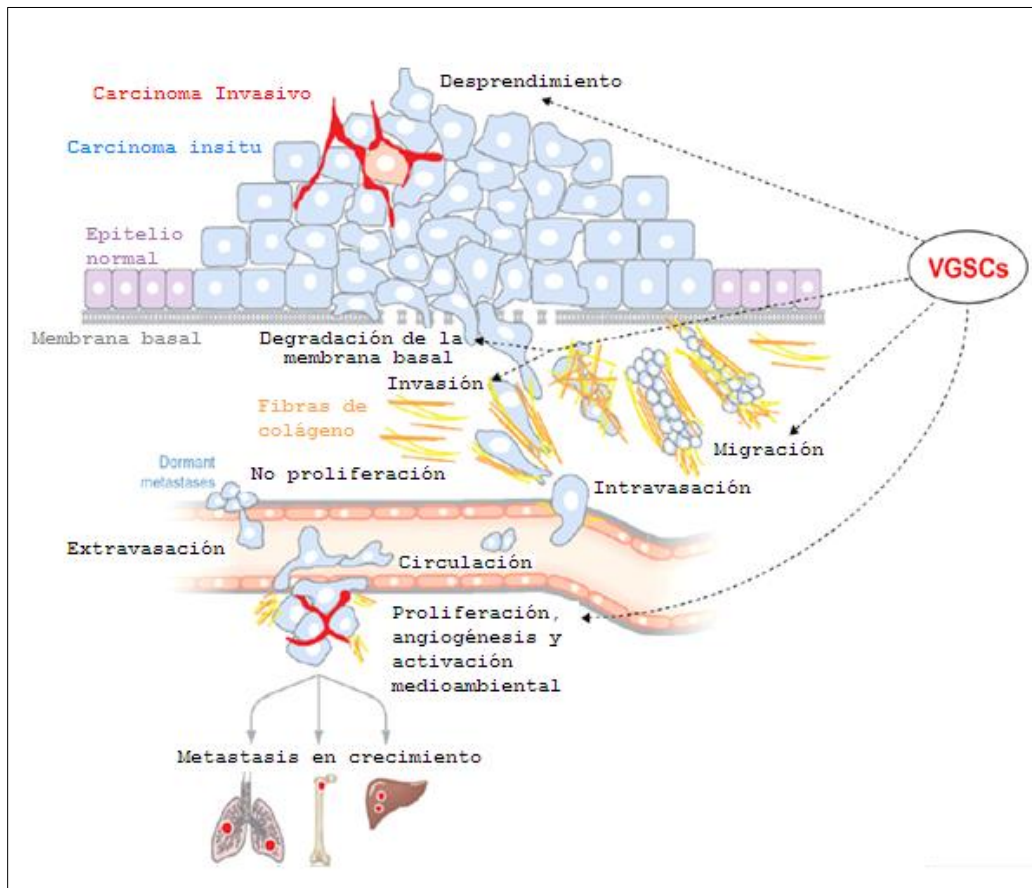


Figura 2. Cascada metastática. Transformación de células normales epiteliales resulta en carcinoma *in situ*. La actividad migratoria de las células tumorales conlleva a un estado invasivo. Después de la degradación de la membrana basal, las células tumorales invaden el estroma circundante, migran y entra a la circulación linfática o sanguínea hasta llegar a órganos distantes. La formación del tumor secundario ocurre después de la proliferación e inducción de angiogénesis. VGSCs: canales iónicos involucrados en esta cascada. Modificado de Prevarskaya *et al.*, 2010.

La tumorigénesis primaria comienza con la acumulación heterogénea de alteraciones genéticas (mutaciones en protooncogenes o genes supresores de tumores) y/o cambios epigenéticos (hipo/hipermetilación del DNA), resultando en disregulación de la expresión genética (Hanahan & Weinberg, 2000). La metástasis comprende la disociación de las

células unas de otras y su separación de la matriz extracelular para migrar a tejidos locales y entrar a la circulación sanguínea y linfática, y formar tumores secundarios después de la inducción de angiogénesis (Molloy & van't Veer, 2008).

Hanahan & Weinberg (2000) proponen seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que producen la manifestación cancerosa: 1) autoabastecimiento de señales de crecimiento, 2) insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, 3) evasión de apoptosis, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis prolongada y 6) invasión a otros tejidos (metástasis). Estas alteraciones reducen la dependencia de las células tumorales a la estimulación del microambiente presente en el tejido normal.

Las células normales requieren señales mitógenas para cambiar de un estado quiescente a uno proliferativo. Sin embargo, las células tumorales no solo dependen de señales externas de crecimiento, ya que éstas adquieren la capacidad de liberar mitógenos intrínsecos que actúan de manera autocrina o paracrina, poseen una alteración en la expresión de receptores y canales iónicos que aceptan señales de crecimiento y tienen una disregulación de las rutas intracelulares que tienen como blanco la expresión del gen (Prevarskaya *et al.*, 2010).

La enfermedad surge principalmente como consecuencia de la exposición de los individuos a agentes carcinogénicos en el ambiente, y de los hábitos personales, como el consumo de tabaco y el régimen alimentario, así como a factores biológicos tales como virus. El cáncer está estrechamente asociado a la posición socioeconómica. Los factores de riesgo de cáncer tienen mayor incidencia en los grupos con mínima educación. Además, los pacientes de las clases sociales más bajas sistemáticamente presentan las menores tasas de supervivencia, en



comparación con los de las clases sociales más altas (Organización Mundial de la Salud, 2004).

Hay más de 20 millones de personas que padecen cáncer en la actualidad y la mayoría vive en países en desarrollo. Con los conocimientos existentes es posible prevenir al menos 1/3 de los 10 millones de casos de cáncer que ocurren anualmente en el mundo. El cáncer es y será un factor cada vez más importante de la carga mundial de morbilidad en los decenios por venir. Se espera que el número estimado de casos nuevos cada año aumente de 10 millones en el 2000 a 15 millones para el 2020. Alrededor del 60% de todos estos casos nuevos se presentarán en las regiones menos desarrolladas del mundo (Organización Mundial de la Salud, 2004).

De los 10 millones de casos nuevos de cáncer que ocurren cada año, 4.7 millones se presentan en los países más desarrollados y casi 5.5 millones corresponden a los países menos desarrollados. En los países desarrollados, el cáncer es la segunda causa más frecuente de muerte y los datos epidemiológicos indican la aparición de una tendencia similar en los países en desarrollo. El cáncer es la causa de 12% del total de defunciones en todo el mundo. En aproximadamente 20 años, el número de defunciones provocadas por el cáncer aumentará anualmente, desde los cerca de 6 millones de defunciones actuales a unos 10 millones. En la actualidad, hay aproximadamente 20 millones de personas vivas que sufren algún tipo de cáncer; para 2020, probablemente habrá más de 30 millones (*op. cit.*).

Según la International Agency for Research on Cancer (IARC), en el 2008, los cánceres más frecuentes en mujeres tuvieron una incidencia de 1 383 523 casos para mama, 529 409

casos para cuello uterino, 570 009 casos para colon-recto, 513 637 casos para pulmón y 349 042 casos para estómago; y una mortalidad de 458 367 casos para mama, 427 392 casos para pulmón, 274 883 casos para cuello uterino, 288 049 casos para colon-recto, 273 634 casos para estómago y 217 568 casos para hígado. En hombres para el mismo año, se tuvo una mayor incidencia en pulmón con 1 095 186 casos, 913 770 casos para próstata, 663 612 casos para colon-recto, 640 556 casos para estómago y 522 355 casos para hígado. Igualmente se registró una mortalidad de 951 023 casos para pulmón, 478 275 casos para hígado, 464 435 casos para estómago, 320 595 casos para colon-recto, 276 129 casos para esófago y 258 381 casos para próstata.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología (INC), en el año 2007 se registraron para Colombia 5 305 casos nuevos (2 219 en hombres y 3 086 en mujeres), siendo el cáncer de próstata, de estómago, de pulmón, de colon y de recto los de mayor incidencia en hombres; mientras que en las mujeres se registra mayor riesgo en la mama, el cuello uterino, el estómago, el colon, el recto y el pulmón.

Dado esto, el mejor control del cáncer se logrará en gran medida gracias a las estrategias de prevención y a los programas de detección temprana, incluyendo las campañas de información y los programas de tamizaje de la población. A pesar de la explosión de conocimientos acerca de los tumores en el campo de la biología, probablemente transcurrirá otro decenio antes de que su aplicación mediante medicamentos nuevos y principios de tratamiento más avanzados reduzcan la mortalidad por cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2004).

### 3.3 El rol de los canales iónicos en el cáncer.

Los canales iónicos de membrana son esenciales para la proliferación celular y juegan un papel muy importante en el desarrollo del cáncer. Algunos parámetros homeostáticos como la concentración intracelular de iones, el pH citosólico y el volumen celular están gobernados por los canales iónicos. Durante la progresión del cáncer, una serie de cambios genéticos ocurre, los cuales pueden afectar la expresión de los canales o puede causar un cambio en su actividad (Kunzelmann, 2005).

Los canales de potasio comprenden una familia de proteínas que han sido clasificadas de acuerdo a sus características biofísicas y farmacológicas. Estos canales modulan algunos eventos celulares como la contracción muscular, la secreción neuroendocrina, frecuencia y duración de los potenciales de acción, la homeóstasis y el potencial de membrana de reposo (Hille, 2001).

Las potenciales implicaciones de los canales de  $K^+$  como blancos farmacológicos para la terapia del cáncer y como biomarcadores para el diagnóstico de la carcinogénesis son de creciente interés dado que en muchos tejidos cancerosos, como células de cáncer de próstata y de mama, diferentes canales de  $K^+$  como  $K_v$ , BK, IK1 y  $K_{ATP}$  son expresados y todos ellos tienen efecto sobre la proliferación celular (Abdul & Hoosein, 2002). Muchos estudios demuestran que la inhibición de la expresión de estos canales o su bloqueo por inhibidores específicos como algunas toxinas, reduce la proliferación celular (Wang, 2004; Pardo & Stümer, 2008) *in vitro* y contrarrestan su progresión *in vivo* (Conti, 2004).

Una de las toxinas más selectivas para  $K_v1.3$  proveniente del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (ahora *C. gracilis*) es la margatoxina (MgTx) (Garcia-Calvo *et al.*, 1993). Sin embargo, debido a que los diferentes canales de potasio requieren diferentes condiciones ambientales para ser funcionales, no se conoce con certeza cómo los canales de potasio promueven la proliferación ni en qué estado de desarrollo del cáncer aparecen (Kunzelmann, 2005).

Evidencias experimentales han demostrado que los canales de  $K^+$  están involucrados en los mecanismos regulatorios de la proliferación y sobrevivencia neoplásica. De hecho, aparte de mantener constante un valor despolarizado del potencial de reposo requerido para desregular el crecimiento del tumor, los canales de  $K^+$  confieren ventajas selectivas a las células cancerosas en un microambiente hipóxico, como el de las masas tumorales (Conti, 2004).

El incremento en la actividad de los canales de  $K^+$  está asociado con un incremento en la tasa de proliferación celular; sin embargo, los mecanismos son poco entendidos y algunos de éstos se han propuesto (Figura 3). Los canales  $K_v$  tienen un rol importante en los tejidos excitables como nervios y músculo. Probablemente, sólo en esas células el potencial de membrana producirá una despolarización que permite la activación de los canales de  $K^+$ . Un aspecto importante es que el potencial de membrana de las células cancerosas es típicamente más despolarizado que el de las células totalmente diferenciadas (Pardo, 2004; Wang, 2004).

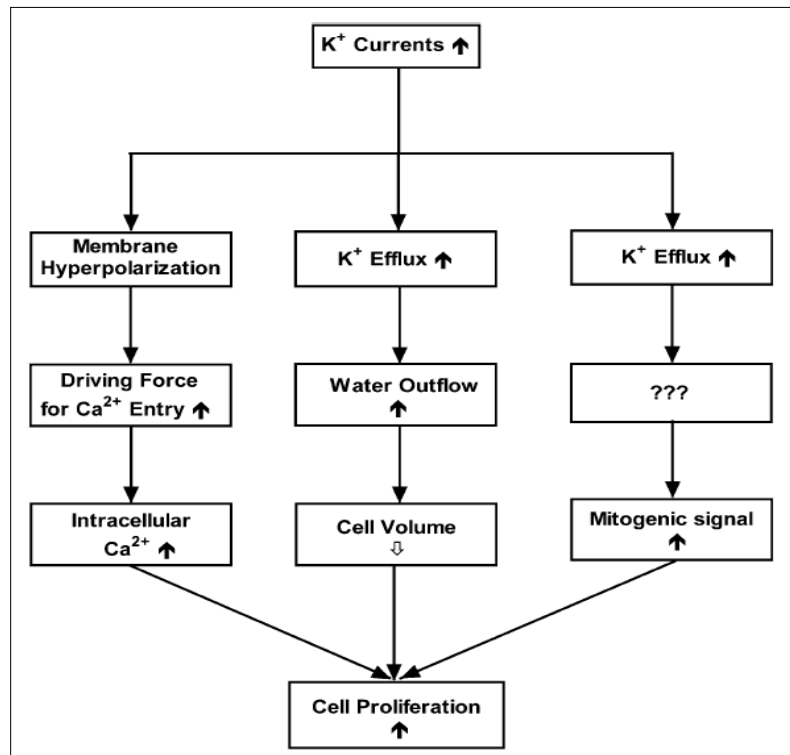


Figura 3. Mecanismos propuestos por los que las corrientes de potasio ( $K^+$ ) promueven la proliferación celular en tumores. Fuente: Wang, 2004.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general.

Medir las alteraciones en viabilidad de la línea celular de fibroblastos L929 cultivados *in vitro* al ser expuestos al veneno entero del escorpión *Centruroides gracilis*.

### 4.2 Objetivos específicos.

1. Caracterizar la cantidad de veneno que inyecta un escorpión por picadura y su concentración proteica.
2. Medir la dosis letal del veneno de *Centruroides gracilis* en por lo menos un modelo experimental.
3. Establecer una metodología que permita medir el efecto antiproliferativo sobre células sanas, dado que éste sería el modelo control para compararlo con el mismo modelo pero de células cancerosas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención del veneno de escorpión.

Los escorpiones *C. gracilis* fueron colectados en la parte suroriental de la ciudad de Cali, y se alimentaron con agua y cucarachas adultas (*Periplaneta americana*) una vez por semana.

El ordeño de los escorpiones se llevó a cabo por estimulación eléctrica según el método de Deoras & Vad (1962). Para esto, el escorpión se colocó sobre una plataforma de madera y se cubrió con una placa de vidrio, excepto el metasoma. El telson se sostuvo con fórceps y se estimuló con electricidad de 12V por 6ms y a una frecuencia de 15Hz aplicados mediante un electrodo. El veneno se colectó dentro de puntas de micropipeta que se colocaron en tubos Eppendorf, se enfrió a -20°C y luego se liofilizó. El veneno se mantuvo a -70°C hasta su uso.

### 5.2 Cuantificación de proteínas en el veneno.

La cantidad de proteína presente en el veneno crudo de *Centruroides gracilis* se determinó mediante el método espectrofotométrico, usando una concentración stock de 10mg/ml y haciendo una dilución de ésta de 1:100. La absorbancia se midió a 280nm (absorbancia máxima para aminoácidos aromáticos). Se tuvo en cuenta que 1O.D. equivale a 1mg/ml. La concentración de proteína se determinó mediante la fórmula:

$$[\text{Proteína}](\text{mg/ml}) = [\text{Proteína}](\text{mg/ml}) \times \text{factor de dilución}$$

### **5.3 Mediciones para la determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>).**

#### **5.3.1 En *Artemia salina*.**

Se preparó 1L de solución salina con agua destilada y 25g de sal marina, se llevó al agitador por 10 minutos y se filtró en papel filtro, manteniendo un pH entre 7 y 8 mediante la adición de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico) 10mM. Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en recipientes de 50ml con mitad luz y mitad oscuridad durante 24 horas entre 22 y 23°C para obtener formas larvarias (nauplio). Pasado este tiempo, los individuos se depositaron en una placa para inmunoensayos en tres grupos de 10 nauplios por pozo con 2ml de solución salina y las diferentes dosis de veneno (100, 200 y 800µg/ml) más un control. La placa se incubó por 24 horas con iluminación constante, al cabo de las cuales se contó el número de larvas muertas en cada pozo. Se realizó un nuevo conteo a las 48 horas de incubación.

#### **5.3.2 Prueba de hemólisis radial directa en placa.**

Se mezclaron 4ml de sangre humana con 1ml de citrato de sodio al 3.2% y se centrifugó a 3000rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el paquete de glóbulos rojos se lavó tres veces con buffer fosfato 0.05M con NaCl al 0.9% a pH 7.4. Finalmente de una suspensión al 1%, se tomaron 200µl que se colocaron sobre una base de agar al 2%. Este agar sangre se sirvió en portaobjetos manteniendo un grosor de 0.5mm y se incubó con diferentes dosis de veneno (200, 400, 600 y 800µg/ml) más un control con solución salina al 0.9% durante una hora a 37°C, luego de lo cual se evaluó la hemólisis producida midiendo el diámetro del halo formado.



#### **5.4 Preparación de la línea celular L929 en medio de cultivo.**

La línea celular fibroblástica L929 (ATCC CCL 1, clon 929) se cultivó en una botella Falcon T75 con medio DMEM rico en glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino de complementado, L-glutamina 2mM y piruvato de sodio 2mM a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **5.5 Preparación del veneno.**

A cada uno de tres tubos Falcon se añadieron 15ml de medio DMEM, a los cuales se les agregó una concentración de veneno diferente (400, 600 y 800µg/ml). Por otra parte, se tomaron 2 000 000 de células del cultivo y se resuspendieron en 1ml del medio de crecimiento. De esta suspensión, se pipetearon 225µl y se añadieron a cada uno de los tres tubos conteniendo las diferentes concentraciones de veneno. De cada tubo se adicionaron 5ml en tres pozos de una microplaca (cada fila de tres pozos a una concentración diferente) más tres pozos para el control. En cada pozo se sembró un promedio de 150 000 células. Las microplacas se taparon y se dejaron incubar a 37°C por 72 horas hasta que las células formaron una monocapa.

#### **5.6 Ensayo de viabilidad celular con azul de tripam.**

Se descartó el medio de cultivo y la monocapa celular se lavó tres veces con PBS estéril para luego barrer las células de la superficie de crecimiento por medio de scrapping. Las células se colectaron en un tubo con 2ml de medio de cultivo y se centrifugaron a 2000rpm por cinco minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó tres veces con PBS estéril. Estas células aisladas se diluyeron 1:10 (0.1ml de la suspensión de células y 0.9ml de azul de tripam). De esta dilución, se tomaron 10µl y se colocaron en una cámara de

Neubauer para contar el total de células vivas (aquellas que no adquirieron el colorante) y muertas (aquellas que adquirieron el colorante) y obtener un promedio de ellas en los cuatro campos de observación.

### **5.7 Análisis estadístico.**

Todos los datos fueron procesados con el software SPSS 11.5 y graficados con el software Origin Pro 8.0. Se utilizó un nivel de significancia de  $p < 0.05$  para comparar las células tratadas con las diferentes dosis de veneno.

Con los datos obtenidos del número de células se realizó un gráfico de Número total de células vs. Dosis de veneno; y se hizo el respectivo análisis de estadística descriptiva. Para evaluar la distribución normal de los datos se efectuó la prueba de normalidad según el test de Shapiro-Wilk, y de acuerdo a esto, se empleó la prueba no paramétrica de Friedman para un número pequeño de datos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Colecta y ordeño de especímenes.

Se colectaron 22 escorpiones adultos (10 machos y 12 hembras). Los machos pesaron en promedio 1.56g y las hembras 1.77g. Por cada escorpión se hicieron cinco ordeños, teniendo en cuenta un total de 95 ordeños y obteniendo un total de 572.8mg de veneno húmedo y 23.2mg de veneno seco.



Figura 4. *Centruroides gracilis*. a) Macho. b) Hembra. c) Hembra con crías. d) Crías de un mes de vida.



Figura 5. Veneno entero liofilizado de *C. gracilis*.

## 6.2 Cuantificación de proteínas en el veneno.

Los resultados obtenidos durante la colecta del veneno mostraron que cada escorpión inyecta en promedio 244.21  $\mu\text{g}$  de veneno seco a una concentración de 24.421  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La cantidad de proteína estimada por el método espectrofotométrico fue del 70% en peso seco, y por lo tanto la concentración de proteína en el veneno es de 17.09  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## 6.3 Mediciones para la determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ).

### 6.3.1 En *Artemia salina*.

Para determinar la  $DL_{50}$  se intentó seguir el método de Reed & Muench (1938), pero cada grupo de 10 nauplios de *Artemia salina* sobrevivió a las diferentes dosis de veneno (100, 200 y 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante las 48 horas de prueba. Con esto se concluye que bajo esta prueba (que es utilizada ampliamente para determinar  $DL_{50}$  de toxinas), el veneno entero de *C. gracilis* no es tóxico al menos en el rango de concentración empleado.

### 6.3.2 Prueba de hemólisis radial directa en placa.

El veneno no provocó efecto de hemólisis a ninguna de las dosis de veneno empleadas (100, 200 y 800ng/μl). Este resultado no permite hallar una dosis lítica mínima sobre los eritrocitos.

### 6.4 Evaluación de la proliferación celular.

Después de 72 horas de incubación de los fibroblastos con las diferentes dosis de veneno, se observó un ligero aumento en la proliferación celular con respecto al control, obteniéndose en promedio un mayor número de células a la concentración de 800ng/μl de veneno entero. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Recuento del número total de células expuestas a diferentes concentraciones de veneno durante 72 horas de incubación.

Concentración (ng/μl)	Repetición	Total de células
800	1	900 000
	2	950 000
	3	800 000
600	1	750 000
	2	700 000
	3	1 000 000
400	1	900 000
	2	750 000
	3	650 000
Control	1	750 000
	2	750 000
	3	800 000

Estos resultados se grafican en la Figura 6, en la cual se observa que hay un incremento en el crecimiento de las células después de ser tratadas con las concentraciones de 600ng/μl y 800ng/μl, pero fue especialmente esta última dosis la más efectiva, ya que presentó un promedio de  $8.83 \times 10^5 \pm 7.63 \times 10^4$  células luego de 72 horas de cultivo con respecto al control y a las demás dosis suministradas. Adicionalmente, no se observa diferencia en el efecto del veneno sobre la proliferación de los fibroblastos sometidos a la concentración de 400ng/μl con respecto al control. No hay diferencias significativas en el efecto de cada dosis de veneno sobre las células en cultivo, dado que las medias son muy parecidas. Igualmente, se muestra un margen de error amplio dado el bajo número de repeticiones y el estrecho rango de dosis utilizadas.

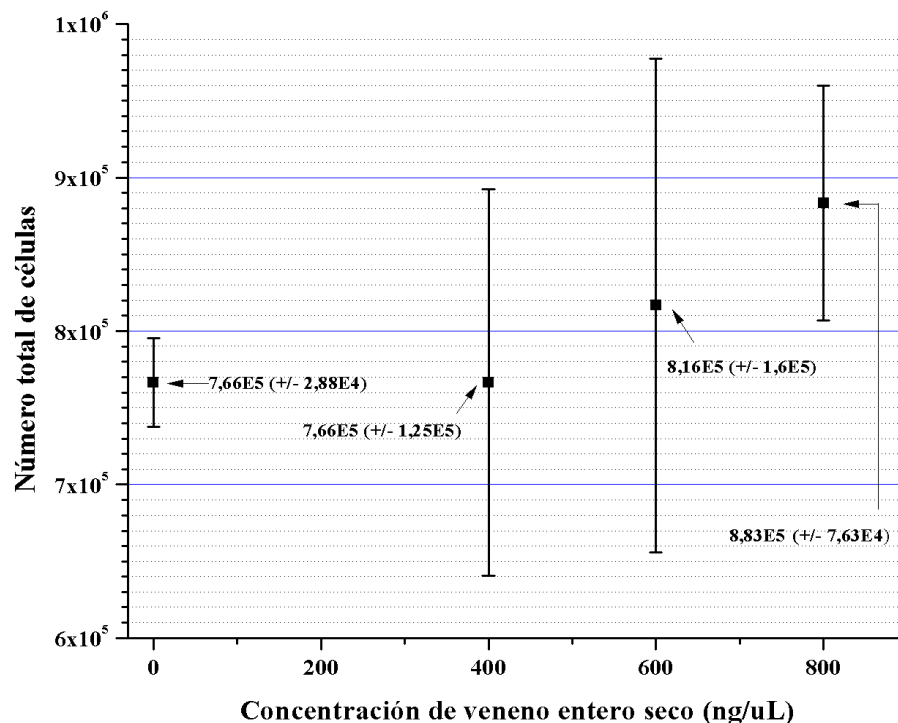


Figura 6. Número total de células vs. Concentración de veneno entero seco. Se muestra la media y la desviación estándar para cada dosis de veneno empleada.

En la Figura 7 se muestra el ensayo de exclusión celular con el colorante azul de tripam, donde se cuentan los fibroblastos en la cámara de Neubauer, siendo las células vivas de color blanco y las células muertas de color azul.

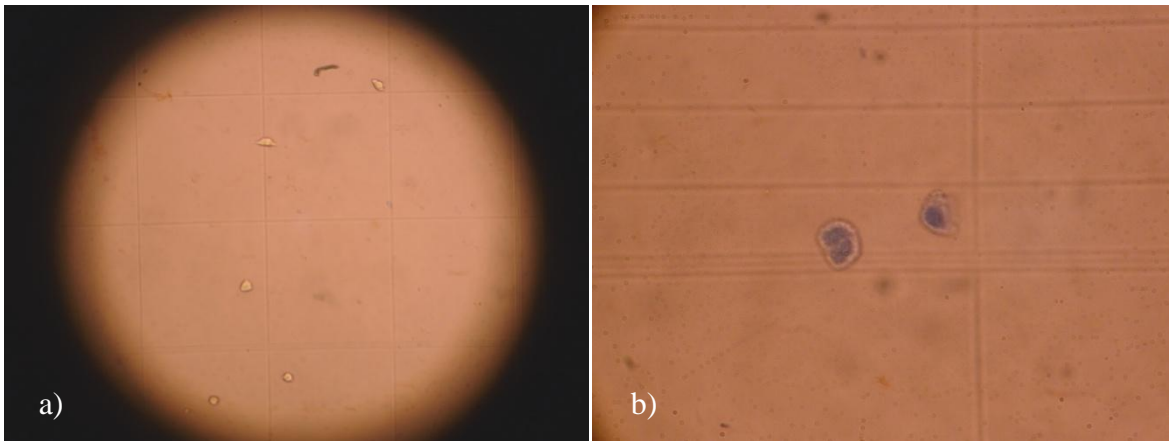


Figura 7. Ensayo de exclusión con azul de tripam sobre los fibroblastos. Aumento de 100X.

a) Células vivas (aquellas que no adquirieron el colorante). b) Células muertas (aquellas que adquirieron el colorante).

En la Figura 8 se muestra el aumento en la proliferación de los fibroblastos, observándose una mayor densidad celular a las 24 horas de cultivo en comparación con las células recién incubadas. Esta monocapa está conformada por células redondeadas (células jóvenes), mientras que a las 48 horas de cultivo, las células se observan alargadas y de forma estrellada, lo cual indica que son células que ya pasaron por la división celular y son células adultas.

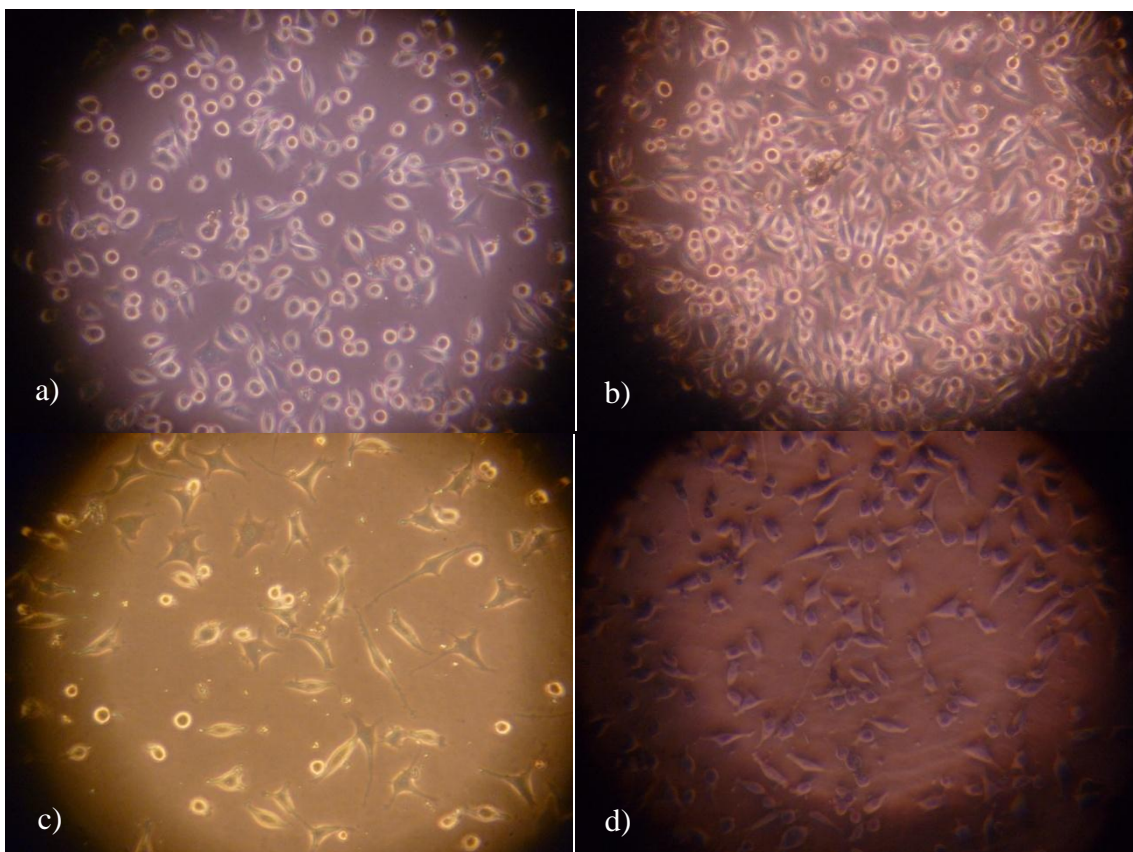


Figura 8. Cultivo de fibroblastos bajo efecto del veneno entero de *C. gracilis*. Aumento de 400X.

a) Fibroblastos a las cero horas de cultivo. b) Fibroblastos a las 24 horas de cultivo. c) Fibroblastos a las 48 horas de cultivo. d) Fibroblastos a las 72 horas de cultivo en contraste de fases, donde el núcleo se observa azul.

### 6.5 Análisis estadístico.

La Tabla 2 muestra que después de 72 horas de incubación, se obtuvo un promedio de  $8.83 \times 10^5 \pm 7.63 \times 10^4$  células en total luego de ser sometidas a la dosis de veneno de 800ng/ $\mu$ l;  $8.16 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$  células en total con la dosis de 600ng/ $\mu$ l;  $7.66 \times 10^5 \pm 1.25 \times 10^5$  células en total con la dosis de 400ng/ $\mu$ l y  $7.66 \times 10^5 \pm 2.88 \times 10^4$  células en total con el control sin veneno.



Tabla 2. Estadística descriptiva de la proliferación celular a diferentes dosis de veneno.

Dosis (ng/ $\mu$ l)	Repeticiones	Media	Desviación estándar	Sum	Mínimo	Mediana	Máximo
800	3	8.83E5	7.63E4	2.65E6	800000	900000	950000
600	3	8.16E5	1.6E5	2.45E6	700000	750000	1000000
400	3	7.66E5	1.25E5	2.3E6	650000	750000	900000
0	3	7.66E5	2.88E4	2.3E6	750000	750000	800000

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk mostró que estos datos no siguen una distribución normal (Tabla 3) según un p valor de 0.05, por lo que se empleó la prueba no paramétrica de Friedman.

Tabla 3. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Media de las células por dosis	DF	ESTADÍSTICO	PROBABILIDAD
883333,33333	3	0.95619	0.59725
816666,66667	3	0.88864	0.35021
766666,66667	3	0.99518	0.86732
766666,66667	3	0.75	-8.57151E-7

La prueba de Friedman muestra que no hay diferencias significativas en la proliferación de las células al ser expuestas a las distintas dosis de veneno. El p valor calculado es de 0.580, el cual es mayor que el p valor crítico de 0.05, de esta manera se dice que no hay diferencias significativas entre todas las dosis de veneno aplicadas a las células.

#### Estadísticos de contraste

N	3
Chi-cuadrado	1.962
gl	3
Sig. asintót.	0.580

## 7. DISCUSIÓN

De un total de 95 ordeños, se puede decir que cada escorpión inyecta en promedio 6.03mg (6030 $\mu$ g) de veneno crudo a una concentración de 603 $\mu$ g/ $\mu$ l, y 0.24421mg de veneno seco. Del volumen de veneno entero total obtenido de todos los ordeños y de la liofilización de este volumen se puede deducir que la concentración de veneno en agua es de 24.421 $\mu$ g por cada  $\mu$ l de veneno líquido. Escobar *et al.* (2003) colectaron 28.3mg de veneno entero crudo, mostrando que cada ejemplar inyecta aproximadamente 15 $\mu$ l (540 $\mu$ g) de veneno por picadura a una concentración de 36 $\mu$ g/ $\mu$ l, teniendo en cuenta un total de 52 escorpiones ordeñados.

Al hacer el cálculo de la cantidad de proteínas totales medidas por absorbancia directa a 280nm, se deduce que en peso, el 70% corresponde al total de proteínas presentes en el mismo, por lo tanto cada ejemplar tiene una concentración de proteínas de 17.09 $\mu$ g/ $\mu$ l en su veneno. Este resultado es comparable con los datos hallados por Escobar *et al.* (2003), en los que se reporta que la mayoría de venenos de escorpión tiene entre 70 y 90% de proteína. Estos mismos autores encontraron que en Perú, *C. gracilis* presenta un 81% de proteína en el veneno crudo, a una concentración de 29.1 $\mu$ g/ $\mu$ l por el método de Lowry *et al.* (1951).

El 70% de proteína estimada en el veneno está en consonancia con lo que se reporta acerca de la composición de los venenos de escorpión (neurotoxinas y enzimas), siendo estas proteínas de menos de 700Da (Zúñiga *et al.*, 2008), aunque algunos autores como Keegan

(1969) reportan que dichos venenos son pobres en actividad enzimática. El 30% restante correspondería a detritos y restos celulares.

Con respecto a los ensayos toxicológicos realizados con veneno entero de *C. gracilis* en *Artemia salina*, se puede decir que éste no presenta una suficiente toxicidad como para producir la muerte de los nauplios, por lo que es posible que el veneno tenga una dosis letal mayor a 800µg/ml o que el modelo animal empleado no sea sensible a él, ya sea porque las neurotoxinas son poco potentes al entrar por las branquias de los nauplios y su efecto no provoca la muerte de los mismos o porque el veneno no entra por difusión a los organismos o pudo producirse la degradación del veneno en el agua debido a las condiciones de salinidad y pH.

En el modelo experimental de destrucción de eritrocitos, no se observó halo de hemólisis, posiblemente por la falta de fosfolipasa en este veneno como lo afirma Escobar *et al.* (2003), quienes no encontraron evidencia de actividad proteolítica ni de actividad de fosfolipasa tanto en el veneno crudo como en las fracciones de *C. gracilis*. Estas características también se han observado en el veneno de escorpiones como *Tityus* sp. (aff *T. silvestris* Pocock, 1897), especie en la que Tincopa (2007) no halló actividad de fosfolipasa en el veneno entero ni en las fracciones colectadas.

Esta carencia de fosfolipasa y de proteasas sugiere que el veneno de *C. gracilis* no tiene una función predigestiva como sí la hay en arañas y en otras especies de escorpiones como *Hadrroides lunatus* (Escobar *et al.*, 2002) y *Brachistosternus ehrenbergii* (Ramos &

Escobar, 2007), por lo que la función de este veneno estaría encaminada a producir la parálisis de la presa para facilitar su captura o como mecanismo de defensa.

Igualmente se ha propuesto que las proteasas del veneno podrían actuar como agentes difusores del mismo al incrementar la permeabilidad de los tejidos facilitando así la difusión de las proteínas del veneno (Almeida *et al.*, 2002) para que actúen las neurotoxinas.

Estos resultados se relacionan a lo obtenido en ensayos previos, donde se estudió el comportamiento alimenticio de los escorpiones, observando que ellos paralizaban la presa mediante picadura y se alimentaban de la cucaracha viva, sin matarla; aunque en ocasiones los escorpiones no inyectaban a la presa. Asimismo, no se percibió una actividad predigestiva, ya que el escorpión se alimentaba de la presa entera, dejando únicamente las alas, las antenas y las patas, no quedaban restos de quitina de la presa (*obs. pers.*).

Muchas fosfolipasas requieren iones  $\text{Ca}^{2+}$  para una actividad completa, y ante una elevada presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, la fosfolipasa  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) se activa y convierte los fosfolípidos en lisofosfolípidos y ácido araquidónico (Verheij *et al.*, 1981). A pesar de haber añadido calcio a la suspensión de agar sangre con citrato de sodio, la prueba de hemólisis resultó negativa, aunque lo mismo se obtuvo con la suspensión de agar sangre con EDTA, a la que no se le añadió calcio. Lo cual confirmaría la ausencia de fosfolipasa, dado que si hubiera estado presente, se activaría por este calcio y produciría el halo de hemólisis esperado.

Se sabe que los venenos presentan una especificidad por el sistema nervioso y según un proyecto previo, (García *et al. datos no publ.*) observaron una serie de síntomas en ratones (*Mus musculus*) inoculados intraperitonealmente con diferentes dosis de veneno entero de *C. gracilis*, siendo estos síntomas más severos a medida que se incrementaba la concentración de veneno. En tres de las dosis empleadas (0.008mg/μl, 0.016mg/μl, 0.1472mg/μl) los ratones presentaron los síntomas característicos de un envenenamiento agudo, mientras que con la dosis de 0.2304mg/μl, el ratón mostró signos de envenenamiento sistémico con la consecuente muerte del animal, lo que sugiere que este veneno es de rápida absorción y distribución en el organismo.

En la Tabla 4 se muestran los síntomas observados por (García *et al. datos no publ.*) en ratones inoculados con diferentes dosis de veneno entero de *C. gracilis*, siendo la taquipnea (aumento en la frecuencia respiratoria) y la piloerección los más destacados.

Tabla 4. Efecto del veneno entero de *C. gracilis* a diferentes dosis ensayadas en *Mus musculus*.

Peso ratón	Concentración de veneno	Tiempo transcurrido inyección IP (min)	Efecto del veneno
34.2g	0.008mg/μl	0-15	Piloerección, taquipnea, tic nervioso y reacción espontánea de salto.
		15-30	Piloerección constante.
		30-45	Taquipnea, pérdida de la coordinación.
		45-60	Fotofobia.
35.6g	0.016mg/μl	0-15	Taquipnea y somnolencia.
		15-30	Taquipnea.
		30-45	Pérdida de la coordinación y piloerección.
		45-60	Fotofobia.
30.6g	0.1472mg/μl	0-15	Taquipnea, poliuria, piloerección, parálisis de extremidades inferiores, somnolencia.
		15-30	Fotofobia y pérdida del equilibrio.
		30-45	Escalofríos y taquipnea.
		45-60	Sialorrea y cianosis.
39.7g	0.2304mg/μl	0-15	Piloerección, taquipnea y fotofobia.
		15-30	Parálisis del lado izquierdo del cuerpo y cianosis facial.
		30-45	Taquipnea, pérdida del equilibrio y diarrea.
		45-60	Edema rostral, sialorrea, lagrimeo y muerte.

De esta manera, los signos observados obedecen a la estimulación del sistema nervioso autónomo, ya que la toxina del veneno interactúa con los canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje presentes en membranas excitables como las neuronales y musculares, y en células glandulares (Bosmans & Tytgat, 2007).

Según lo anterior se puede pensar, que el envenenamiento produjo un síndrome colinérgico principalmente asociado a canales de sodio, con la consecuente liberación de acetilcolina (ACh) y su posterior unión a receptores muscarínicos tanto del sistema autónomo simpático como parasimpático, llevando a la aparición de los signos observados, y de esta manera, se relaciona el sistema simpático con taquipnea y piloerección, y el sistema parasimpático con sialorrea (excesiva producción de saliva) y diarrea (aumento del peristaltismo intestinal) (Berne & Levy, 1992).

Como se mencionó anteriormente, los venenos de escorpión tienen una alta afinidad por los canales de sodio, retardando la inactivación de este canal y evitando la repolarización de las células. Moreno (2008) estudió la actividad neurotóxica del veneno de dos poblaciones de *C. gracilis* sobre el nervio ciático aislado de *Lithobates catesbeianus*, encontrando un incremento en la duración del potencial de acción compuesto (PAC) hasta su bloqueo o inhibición total en los 45-90 minutos después de la perfusión de 10 $\mu\text{l}$  de veneno para la primera población, y en los 45-120 minutos para la segunda; de manera que el veneno sí tiene actividad neurotóxica sobre los canales de  $\text{Na}^+$ .

Así como el veneno estimula el sistema nervioso autónomo de los animales, en este caso, ratones, también interactúa con otro tipo de células, ya que éstas responden a su ambiente a

través de receptores sobre su superficie que unen ligandos específicos. Previamente se mencionó que estos receptores pueden ser canales dependientes de voltaje sobre la membrana de las células, y algunas de sus funciones se encuentran relacionadas con la proliferación y el ciclo celular.

Las corrientes de  $K^+$  son blancos primarios para muchas drogas que alteran la función celular para producir efectos benéficos o para causar toxicidad. Muchas hipótesis se han propuesto acerca de los mecanismos por los cuales los canales de potasio promueven la proliferación celular en el cáncer (Figura 3). Sin embargo, estos mismos mecanismos podrían aplicarse al incremento en la proliferación de células normales, teniendo en cuenta que dichos canales podrían estar sobreexpresados en células tumorales (Wang, 2004).

De esta manera se notó que, pasado el periodo de incubación, con dosis altas de veneno hubo una tendencia al incremento en el número de células respecto al control, posiblemente por tener estas células receptores específicos para la toxina o toxinas del veneno, que desencadenaron una ruta de señalización en la que se liberaron factores de crecimiento autocrinos u otro tipo de sustancias que favorecieron la proliferación de las células en cultivo. Igualmente, se evidencia que el veneno no tiene un efecto inhibitorio sobre los canales de  $K^+$  involucrados en el progreso de las células a través del ciclo celular ( $G_1/S$ ), de lo contrario, la proliferación se hubiera inhibido o disminuido dado el bloqueo de dichos canales (Wang, 2004). Sin embargo, debido a que los canales de potasio requieren diferentes condiciones ambientales para ser funcionales, no se conoce con certeza cómo estos canales promueven o inhiben la proliferación (Kunzelmann, 2005).



Estos factores de crecimiento en los fibroblastos pudieron estimular también la entrada de  $\text{Na}^+$  a la célula a través del antiporte  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ . Esto resulta en la alcalinización del citoplasma y un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ . Este incremento, a su vez estimula la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , elevando la concentración de  $\text{K}^+$  y disminuyendo la de  $\text{Na}^+$  a niveles normales (Mendoza, 1988).

Se ha determinado que los canales de  $\text{K}^+$  son importantes en el potencial de membrana, siendo reguladores críticos de la proliferación en varios tipos celulares. El veneno pudo producir la despolarización de las células, incrementando los niveles de  $\text{K}^+$  dentro de ellas, lo cual facilitó la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las mismas. Este calcio y los cambios en el transporte iónico son necesarios para la proliferación celular (Mendoza, 1988; Wang, 2004).

La tendencia al incremento en la proliferación de los fibroblastos por parte del veneno, se asemeja a los resultados obtenidos por He *et al.* (2009), quienes encontraron que algunas fracciones del veneno del escorpión *Buthus martensii* (familia Buthidae) presentan actividad proliferativa en células hematopoyéticas K562 irradiadas, siendo la fracción IV a una concentración de  $30\mu\text{g}/\text{ml}$  la que mayor tasa proliferativa produjo (23.76%) luego de 36 horas de cultivo. Este valor fue cercano a los obtenidos con los controles positivos con IL-6 (300U/ml) y con GM-CSF (100U/ml), cuyas tasas de proliferación fueron 25.29% y 21.96%, respectivamente.

No obstante, se recomienda hallar la  $\text{DL}_{50}$  de este veneno en ratones porque a partir de esta dosis, se tendrían las concentraciones de veneno que luego se utilizarían para la estandarización de una dosis lítica mínima sobre las células normales y su posterior ensayo

en células cancerosas. Asimismo, es importante ampliar el rango de concentraciones usadas en los cultivos celulares y utilizar dosis de veneno mayores a 800ng/ $\mu$ l para obtener una verdadera respuesta proliferativa o antiproliferativa sobre las células.

También podrían utilizarse diferentes líneas celulares y observar la respuesta proliferativa de estas células bajo efecto del veneno, ya que cada línea puede responder de manera diferente al mismo. Es necesario hacer más repeticiones para cada dosis, de tal manera que se consiga una mayor cantidad de datos con los cuales comparar y contrastar y así se disminuye el error estadístico y se puedan obtener resultados más confiables.

Se recomienda caracterizar el veneno mediante HPLC y aislar sus fracciones para identificar los péptidos que serían los responsables de interactuar con los canales iónicos sobre las membranas celulares y que estarían interviniendo en la división celular, ya sea que la incremente (activación de canales) o que la disminuya (bloqueo de canales).

## 8. CONCLUSIONES

A partir de los ordeños, se concluye que cada ejemplar de *Centruroides gracilis* inyecta 244.21µg de veneno entero seco a una concentración de 24.421µg/µl, con un 70% de proteínas presentes en el mismo a una concentración de 17.09µg/µl.

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad, se puede concluir que el veneno del escorpión *C. gracilis* no es citotóxico para los eritrocitos ni para los fibroblastos, ya que no produjo lisis en ellos, y además presenta un bajo nivel de toxicidad para los organismos evaluados, de manera que su picadura no produciría un grave problema de salud.

Los resultados de este trabajo también sugieren que al ser el veneno de baja toxicidad, podría estimular el crecimiento de las células normales, y en un futuro se podría utilizar como una sustancia con gran selectividad y especificidad, ya que podría enfocarse hacia la búsqueda de factores que promuevan la proliferación celular y que sean empleados en el campo terapéutico, como el cultivo de células madre para el establecimiento de tejidos. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar los mecanismos de acción y las vías por los cuales actúa el veneno sobre dichas células.

**LITERATURA CITADA**

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. 2007. Cellular and molecular immunology. 6a edición. Saunders Elsevier. Impreso en China. 575 p.

ABDUL, M. & HOOSEIN, N. 2002. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Letters*. 186: 99-105.

ALMEIDA, F., PIMENTA, A., DE FIGUEIREDO, S., SANTORO, M., MARTIN-  
EAUCLAIRE, M., DINIZ, C. & DE LIMA, M. 2002. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*. 40: 1041-1045.

BARONA, J., OTERO, R. & NÚÑEZ, V. 2004. Aspectos toxinológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica*. 24 (1): 42-49.

BERNE, R. & LEVY, M. 1992. Fisiología. Editorial Times Mirror de España, S. A. Impreso en España. 689 p.

BOSMANS, F. & TYTGAT, J. 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion  $\alpha$ -toxins. *Toxicon*. 49: 142-158.

CAMACHO, R. 2006. El problema del cáncer, ¿cómo podemos enfrentarlo? Órgano de la Central de Trabajadores de Cuba. Consultado el 19 de Enero de 2010. [Online]. Available from Internet:

[http://www.trabajadores.cu/materiales\\_especiales/suplementos/salud/enfermedades-cronicas-no-trasmisibles-1/el-problema-del-cancer-bfcomo-podemos-enfrentarlo](http://www.trabajadores.cu/materiales_especiales/suplementos/salud/enfermedades-cronicas-no-trasmisibles-1/el-problema-del-cancer-bfcomo-podemos-enfrentarlo)

CHARRY, H. 2006. Accidentes por picadura de escorpión. En: Memorias del primer simposio de Toxinología Clínica “César Gómez Villegas”. Laboratorios Probiol Ltda. Facultad de Medicina Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, diciembre de 2006.

- CONTI, M. 2004. Targeting K<sup>+</sup> channels for cancer therapy. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 4: 161-166.
- DEORAS, P. & VAD, N. 1962. The milking of scorpions. *Toxicon*. 1: 41.
- D'SUZE, G., SEVCIK, C., CORONA, M., ZAMUDIO, F., BATISTA, C., CORONAS, F. & POSSANI, L. 2004. Ardiscretin a novel arthropod-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. 43: 263-272.
- ELGAR, D., DU PLESSIS, J. & DU PLESSIS, L. 2006. Cysteine-free peptides in scorpion venom: geographical distribution, structure-function relationship and mode of action. *African Journal of Biotechnology*. 5 (25): 2495-2502.
- ESCOBAR, E. & OCHOA, J. 2003. Confirmación de la presencia de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae) en el Perú. Libro de resúmenes XII Reunión Científica ICBAR. UNMSM.
- ESCOBAR, E., RIVERA, C. TINCOPA, L. & RIVERA, D. 2002. Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* Koch, 1867 (Scorpionida: Vejovidae).
- ESCOBAR, E., VELÁSQUEZ, L. & RIVERA, C. 2003. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae). *Revista Peruana de Biología*. 10 (2): 217-220.
- FELIPE, A., VICENTE, R., VILLALONGA, N., ROURA-FERRER, M., MARTÍNEZ-MÁRMOL, R., SOLÉ, L., FERRERES, J. & CONDOM, E. 2006. Potassium channels: New targets in cancer therapy. *Cancer Detection and Prevention*. 30: 375-385.
- FRANCKE, O. F. & JONES, S. K. 1982. The life history of *Centruroides gracilis* (Scorpiones, Buthidae). *Journal of Arachnology*. 10: 223-239.

GARCIA-CALVO, M., LEONARD, R., NOVICK, J., STEVENS, S., SCHMALHOFER, W., KACZOROWSKI, G. & GARCIA, M. 1993. Purification, characterization and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-gated dependent potassium channels. *J. Biol. Chem.* 282: 18866-18874.

GARCÍA, J., LIZARRALDE, M., MUÑOZ, V., ORJUELA, S. & QUIÑONEZ, A. 2008. Variación de la tasa metabólica en ratones inoculados con veneno entero de una especie de escorpión de la ciudad de Cali: *Centruroides gracilis*.

GAWADE, S. P. 2007. Therapeutic alternatives from venoms and toxins. *Indian Journal of Pharmacology.* 39 (6): 260-264.

GOMES, A., BHATTACHARJEE, P., MISHRA, R., BISWAS, A., DAS GUPTA, S. & GIRI, B. 2010. Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian Journal of Experimental Biology.* 48: 93-103.

GÓMEZ, J. & OTERO, R. 2007. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública.* 25 (1): 50-60.

GWEE, M., NIRTHANAN, S., KHOO, H., GOPALAKRISHNAHONEY, P., MANJUNATHA, R. & CHEAH, L. 2002. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 29: 795-801.

HALSE, S. A., PRIDEAUX, P. L., COCKSON, A. & ZWICKY, K. T. 1980. Observations on the morphology and histochemistry of the venom glands of a scorpion, *Urodacus novaehollandiae* Peters (Scorpionidae). *Australian Journal of Zoology.* 28: 185-194.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70.

HE, Y., KONG, T. & DONG, W. 2009. Scorpion venom polypeptide accelerates irradiated hematopoietic cells proliferation. *Pathophysiology*. 16: 253–258.

HERNÁNDEZ, O., CASADO, I., IGLESIA, E., RAMÍREZ, A., DEL RISCO, J. & RODRÍGUEZ, A. 2009. Evaluación de la toxicidad *in vitro* del veneno del alacrán *Rhopalurus junceus* a través de un ensayo celular. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 28 (1): 1-11.

HILLE, B. 2001. Ion channels of excitable membranes. 3a edición. Sinauer Associates, Inc. Impreso en Estados Unidos. 814 p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. [Online]. Available from Internet: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. 2008. Anuario estadístico 2007. Volumen 5. Editorial Legis. República de Colombia, Ministerio de la Protección Social. 100 p.

KASTIN, A. J. 2006. Handbook of biologically active peptides. Elsevier. Impreso en Estados Unidos. 1595 p.

KEEGAN, H. 1969. Some medical problems from direct injury by arthropods. *International Journal of Pathology*. 10: 35-45.

KEEGAN, H. & LOCKWOOD, W. 1971. Secretory epithelium in venom glands of two species of scorpion of the genus *Centruroides* Marx. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 20 (5): 770-785.

KUNZELMANN, K. 2005. Ion channels and cancer. *The Journal of Membrane Biology*. 205: 159-173.

LEWIS, R. & GARCIA, M. L. 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 790-802.

LOURENÇO, W. R. 1997. Synopsis de la faune de scorpions de Colombie, avec des considérations sur la systématique et la biogéographie des espèces. *Revue Suisse de Zoologie.* 104 (1): 61-94.

LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. & RANDALL, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

LYONS, S., O'NEAL, J. & SONTHEIMER, H. 2002. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. *Glia.* 39: 162-173.

MEIER, J. & WHITE, J. 1995. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC Press. Impreso en Estados Unidos. 752 p.

MENDOZA, S. A. 1988. The role of ion transport in regulation of cell proliferation. *Pediatric Nephrology.* 2. 118-123.

MÉNEZ, A. 2002. Perspectives in molecular toxinology. John Wiley & Sons, Ltda. Impreso en Inglaterra. 485 p.

MOLLOY, T. & VAN'T VEER, L. 2008. Recent advances in metastasis research. *Current Opinion in Genetics & Development.* 18: 35-41.

MORENO, F. 2008. Actividad neurotóxica del veneno de dos especies de escorpión del Valle del Cauca. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Programa Académico de Biología. Universidad del Valle. 59p.



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2004. Programas nacionales de control del cáncer: políticas y pautas para la gestión. [Online]. Available from internet:

<<http://www.paho.org/Spanish/ad/dpc/nc/pcc-NCCP.pdf>>

OTERO, R., URIBE, F. & SIERRA, A. 1998. Envenenamiento escorpiónico en niños. *Actualizaciones Pediátricas*. 8: 88-92.

PARDO, A. 2004. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology*. 19: 285-292.

PARDO, L. A. & STÜMER, W. 2008. Eag1: an emerging oncological target. *Cancer Research*. 68 (6): 1611-1613.

PEREAÑEZ, J. & VARGAS, L. 2009. Neurotoxinas de invertebrados como alternativas terapéuticas y herramientas en investigación básica. *Vitae*. 16 (1): 155-163.

POLIS, G. A. 1990. The biology of scorpions. Stanford University Press. Impreso en Estados Unidos. 587 p.

PONCE, J. & MORENO, R. 2005. El género *Centruroides* Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en México. *Biológicas*. 7: 42-51.

PREVARSKAYA, N., SKRYMA, R. & SHUBA, Y. 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 16 (3): 107-121.

RAMOS, C. & ESCOBAR, E. 2007. Aislamiento y algunas propiedades de la toxina Be1 del veneno de *Brachistosternus ehrenbergii* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Bothriuridae). *Rev. Per. Biol.* 13 (3): 243-247.

REED, L. J. & MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 27 (3): 493-497.

- SALDARRIAGA, M. & OTERO, R. 2000. Los escorpiones: Aspectos ecológicos, biológicos y toxinológicos. *MEDUNAB*. 3 (7): 17-23.
- SKEEL, R. T. 2007. Handbook of cancer chemotherapy. 7a edición. Lippincott Williams & Wilkins. Impreso en Estados Unidos. 817 p.
- TINCOPA, L. 2007. Estudio bioquímico del veneno del escorpión *Tityus* sp. (aff. *T. silvestris* Pocock, 1897). Tesis para optar al título profesional de biólogo con mención en Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 42 p.
- THE AMERICAN SOCIETY FOR THERAPEUTIC RADIOLOGY AND ONCOLOGY *Targeting Cancer Care*. 2010. La radioterapia para el tratamiento del cáncer. ASTRO 52<sup>nd</sup> Annual Meeting. 24 p.
- TIMBRELL, A. 2008. Principles of biochemical toxicology. 4a edición. Informa Health Care. Impreso en Estados Unidos. 453 p.
- TYTGAT, J., CHANDY, K., GARCÍA, M., GUTMAN, G., MARTIN-EAUCLAIRE, M-F., VAN DER WALT, J. & POSSANI, L. 1999. A unified nomenclature for short chain peptides isolated from scorpion venoms; alpha-Ktx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 445-447.
- VALDERRAMA, R. 1993. Arañas, escorpiones y abejas de interés médico. *IATREIA*. 6 (2): 75-86.
- VERHEIJ, H., SLOTBOOM, A. & DE HAAS, G. 1981. Structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91: 91-203.
- WALLACE, A. 2007. Principles and methods of toxicology. 5a edición. CRC Press. Impreso en Estados Unidos. 2270 p.

WANG, Z. 2004. Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 448: 274-286.

ZÚÑIGA, I., CARO, J., ESPARZA, M., ZARAGOZA, C., HERBAS, I., AGUIAR, N. & GÓMEZ, C. & 2008. Alacranismo: enfoque clínico y epidemiológico para el personal de salud. *Vacunación hoy.* 15 (87): 84-91.